

José Sérgio de Resende

**GENOTIPIFICAÇÃO DE ISOLADOS DE VÍRUS DA BRONquite
INFECCIOSA DAS GALINHAS EM SURTOS OCORRIDOS NA AVICULTURA
INDUSTRIAL DE MINAS GERAIS, BRASIL, DE 1972 A 1989.**

Tese apresentada à Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Ciência Animal.

Área: Medicina Veterinária Preventiva e Epidemiologia.

Orientador: Prof. Nelson Rodrigo da Silva Martins

Belo Horizonte
UFMG - Escola de Veterinária
2003

R433g Resende, José Sérgio de, 1953-
Genotipificação de isolados de vírus da bronquite infecciosa das galinhas em surtos ocorridos na avicultura industrial de minas gerais, brasil, de 1972 a 1989 / José Sérgio de Resende. –2003.
111 p.: il.

Orientador: Nelson Rodrigo da Silva Martins
Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária
Bibliografia: p.

1. Galinha – Doenças – Teses. 2. Bronquite infecciosa em aves domésticas – Teses. 3. Filogenia – Teses. I. Martins, Nelson Rodrigo da Silva. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária. III. Título.

CDD – 636.508 962 3

AGRADECIMENTOS PESSOAIS

Ao professor Maurício Resende, pela orientação no curso de doutorado em ciência animal no período de 1991 a 1993 (quando, por exigência da UFMG, foi substituído devido ao fato de ser irmão do orientado) e, também, pela idéia original do projeto e posterior trabalho que foi executado.

Ao professor Nelson Rodrigo da Silva Martins, que gentilmente e sem nenhuma exigência, substituiu na orientação de curso o professor Maurício Resende, tendo participado (1994-1996), de forma excepcional e irretocável, em todas as fases e momentos em que foi solicitado, inclusive durante o novo e segundo curso de doutorado em ciência animal (2001-2003).

Aos pesquisadores Áurea Valadares Folgueras-Flatschart e Roberto Becht Flatschart pela brilhante orientação incondicional (nos dois cursos de doutorado) e espontânea durante todas as etapas experimentais, além da colaboração direta nos experimentos, na análise dos resultados e elaboração final, sempre com sugestões vitais, deste trabalho.

Aos técnicos de laboratório Ismael Faustino de Souza e Cláudio Rocha Públio, pelo apoio incondicional e fiel durante as fases experimentais.

À professora Vera Lúcia Viegas de Abreu, pela participação nas bancas de qualificação (duas) e de defesa e, também, pelo apoio e incentivo durante toda a dupla jornada de doutorado.

À professora Clarice Weis Arns, por ter deixado seus afazeres (científicos, pedagógicos e pessoais) em Campinas-SP e aceitado participar da banca de defesa de tese.

À minha mãe Gessy Pereira de Resende e aos meus irmãos Luciano Resende e Cláudio Resende, pelo apoio emocional e financeiro durante esse longo período do curso.

Às professoras Josiane Tavares de Abreu e Salette Lobão Torres Santiago, pelo apoio direto na última fase experimental.

Aos colegas professores e funcionários do departamento, pelo incentivo e apoio durante o curso.

À Nádia por realizar os últimos retoques na confecção final deste trabalho.

Finalmente, agradeço àqueles que estiveram comigo o tempo todo, tolerando os meus bons e maus momentos, em especial à minha esposa Waldira Fernanda Carvalho de Resende, ao meu filho Henrique Carvalho de Resende (salvou-me inúmeras vezes nas questões relacionadas a computador) e à minha filha Sylvania Carvalho de Resende pelo agradável convívio.

AGRADECIMENTOS INSTITUCIONAIS

À FAPEMIG (Processo CAG nº CAG 1153/95) pelo financiamento deste trabalho e sem o qual seria impossível sua realização.

Ao CNPq por conceder uma bolsa de pesquisador (Processo nº 300 196/87-3), direta e pessoal, no período de tanto a tanto e que foi muito importante nas etapas iniciais de implementação dos experimentos.

À FEPMVZ – Coordenação Preventiva, que nos socorreu nas eventualidades emergenciais descortinadas durante as diversas fases deste trabalho (experimental e final).

Ao Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e, por extensão, à Escola de Veterinária da UFMG, por permitirem a execução deste trabalho em suas dependências.

SUMÁRIO

RESUMO	
ABSTRACT	
1. INTRODUÇÃO	
2. REVISÃO DE LITERATURA	
2.1. O VÍRUS.....	
2.1.1. CLASSIFICAÇÃO / TAXONOMIA.....	
2.1.2. MORFOLOGIA.....	
2.1.3. COMPOSIÇÃO QUÍMICA.....	
2.1.3.1. ESTRUTURA VIRAL.....	
A - <i>PROTEÍNAS ESTRUTURAIS (ENVELOPE /</i>	
<i>MEMBRANA & NUCLEOCAPSÍDEO</i>	
B - <i>PROTEÍNAS NÃO ESTRUTURAIS (ns)</i>	
2.1.3.2. GENOMA.....	
2.1.4. REPLICAÇÃO VIRAL.....	
2.1.4.1. ADSORÇÃO E PENETRAÇÃO.....	
2.1.4.2. TRADUÇÃO PRIMÁRIA.....	
2.1.4.3. TRANSCRIÇÃO DA FITA NEGATIVA DE RNA.....	
2.1.4.4. TRANSCRIÇÃO DA FITA POSITIVA DE RNA.....	
2.1.4.5. SÍNTESE DE PROTEÍNAS ESTRUTURAIS E NÃO	
ESTRUTURAIS.....	
2.1.4.6. MONTAGEM DA PARTÍCULA VIRAL.....	
2.2. GENÉTICA DO VBIG.....	
2.2.1. VARIANTES.....	
2.2.1.1. MUTAÇÃO DO RNA.....	
2.2.1.2. RECOMBINAÇÃO DO RNA.....	
2.2.2. RNAs INTERFERENTES DEFECTIVOS (DI - RNAs) E RNAmg.....	
2.3. A DOENÇA.....	
2.4. DIAGNÓSTICO.....	
2.4.1. SOROLOGIA.....	
2.4.2. ISOLAMENTO, IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO VBIG ...	
2.4.2.1. ISOLAMENTO.....	
2.4.2.2. IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO.....	
A - <i>MÉTODOS QUE UTILIZAM ANTICORPOS</i>	
B - <i>MÉTODOS QUE UTILIZAM ÁCIDO NUCLÉICO</i>	
2.5. ESTUDOS DE RELACIONAMENTOS GENÉTICOS ENTRE VBIGs.....	
2.6. CONTROLE.....	
3. MATERIAL E MÉTODOS	
3.1. VBIGs (ESTIRPES DE REFERÊNCIA E ISOLADOS BRASILEIROS).....	
3.2. ISOLAMENTO DOS VBIGs BRASILEIROS.....	
3.3. REPLICAÇÃO VIRAL.....	
3.4. CONCENTRAÇÃO DA MISTURA DE LÍQUIDOS ALANTÓIDEOS (LAs).....	
3.5. CONTROLES NEGATIVOS (ESPECIFICIDADE E SISTEMA DE	
PRODUÇÃO).....	
3.6. PROCEDIMENTOS DE BIOSSEGURANÇA LABORATORIAL.....	
3.6.1. CONSUMO.....	
3.6.2. VIDRARIA.....	
3.6.3. BIOSSEGURANÇA LABORATORIAL.....	
3.7. EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DO RNA TOTAL (INCLUINDO O VIRAL)	
3.8. SÍNTESE DO cDNA (DNA COMPLEMENTAR) / TRANSCRIÇÃO	
REVERSA E REAÇÃO EM CADEIA PELA POLIMERASE (RT - PCR).....	

3.8.1.	OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES (OLIGOS)
3.8.2.	SÍNTESE DE cDNA (DNA COMPLEMENTAR) - TRANSCRIÇÃO REVERSA (RT).....
3.8.3.	AMPLIFICAÇÃO DO cDNA OU REAÇÃO EM CADEIA PELA POLIMERASE (PCR)
3.9.	ANÁLISE DOS PRODUTOS DA RT - PCR E POR RESTRIÇÃO ENZIMÁTICA (RFLP).....
3.9.1.	ELETROFORESE
3.9.2.	RESTRIÇÃO ENZIMÁTICA E ANÁLISE POR RFLP
3.10.	RFLP COMPARADA COM DADOS OBTIDOS NA ANÁLISE DAS SEQUÊNCIAS DO GENE S2 DISPONÍVEIS NO GENBANK E DOS RESULTADOS DE Lin <i>et al.</i> (1991a)
3.11.	CONSTRUÇÃO DAS ÁRVORES FILOGENÉTICAS.....
3.12.	GENOTIPIFICAÇÃO.....
3.13.	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO
4.1.	VBIGs DE REFERÊNCIA (IMPORTADOS) E OS ISOLADOS BRASILEIROS)
4.2.	REPLICAÇÃO E CONCENTRAÇÃO VIRAL.....
4.3.	EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DO RNA TOTAL (INCLUINDO O VIRAL)....
4.4.	SÍNTESE DE cDNA (DNA COMPLEMENTAR) / TRANSCRIÇÃO REVERSA E REAÇÃO EM CADEIA PELA POLIMERASE (RT-PCR).....
4.4.1.	OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES (OLIGOS)
4.4.2.	SÍNTESE DE cDNA (DNA COMPLEMENTAR) - TRANSCRIÇÃO REVERSA (RT).....
4.4.3.	AMPLIFICAÇÃO DO cDNA OU REAÇÃO EM CADEIA PELA POLIMERASE (PCR)
4.5.	RESTRIÇÃO ENZIMÁTICA E ANÁLISE POR RFLP
4.6.	RFLP COMPARADA COM DADOS OBTIDOS NA ANÁLISE DAS SEQUÊNCIAS DO GENE S2 DISPONÍVEIS NO GENBANK E DOS RESULTADOS DE Lin <i>et al.</i> (1991a).....
4.7.	ÁRVORES FILOGENÉTICAS
4.8.	GENOTIPIFICAÇÃO
4.9.	CONSIDERAÇÕES FINAIS
5.	CONCLUSÕES
6.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Principais eventos relacionados com a BIG e o VBIG no mundo.....
Tabela 2 -	VBIGs (estirpes) de referência usados como controles positivos.....
Tabela 3 -	Isolados do VBIG a partir de surtos clínicos da BIG na avicultura industrial do estado de Minas Gerais (Regiões Alto São Francisco e Metalúrgica) no período entre 1972 e 1989
Tabela 4 -	Informações complementares adicionais dos VBIGs de outros países utilizados na RFLP comparada e na construção de árvores filogenéticas.....
Tabela 5 -	Esquema visual dos padrões de cortes obtidos nas RFLPs deste trabalho (análise inicial) X Padrões de restrições enzimáticas (RFLP comparada - análise final) a partir do segmento amplificado por RT-PCR de 23 VBIGs (oito VBIGs de referência e 15 isolados brasileiros)

- Tabela 6 - Padrões de corte encontrados na RFLP (análise inicial) do segmento amplificado de S2 obtido por RT-PCR de 23 VBIGs (oito de referência e 15 isolados brasileiros)
- Tabela 7 - Determinação dos padrões de restrição enzimática (PRE) com base nas informações obtidas nas seqüências flanqueadas pelos oligos BIGS21 e BIGS22 (gene codificador da glicoproteína S2) dos VBIGs disponíveis no GenBank (submetidos à análise por RFLP no WebGene), no mapa contendo os sítios de restrição enzimática de Lin *et al.* (1991a) e nos resultados deste trabalho
- Tabela 8 - RFLP de parte do gene S2 (região flanqueada pelos oligos BIGS21 e BIGS22) de 20 VBIGs depositados no GenBank e submetidos à análise por RFLP simulada no programa WebGene.....
- Tabela 9 - RFLP de parte do gene S2* obtida por RT-PCR de 12 VBIGs no trabalho de Lin *et al.* (1991a)
- Tabela 10 - RFLP (análise final, após RFLP comparada) de parte do gene S2 obtida por RT-PCR de 23 VBIGs (15 isolados brasileiros) neste trabalho

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Microscopia eletrônica do VBIG
- Figura 2 - Morfologia esquemática do coronavírus VBIG
- Figura 3 - Glicoproteína peplomérica S (S1 + S2) do VBIG.....
- Figura 4 - Genoma do VBIG e representação do esquema e replicação viral.....
- Figura 5 - Eletroforese dos produtos da RT-PCR. Visualização, sob luz UV, dos géis de agarose 3,5% corados com EtBr após eletroforese dos produtos amplificados (parte do gene S2) obtidos de 23 VBIGs (PPM 100: padrão molecular de fragmentos de DNA fita dupla de diferentes tamanhos - 100 *bp* DNA *Ladder*; pb: pares de bases). Gel A - Oito VBIGs de referência e dois controles (negativos) de especificidade (VDN - LaSota) e de sistema (*pool* de LAs de OEG/SPF). Gel B - Quinze isolados brasileiros
- Figura 6 - Visualização dos produtos da restrição enzimática com *Bst*YI. RFLPs dos produtos amplificados (parte do gene S2) por RT-PCR de 23 VBIGs [oito de referência (M-41 → Iowa-97) e quinze isolados brasileiros (208 → 200)] sobre luz UV após eletroforese em gel de agarose 3,5% corado com EtBr (PPM 100: 100 *bp* DNA *Ladder*; pb: pares de bases)
- Figura 7 - Visualização dos produtos restrição enzimática com *Dde*I. RFLPs dos produtos amplificados (parte do gene S2) por RT-PCR de 23 VBIGs sobre luz UV após eletroforese em géis de agarose 3,5% corados com EtBr (PPM 100: 100 *bp* DNA *Ladder*; pb: pares de bases). Gel A - Oito VBIGs de referência. Gel B - Quinze isolados brasileiros

- Figura 8 - Visualização dos produtos restrição enzimática com *HaeIII*. RFLPs dos produtos amplificados (parte do gene S2) por RT-PCR de 23 VBIGs sobre luz UV após eletroforese em géis de agarose 3,5% corados com EtBr (PPM 100: 100 *bp* DNA *Ladder*; pb: pares de bases). Gel A - Oito VBIGs de referência. Gel B - Quinze isolados brasileiros.....
- Figura 9 - Visualização dos produtos restrição enzimática com *HincII*. RFLPs dos produtos amplificados (parte do gene S2) por RT-PCR de 23 VBIGs sobre luz UV após eletroforese em géis de agarose 3,5% corados com EtBr (PPM 100: 100 *bp* DNA *Ladder*; pb: pares de bases). Gel A - Oito VBIGs de referência. Gel B - Quinze isolados brasileiros.....
- Figura 10 - Visualização dos produtos restrição enzimática com *HinfI*. RFLPs dos produtos amplificados (parte do gene S2) por RT-PCR de 23 VBIGs sobre luz UV após eletroforese em géis de agarose 3,5% corados com EtBr (PPM 100: 100 *bp* DNA *Ladder*; pb: pares de bases). Gel A - Oito VBIGs de referência. Gel B - Quinze isolados brasileiros.....
- Figura 11 - Visualização dos produtos restrição enzimática com *HpaII*. RFLPs dos produtos amplificados (parte do gene S2) por RT-PCR de 23 VBIGs sobre luz UV após eletroforese em géis de agarose 3,5% corados com EtBr (PPM 100: 100 *bp* DNA *Ladder*; pb: pares de bases). Gel A - Oito VBIGs de referência. Gel B - Quinze isolados brasileiros.....
- Figura 12 - Visualização dos produtos restrição enzimática com *MaeIII*. RFLPs dos produtos amplificados (parte do gene S2) por RT-PCR de 23 VBIGs sobre luz UV após eletroforese em géis de agarose 3,5% corados com EtBr (PPM 100: 100 *bp* DNA *Ladder*; pb: pares de bases). Gel A - Oito VBIGs de referência. Gel B - Quinze isolados brasileiros.....
- Figura 13 - Visualização dos produtos restrição enzimática com *PstI*. RFLPs dos produtos amplificados (parte do gene S2) por RT-PCR de 23 VBIGs sobre luz UV após eletroforese em géis de agarose 3,5% corados com EtBr (PPM 100: 100 *bp* DNA *Ladder*; pb: pares de bases). Gel A - Oito VBIGs de referência. Gel B - Quinze isolados brasileiros.....
- Figura 14 - Visualização dos produtos restrição enzimática com *Scal*. RFLPs dos produtos amplificados (parte do gene S2) por RT-PCR de 23 VBIGs sobre luz UV após eletroforese em géis de agarose 3,5% corados com EtBr (PPM 100: 100 *bp* DNA *Ladder*; pb: pares de bases). Gel A - Oito VBIGs de referência. Gel B - Quinze isolados brasileiros.....
- Figura 15 - Árvore filogenética de VBIGs usando o VBIG M-41 como raiz (parental) e o programa TREECON. As porcentagens (indicam alta repetibilidade no *bootstrap* e refletem os distanciamentos genéticos) foram calculadas a partir dos resultados da análise por RFLP com nove enzimas de restrição (*BstYI*, *DdeI*, *HaeIII*, *HincII*, *HinfI*, *HpaII*, *MaeIII*, *PstI* e *Scal*) de parte do gene S2 de 46 VBIGs procedentes de três fontes de informações (GenBank + WebGene, Lin *et al.*, 1991a e deste trabalho).....

- Figura 16 - Árvore filogenética de VBIGs usando o VBIG H-52 como raiz (parental) e o programa TREECON. As porcentagens (indicam alta repetibilidade no *bootstrap* e refletem os distanciamentos genéticos) foram calculadas a partir dos resultados da análise por RFLP com nove enzimas de restrição (*Bst*YI, *Ddel*, *Hae*III, *Hin*clI, *Hin*fI, *Hpa*II, *Mae*III, *Pst*I e *Scal*) de parte do gene S2 de 46 VBIGs procedentes de três fontes de informações (GenBank + WebGene, Lin *et al.*, 1991a e deste trabalho).....
- Figura 17 - Árvore filogenética de VBIGs usando o VBIG M-41 como raiz (parental) e o programa TREECON. As porcentagens (indicam alta repetibilidade no *bootstrap* e refletem os distanciamentos genéticos) foram calculadas a partir dos resultados da análise por RFLP com cinco enzimas de restrição (*Bst*YI, *Ddel*, *Hpa*II, *Pst*I e *Scal*) de parte do gene S2 de 46 VBIGs procedentes de três fontes de informações (GenBank + WebGene, Lin *et al.*, 1991a e deste trabalho).....
- Figura 18 - Árvore filogenética de VBIGs usando o VBIG H-52 como raiz (parental) e o programa TREECON. As porcentagens (indicam alta repetibilidade no *bootstrap* e refletem os distanciamentos genéticos) foram calculadas a partir dos resultados da análise por RFLP com cinco enzimas de restrição (*Bst*YI, *Ddel*, *Hpa*II, *Pst*I e *Scal*) de parte do gene S2 de 46 VBIGs procedentes de três fontes de informações (GenBank + WebGene, Lin *et al.*, 1991a e deste trabalho).....
- Figura 19 - Árvore filogenética de VBIGs usando o VBIG M-41 como raiz (parental) e o programa TREECON. As porcentagens (indicam alta repetibilidade no *bootstrap* e refletem os distanciamentos genéticos) foram calculadas a partir dos resultados da análise por RFLP com cinco enzimas de restrição (*Ddel*, *Hpa*II, *Mae*III, *Pst*I e *Scal* - sem a *Bst*YI) de parte do gene S2 de 46 VBIGs procedentes de três fontes de informações (GenBank + WebGene, Lin *et al.*, 1991a e deste trabalho)
- Figura 20 - Árvore filogenética de VBIGs usando o VBIG H-52 como raiz (parental) e o programa TREECON. As porcentagens (indicam alta repetibilidade no *bootstrap* e refletem os distanciamentos genéticos) foram calculadas a partir dos resultados da análise por RFLP com cinco enzimas de restrição (*Ddel*, *Hpa*II, *Mae*III, *Pst*I e *Scal* - sem a *Bst*YI) de parte do gene S2 de 46 VBIGs procedentes de três fontes de informações (GenBank + WebGene, Lin *et al.*, 1991a e deste trabalho)
- Figura 21 - Árvore filogenética de VBIGs usando o VBIG M-41 como raiz (parental) e o programa TREECON. As porcentagens (indicam alta repetibilidade no *bootstrap* e refletem os distanciamentos genéticos) foram calculadas a partir dos resultados da análise por RFLP com quatro enzimas de restrição (*Ddel*, *Hpa*II, *Pst*I e *Scal* - sem a *Bst*YI) de parte do gene S2 de 46 VBIGs procedentes de três fontes de informações (GenBank + WebGene, Lin *et al.*, 1991a e deste trabalho).....

- Figura 22 - Árvore filogenética de VBigS usando o VBig H-52 como raiz (parental) e o programa TREECON. As porcentagens (indicam alta repetibilidade no *bootstrap* e refletem os distanciamentos genéticos) foram calculadas a partir dos resultados da análise por RFLP com quatro enzimas de restrição (*Ddel*, *HpaII*, *PstI* e *Scal* - sem a *BstYI*) de parte do gene S2 de 46 VBigS procedentes de três fontes de informações (GenBank + WebGene, Lin *et al.*, 1991a e deste trabalho).....
- Figura 23 - Árvore filogenética de quinze isolados brasileiros do VBig. A árvore é sem raiz, isto é, a posição do(s) hipotético(s) VBig(s) ancestral(is) é desconhecida. Usando o programa TREECON, os comprimentos dos “galhos” da árvore foram calculados a partir dos resultados da análise por RFLP com nove enzimas de restrição (*BstYI*, *Ddel*, *HaeIII*, *HinCI*, *HinfI*, *HpaII*, *MaellI*, *PstI* e *Scal*) de parte do gene S2
- Figura 24 - Árvore filogenética no formato circular de quinze isolados brasileiros do VBig. A árvore é sem raiz, isto é, a posição do(s) hipotético(s) VBig(s) ancestral(is) é desconhecida. Usando o programa TREECON, os comprimentos dos “galhos” da árvore foram calculados a partir dos resultados da análise por RFLP com nove enzimas de restrição (*BstYI*, *Ddel*, *HaeIII*, *HinCI*, *HinfI*, *HpaII*, *MaellI*, *PstI* e *Scal*) de parte do gene S2....
- Figura 25 - Árvore filogenética de quinze isolados brasileiros do VBig. A árvore é sem raiz, isto é, a posição do(s) hipotético(s) VBig(s) ancestral(is) é desconhecida. Usando o programa TREECON, os comprimentos dos “galhos” da árvore foram calculados a partir dos resultados da análise por RFLP com cinco enzimas de restrição (*BstYI*, *Ddel*, *HpaII*, *PstI* e *Scal*) de parte do gene S2
- Figura 26 - Árvore filogenética no formato circular de quinze isolados brasileiros do VBig. A árvore é sem raiz, isto é, a posição do(s) hipotético(s) VBig(s) ancestral(is) é desconhecida. Usando o programa TREECON, os comprimentos dos “galhos” da árvore foram calculados a partir dos resultados da análise por RFLP com cinco enzimas de restrição (*BstYI*, *Ddel*, *HpaII*, *PstI* e *Scal*) de parte do gene S2.....
- Figura 27 - Genotipificação. Árvore filogenética de VBigS sem raiz construída com o programa TREECON a partir dos resultados da análise por RFLP com nove enzimas de restrição (*BstYI*, *Ddel*, *HaeIII*, *HinCI*, *HinfI*, *HpaII*, *MaellI*, *PstI* e *Scal*) de parte do gene S2 de 46 VBigS procedentes de três fontes de informações (GenBank + WebGene; Lin *et al.*, 1991a e deste trabalho)...
- Figura 28 - Genotipificação. Árvore filogenética de VBigS sem raiz construída com o programa TREECON a partir dos resultados da análise por RFLP com cinco enzimas de restrição (*BstYI*, *Ddel*, *HpaII*, *PstI* e *Scal*) de parte do gene S2 de 46 VBigS procedentes de três fontes de informações (GenBank + WebGene; Lin *et al.*, 1991a e deste trabalho).....

RESUMO

Um segmento de DNA (400 pb) situado na extremidade codificante da região N-terminal do gene S2 de quinze isolados brasileiros e oito estirpes do vírus da bronquite infecciosa das galinhas (VBIG) foi amplificado pela técnica de RT-PCR (transcrição reversa - reação em cadeia pela polimerase) e analisado por RFLP (polimorfismo nos comprimentos dos fragmentos de DNA obtidos na restrição enzimática). Os isolados foram obtidos de plantéis comerciais (14 isolados de frangos de corte e um de poedeira comercial) com surtos da bronquite infecciosa das galinhas na avicultura industrial do estado de Minas Gerais, de 1972 a 1989. Padrões de restrição enzimática foram obtidos na análise por RFLP com nove enzimas de restrição (*Bst*YI, *Dde*I, *Hae*III, *Hin*clI, *Hin*fI, *Hpa*II, *Mae*III, *Pst*I e *Sca*I) e comparados com resultados obtidos de 20 VBIGs cujos genes S2 estão disponíveis no GenBank e submetidos à simulação de RFLP pelo WebGene, assim como em um trabalho japonês com 12 VBIGs (seis isolados japoneses) publicado em 1991. Dos 55 VBIGs examinados nas três fontes de informação, descontados os idênticos, foram utilizados 46 diferentes para o estudo de genotipificação. Árvores filogenéticas, com ou sem raiz, foram construídas com o programa TREECON utilizando os resultados da análise por RFLP obtidos para os 46 VBIGs. Quinze isolados brasileiros foram classificados em três genótipos distintos dentro do universo amostral estudado (46 VBIGs). Um dos genótipos, denominado "Massachusetts" por abrigar VBIGs de referência sabidamente pertencentes a este genótipo, agrupou nove isolados brasileiros. Os outros dois genótipos distintos agruparam seis isolados brasileiros considerados "variantes" por este estudo: "283, 290, 297" e "351, G e TII". A maior ocorrência de isolados brasileiros (nove) agrupados no genótipo "Massachusetts" foi atribuída ao uso exclusivo de vacinas vivas atenuadas deste genótipo na avicultura industrial brasileira.

Palavras-chave: vírus da bronquite infecciosa das galinhas; galinha; glicoproteína S2; gene S2; filogenia; genotipificação; RT-PCR; RFLP.

ABSTRACT

One segment of DNA (400 bp) situated at the coding end of the n-terminal region of the gene S2 of fifteen brazilian isolates and eight reference strains of infectious bronchitis virus (IBV) was amplified by RT-PCR (reverse transcriptase - polymerase chain reaction) and analysed by RFLP (restriction fragment length polymorphism). The isolates were obtained from industrial flocks (14 isolated from broilers and one from layers) of the poultry industry (Minas Gerais state) undergoing respiratory disease, nephritis and / or reduced / defective laying, during the period from 1972 to 1989. The profiles of restriction by RFLP analysis of amplicons (400 bp) obtained with nine (*Bst*YI, *Dde*I, *Hae*III, *Hin*clI, *Hin*fI, *Hpa*II, *Mae*III, *Pst*I e *Sca*I) or five (*Bst*YI, *Dde*I, *Hpa*II, *Pst*I e *Sca*I) restriction enzymes, were compared to results obtained for S2 gene sequences (20 IBV) in the GenBank and submitted to RFLP in the WebGene, in addition to 12 IBV (six japanese isolates) in a similar study in Japan. Out of the 55 IBV examined, using the the three sources of information , e. g., RFLP of local, reference and GenBank IBV, the homologous IBV were excluded and 46 were employed for genotyping. Phylogenetic trees with or without root were built using TREECON software and the fifteen brazilian isolates were grouped each into one of three genotypes. The "Massachusetts" genotype included the reference strains of that serotype and most (nine) of brazilian isolates. The other two genotypes included six isolates considered "variants" by this study: "283, 290, 297" e "351, G e TII". A greatest occurrence for genotype "Massachusetts" might be attributed to the use of this serotype for live vaccines in brazilian poultry industry.

Keywords: chicken; infectious bronchitis virus; RT-PCR; RFLP; S2 gene; genotype; phylogeny; genotyping.

1. INTRODUÇÃO

A avicultura industrial mundial emprega um complexo pacote tecnológico (genética e manejo geral) que permite a transformação de alimentos de baixo valor nutricional (milho ou soja) em produtos nobres (carne e ovo), com qualidade sanitária razoavelmente controlada, o que a coloca em posição destacada na pecuária em termos de eficiência. Esta produtividade privilegiada tem sido desafiada por fatores debilitantes à saúde dos plantéis, entre os quais os agentes infecto-contagiosos, destacando-se o vírus da bronquite infecciosa das galinhas (VBIG) que é o causador da bronquite infecciosa das galinhas (BIG). Como o VBIG tem em seus antígenos regiões hipervariáveis, freqüentemente dribla a imunidade estabelecida com o manejo sanitário baseado em vacinações sistemáticas (vacinas vivas e inativadas). Conseqüentemente, leva a grandes perdas econômicas decorrentes da diminuição da eficiência alimentar na produção de ovos e no ganho de peso, condenação em abatedouros e mortalidade por complicações respiratórias e renais.

A detecção (identificação) laboratorial do VBIG tem de ser rápida e, se possível, acompanhada da tipificação (caracterização) do(s) isolado(s) envolvido(s) no(s) surto(s) da BIG, requerendo metodologia de diagnóstico muito precisa, condição que os métodos virológicos e sorológicos convencionais infelizmente não conseguem atender.

A técnica da “reação em cadeia pela polimerase”, cuja abreviação é mundialmente conhecida por PCR (sigla, em inglês, de *Polymerase Chain Reaction*), vem sendo adotada na pesquisa de microrganismos em todo o mundo, devido à alta especificidade, sensibilidade, reprodutibilidade, eficiência e rapidez de seus resultados que podem ser obtidos em até 24 horas. Desde a última década, foram realizadas muitas pesquisas visando o desenvolvimento de técnicas de PCR rápidas e sensíveis para detecção do VBIG,

tanto visando a identificação do agente etiológico, como a genotipificação de isolados obtidos em sistemas ideais (ovos embrionados de galinha ou cultivo de anéis de traquéia de embriões de galinha) ou, diretamente, a partir de tecidos obtidos em aves durante os surtos clínicos da BIG (traquéia, pulmões, sacos aéreos, rins, oviduto, tonsilas cecais, etc.).

O VBIG possui genoma RNA (sigla, em inglês, de ARN: ácido ribonucléico) e, portanto, na fase inicial da técnica de PCR, sua extração e purificação sem degradá-lo, é imprescindível. Os vários protocolos descritos incluem procedimentos bastante trabalhosos para extração do RNA viral, o que pode inviabilizar sua adoção na rotina laboratorial. Antes de se realizar a PCR, é necessária a transcrição do RNA para DNA (sigla, em inglês, de ADN: ácido desoxirribonucléico) utilizando a enzima transcriptase reversa de retrovírus para este fim, cuja sigla que dá nome a esta fase prévia é RT, devido ao nome da enzima em inglês (*Reverse Transcriptase*). Daí, quando se trata de vírus RNA, a técnica é chamada de RT-PCR. No caso deste trabalho, após a realização da RT-PCR, foi feita a digestão do segmento de DNA amplificado com enzimas de restrição (tecnicamente chamada de restrição enzimática) de cada um dos VBIG estudados para análise do polimorfismo nos comprimentos dos fragmentos de DNA obtidos na restrição enzimática, cuja sigla em inglês é RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*). A técnica passou, então, a se chamar RT-PCR com análise por RFLP (RT-PCR / RFLP).

Este trabalho objetivou utilizar uma metodologia de diagnóstico molecular para confirmar a identidade de isolados brasileiros do VBIG com uma RT-PCR / RFLP anteriormente publicada (Lin *et al.*, 1991a) de uma parte pertencente à região N-terminal do gene codificador da glicoproteína S2 (gpS2) deste vírus, cujas extremidades flanqueadoras (5' e 3') são razoavelmente bem conservadas e que, posteriormente, foi considerada de uso universal (Adzhar *et al.*, 1996). Permitted,

ainda, um estudo filogenético comparativo mais profundo e detalhado com outros VBIGs disponíveis (GenBank + WebGene e Lin *et al.*, 1991a), ancorado na restrição enzimática da parte amplificada do gene alvo, além de uma genotipificação ampla, envolvendo oito VBIGs de referência importados e quinze isolados de surtos da BIG em lotes não vacinados contra VBIG da avicultura industrial do estado de Minas Gerais (Regiões Alto São Francisco e Metalúrgica) de 1972 a 1989.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. O VÍRUS

2.1.1. CLASSIFICAÇÃO / TAXONOMIA

O VBIG é o membro protótipo da Família *Coronaviridae* e está classificado no Gênero *Coronavirus*. Dentro do gênero, pertence ao grupo antigênico III, conforme classificação refinada utilizando uma combinação de análise com anticorpos monoclonais e seqüenciamento de nucleotídeos do genoma, formalizada em 1993 pelo ICTV (International Committee for the Taxonomy of Viruses) (Cavanagh *et al.*, 1994; Cavanagh *et al.*, 1995). No que diz respeito às seqüências de aminoácidos das proteínas e à antigenicidade, o VBIG é completamente distinto de outros coronavírus que infectam aves (perus) e mamíferos (Cavanagh & Naqi, 1997).

2.1.2. MORFOLOGIA

O VBIG é pleomórfico mas geralmente arredondado (Figura 1). Possui um envelope com aproximadamente 120 nm de diâmetro contendo projeções superficiais (espículas) com formato que lembra um sorvete comum em casquinha ou pétala de flor, possuindo cerca de 20 nm de comprimento (Cavanagh & Naqi, 1997; Collisson *et al.*, 1992). O nome corona (coroa) advém do aspecto observado à microscopia eletrônica do vírion completo (Figura 1). É um dos maiores vírus RNA positivos conhecidos (Schochetman *et al.*, 1977).

2.1.3. COMPOSIÇÃO QUÍMICA

Existem duas grandes revisões sobre a composição química dos coronavírus (Cavanagh *et al.*, 1994; Siddell, 1995).

2.1.3.1. ESTRUTURA VIRAL

A - PROTEÍNAS ESTRUTURAIIS (ENVELOPE / MEMBRANA & NUCLEOCAPSÍDEO)

O vírion do VBIG possui três grandes proteínas estruturais vírus-específicas: as glicoproteínas da espícula (S) e da membrana (M), e, a proteína fosforilada do nucleocapsídeo interno, também chamada de nucleoproteína (N). O nucleocapsídeo é constituído por várias moléculas básicas de proteína N que envolvem o genoma (RNA) viral e é longo, flexível e com simetria helicoidal (Macnaughton *et al.*, 1978; Schochetman *et al.*, 1977) (Figura 2). Mutações na N podem afetar a estabilidade e a viabilidade viral. O papel da fosforilação da N ainda não foi determinado. O VBIG não possui a glicoproteína HE (hemaglutinina-esterase) presente em alguns outros coronavírus (Lai & Cavanagh, 1997). O envelope é constituído por uma camada dupla lipoprotéica derivada do retículo endoplasmático rugoso (RER) ou do complexo de Golgi das células infectadas que replicaram o VBIG, e nele estão instaladas as glicoproteínas virais (S e M). Uma quarta e pequena glicoproteína de membrana (sM) é encontrada associada ao envelope e parece ser muito importante na montagem da partícula viral (Lai & Cavanagh, 1997). As proteínas M e sM estão mais profundamente inseridas no envelope e a M interage com o nucleocapsídeo interno da partícula viral. A M possui cerca de 225 aminoácidos (\cong 23 a 36 kDa) e somente 10% estão exteriorizados fora do envelope. A glicoproteína peplomérica S, contendo 1.160 aminoácidos (\cong 174 kDa), possui duas ou três cópias de cada um dos glicopolipeptídeos em que ela pode ser clivada: S1 e S2 [apesar da discrepância numérica entre as publicações consultadas (devido à maior glicosilação da S1), contêm cerca de 535 (\cong 90 kDa) e 625 (\cong 84 kDa) aminoácidos, respectivamente] (Figura 3)

(Binns *et al.*, 1986; Collisson *et al.*, 1992; Sutou *et al.*, 1988). A clivagem ocorre em uma região rica em aminoácidos arginina (Cavanagh *et al.*, 1986). A estrutura espacial (tridimensional) do glicopolipeptídeo ou proteína S2 tem o formato de clava e penetra no envoltório lipídico da membrana, atravessando-a (Figura 3). Mais externamente e aderida à S2, está o glicopolipeptídeo ou proteína S1 em forma globular (Cavanagh, 1983; Collisson *et al.*, 1992; Holmes, 1990). O tratamento do VBIg com uréia remove apenas a proteína S1 devido ao fato de não estar ligada covalentemente à S2 (Cavanagh *et al.*, 1986; Koch *et al.*, 1990). Existe uma revisão extensa sobre a estrutura e as propriedades biológicas da espícula S (Cavanagh, 1995). Embora existam regiões imunodominantes nas três principais proteínas do VBIg, anticorpos envolvidos nos testes de neutralização viral e inibição da hemaglutinação são induzidos pela S1 (Cavanagh *et al.*, 1988; Kant *et al.*, 1992; Karaca *et al.*, 1992; Koch *et al.*, 1990; Parr & Collisson, 1993). Conseqüentemente, a S1 é responsável pela infectividade viral e expressa a hipervariabilidade intensa refletida na geração cada vez maior de sorotipos e variantes deste vírus, em contraste com a S2, que apresenta uma menor variação (três a sete vezes menos). Entretanto, a S2 possui uma importante função na manutenção da estrutura espacial da S1 (Avellaneda, 1992; Cavanagh *et al.*, 1992b; Jia *et al.*, 1995; Kusters *et al.*, 1990; McMartin, 1993) e qualquer variabilidade na S2 pode afetar a configuração estrutural da

S1, o que dificulta o reconhecimento da mesma por anticorpos específicos (Callison *et al.*, 1999). Apesar das variações nos epítomos imunogênicos da S1, existem epítomos comuns que são responsáveis pela também variável imunidade cruzada entre os diferentes isolados e sorotipos (Cavanagh *et al.*, 1997). Com relação à diferença comparativa entre as seqüências de aminoácidos das proteínas principais do VBIg, só para exemplificar, a S2 do VBIg inglês UK/6-82 difere do norte-americano M-41 em apenas 7,6% quando comparado com os 20% da S1 (Kusters *et al.*, 1990) e em 9% quanto à M (Binns *et al.*, 1986). Por sua vez, o VBIg holandês D-1466, no tocante a S2, possui diferença com outros VBIgs ingleses e norte-americanos entre 25 e 27% (Kusters *et al.*, 1990). Comparando a N de 20 isolados (norte-americanos e europeus), Williams *et al.* (1992) e Zwaagstra *et al.* (1992) encontraram apenas 5% de diferença entre eles. As diferenças na antigenicidade não necessariamente significam diferenças na patogenicidade dos isolados de VBIg. A presença da proteína S na superfície na membrana citoplasmática pode tornar as células infectadas pelo VBIg susceptíveis à citotoxicidade mediada por células T (Cavanagh *et al.*, 1997; Ignjatovic *et al.*, 1997). Existem variações nas proporções entre as concentrações de proteínas estruturais (S : N : M : sM) de diferentes VBIgs (por exemplo, no M-42 / Beaudette a relação é 1 : 11 : 10 : 2) mas ainda não existem boas explicações para estas diferenças (Lai & Cavanagh, 1997).



Figura 1 - Microscopia eletrônica do VBIG (corado negativamente com ácido fosfotúngstico - 300.000 x). Fonte: Foto original de Berry & Almeida (1968) (Hofstad, 1972).

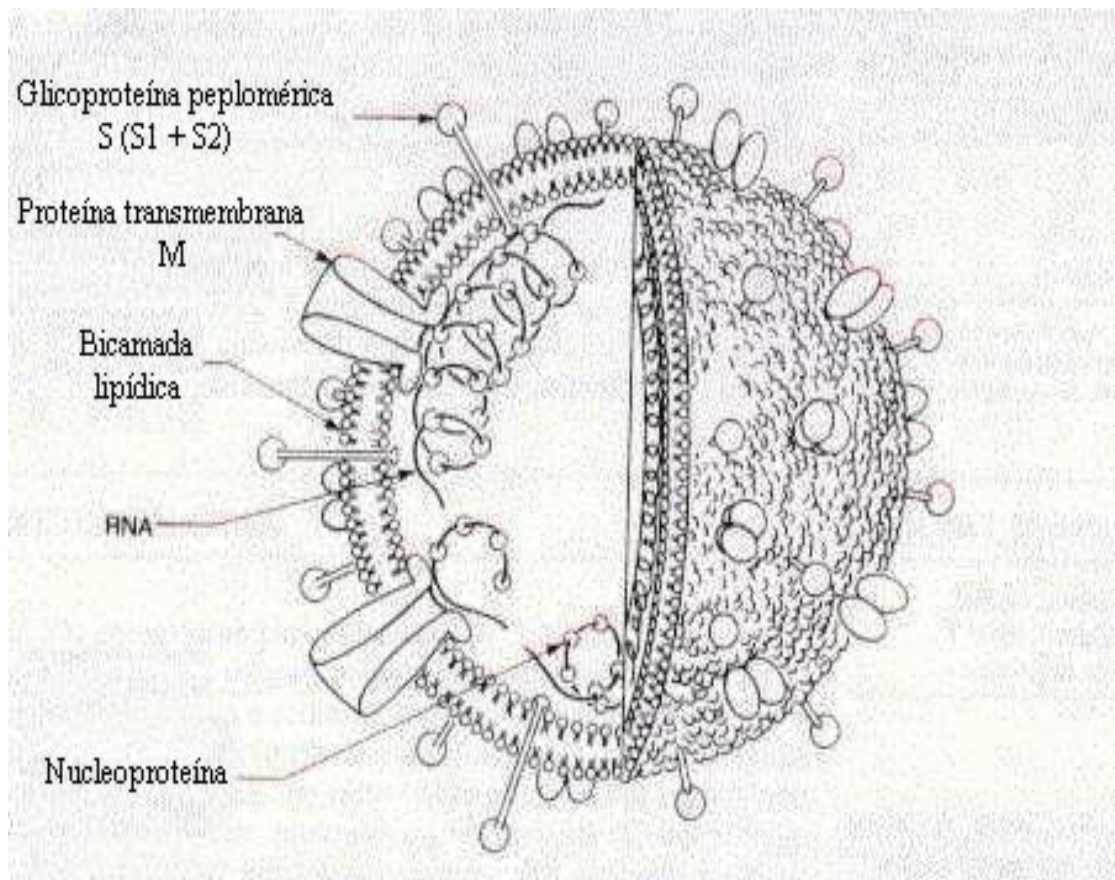


Figura 2 - Morfologia esquemática do coronavírus VBIG.
Fonte: Esquema original de Murray et al. (1992) e modificado por Abreu (2000).

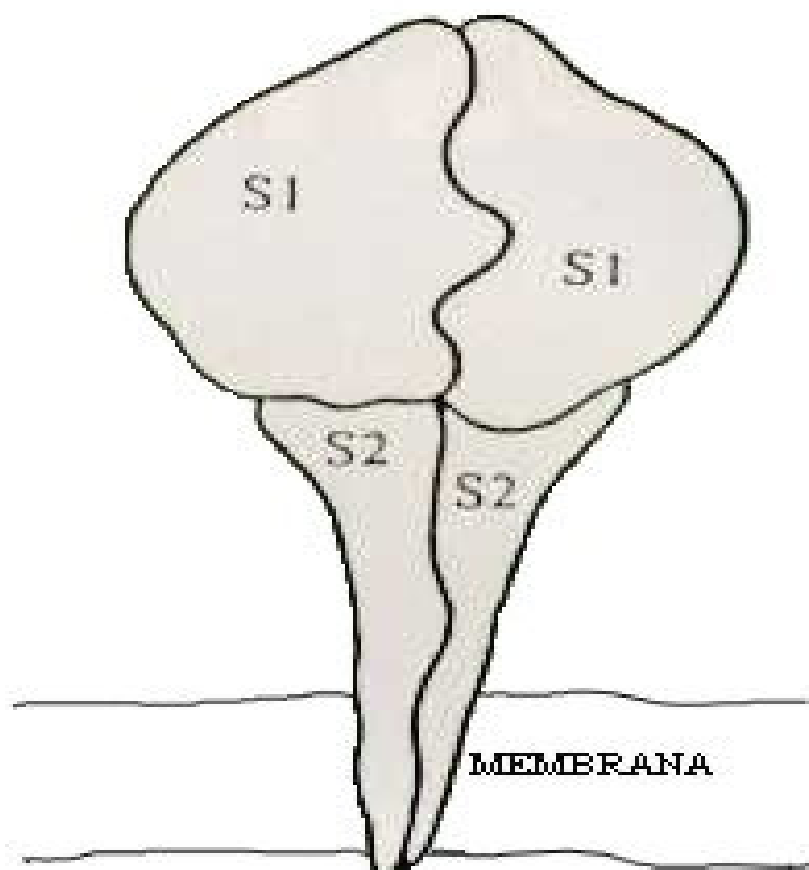


Figura 3 - Glicoproteína peplomérica S (S1 + S2) do VBIG.
Fonte: desenho original de Avellaneda (1992) e modificado para uso neste trabalho.

B - PROTEÍNAS NÃO ESTRUTURAIS (ns)

Normalmente, elas não são encontradas dentro da partícula viral e estão presentes dentro do citoplasma da célula infectada durante a replicação viral. Os genes que as codificam, excetuando o gene 1, não são essenciais para a replicação viral. A maior e mais importante é a RNA polimerase, codificada pelo gene 1. As outras são mais conhecidas pelos genes (3a, 3b, 5a e 5b) que as codificam do que pelas suas funções reais. Elas são encontradas em pequenas quantidades nas células infectadas. A capacidade natural de síntese dessas proteínas “ns” pode ter um papel importante no tropismo do VBIg por determinadas células e sistemas e, conseqüentemente, na patogenicidade viral (Lai & Cavanagh, 1997).

2.1.3.2. GENOMA

O VBIg possui genoma formado por RNA fita simples poliadenilado, não segmentado, de polaridade positiva (o genoma é um grande RNA mensageiro), com aproximadamente 27.600 nucleotídeos (\cong 27,6 kb), e foi o primeiro coronavírus a ter o RNA completamente seqüenciado (Cavanagh & Naqi, 1997; Collisson *et al.*, 1992; Schochetman *et al.*, 1977). O RNA genômico tem a função de RNA mensageiro (RNAm) e isto significa que é infectante quando introduzido em células eucarióticas susceptíveis (Lomniczi, 1977; Schochetman *et al.*, 1977; Siddell *et al.*, 1982). A organização dos RNAs [genômico ou mensageiro (RNAm) e subgenômicos (RNAm_{sg})] de vários VBIGs já foi estudada detalhadamente (Binns *et al.*, 1985; Brown & Bournnell, 1984; Brown *et al.*, 1984; Lai & Cavanagh, 1997; Stern & Sefton, 1984). Como o RNA é muito grande, na evolução do VBIg, desenvolveram-se mecanismos

especiais para corrigir possíveis erros que acontecem durante a síntese do RNA genômico. Ele contém seis genes (RNAm_{sg}) funcionais (quatro codificam proteínas estruturais), os quais ficam arranjados na seguinte ordem: 5' - polimerase (RNAm_{sg}1) - S (RNAm_{sg}2) - a, b, sM (RNAm_{sg}3) - M (RNAm_{sg}4) - a, b (RNAm_{sg}5) - N (RNAm_{sg}6) - 3' (Figura 4), com alguns genes das pequenas proteínas ns (não estruturais) localizadas entre o S, sM, M e N. O terminal 5' do RNA é capeado e inicia com uma seqüência líder (*leader*) de 65 - 98 nucleotídeos, a qual está presente, também, no terminal 5' dos RNAm_{sg}, seguida por uma região não traduzível e não codificadora (UTR5' - *untranslated region*) com 200 - 400 nucleotídeos. No terminal 3' do RNA está uma UTR de 200 - 500 nucleotídeos, denominada UTR3', seguida de uma cauda poliadenilada. O gene da RNA polimerase ocupa 2/3 do genoma total, possuindo aproximadamente 20.000 nucleotídeos ou bases (\cong 20 kb) e dois ORFs (*open reading frame* - janela aberta de leitura - denominados 1a e 1b) que se sobrepõem (Lai & Cavanagh, 1997). Os outros genes (RNAm_{sg}) possuem a seguinte quantidade aproximada de nucleotídeos: S [total \cong de 3.488 bases (b), sendo a S1 (\cong 1.720 b) e a S2 (\cong 1.768 b)], sM (\cong 216 b), M (\cong 677 b) e N (\cong 1230 b) (Lai & Cavanagh, 1997).

2.1.4. REPLICACÃO VIRAL

O VBIg liga-se aos receptores da superfície da célula susceptível através da glicoproteína S. O ciclo de replicação deste vírus ocorre inteiramente no citoplasma da célula hospedeira infectada e as funções nucleares são, até onde se sabe, desnecessárias (Lai & Cavanagh, 1997).

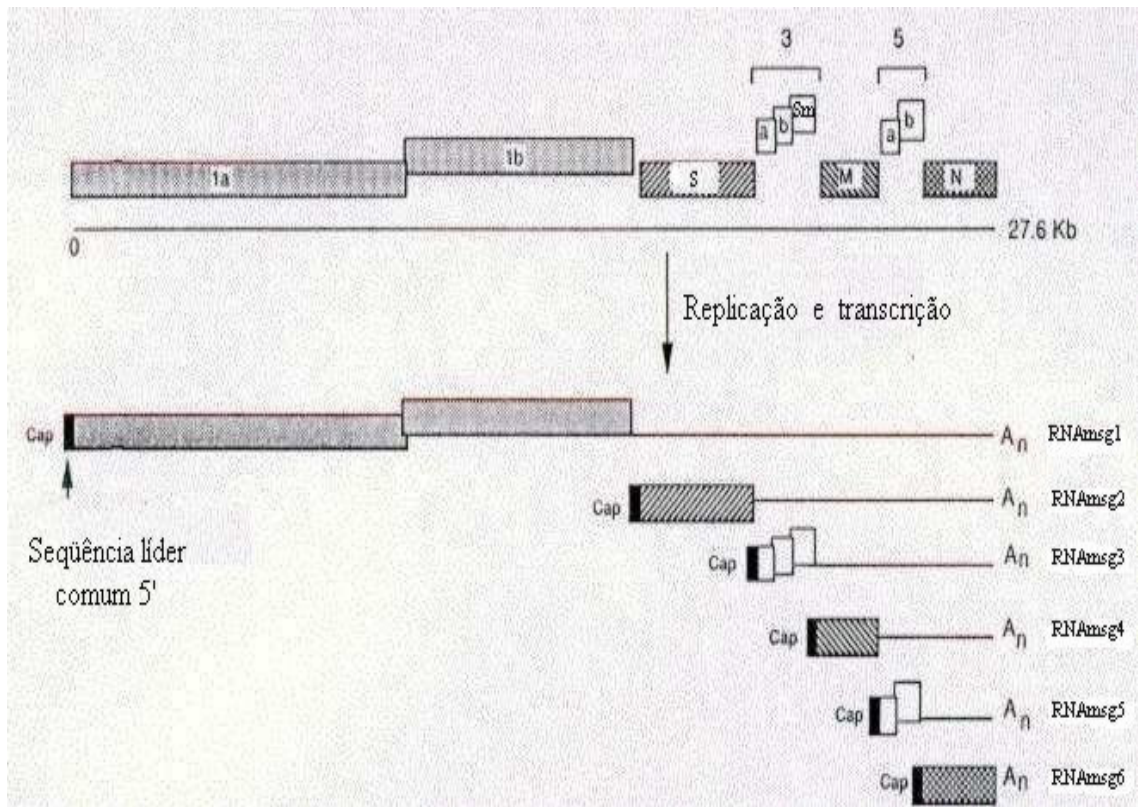


Figura 4 - Genoma do VBIg e representação do esquema de replicação viral.
 Fonte: Esquema original de Liu & Inglis (1991), modificado por Abreu (2000) e para apresentação neste trabalho.

2.1.4.1. ADSORÇÃO E PENETRAÇÃO

As partículas virais se ligam através das pontas das espículas (S) aos receptores específicos da membrana citoplasmática presentes nas células alvo, entretanto esta ligação não é suficiente para a infecção viral. Não está claro se o VBIg penetra por fusão do envelope viral com a membrana citoplasmática ou por endocitose seguida de fusão do envelope viral com a parte interna da membrana da vesícula endocítica. A infecção por este vírus pode ser inibida por droga lisossomotrópica sugerindo que a mais provável porta de entrada seja a endocitose (Li & Cavanagh, 1992).

Alguns VBIgs causam hemaglutinação ou hemadsorção, apesar de não possuírem a glicoproteína HE (hemaglutinina-esterase) presente em outros coronavírus, mas a

atividade hemaglutinante só é detectada após tratamento enzimático (neuraminidase, fosfolipase c, etc.) sugerindo que a glicoproteína S é coberta com ácido siálico (ácido A2,3-N-acetilneuramínico) (Paniago, 1994). Embora a hemaglutinação seja um bom modelo para estudo da interação vírus-célula de outros vírus, ela não reflete, necessariamente, o mecanismo de adsorção do VBIg às células alvo (Schultze *et al.*, 1992).

2.1.4.2. TRADUÇÃO PRIMÁRIA

Para todos os vírus RNA positivos, após a penetração intracitoplasmática, o primeiro evento é a ligação do RNA genômico aos ribossomos para sintetizar a enzima RNA polimerase - RNA dependente. Para o VBIg e outros coronavírus, pouco se sabe sobre este estágio de replicação. Há,

paralelamente à síntese da enzima, a codificação de um polipeptídeo não estrutural que, parece, participa da atividade biológica da enzima (Strauss & Strauss, 1983).

2.1.4.3. TRANSCRIÇÃO DA FITA NEGATIVA DE RNA

A atividade da RNA polimerase viral pode ser detectada junto à membrana citoplasmática das células infectadas em menos de uma hora após adsorção. O RNA genômico é transcrito por esta enzima para formar uma fita negativa de RNA complementar, de tamanho igual ao do RNA genômico com seqüência poli(U) no final 5'. A síntese desta fita negativa de RNA parece estar completa em uma hora após a adsorção, mas o tempo varia de acordo com o VBI (Jeong & Makino, 1992).

2.1.4.4. TRANSCRIÇÃO DA FITA POSITIVA DE RNA

A fita de RNA negativa serve como molde para síntese de um novo RNA genômico e dos RNAs mensageiros subgenômicos (RNAm_{sg}) capeados e poliadenilados (Siddell *et al.*, 1983), sendo estes RNAm_{sg} produzidos por um mecanismo de transcrição descontínuo (*leader - priming*), os quais passam a funcionar como *replicons* e podem gerar recombinantes (Lai & Cavanagh, 1997; Lai *et al.*, 1994). O mapeamento dos RNAm_{sg} e do RNA genômico mostra que estes RNAs formam um agrupamento de moléculas com o final 3' em comum. Cada RNAm_{sg} possui todas as seqüências nucleotídicas do próximo RNAm_{sg} menor mais um gene adicional no final 5'. Apenas a seqüência 5' proximal de cada RNAm_{sg} é traduzida (Siddell *et al.*, 1982).

2.1.4.5. SÍNTESE DE PROTEÍNAS ESTRUTURAIS E NÃO ESTRUTURAIS

A tradução de cada RNAm vírus específico produz apenas um polipeptídeo que é codificado no final 5' do RNAm. A proteína do nucleocapsídeo (N) e as proteínas não estruturais são aparentemente sintetizadas

em polissomos na matriz citoplasmática (Siddell, 1983).

A síntese das glicoproteínas S e M ocorre em polissomos ligados ao retículo endoplasmático rugoso (RER) e há diferenças importantes no processamento e tradução destas glicoproteínas. A glicoproteína S é inserida cotraducionalmente na membrana do RER e ocorre glicosilação na cadeia crescente de polipeptídeos. A S é transportada do complexo de Golgi para a membrana citoplasmática e cerca de dois ou três glicopolipeptídeos da S formam a espícula mas o sítio de montagem dos glicopolipeptídeos da S para formar a espícula não é conhecido. A M também é sintetizada em polissomos ligados à membrana. Nas células infectadas, a M é transportada para o complexo de Golgi, onde se acumula e não para a membrana citoplasmática (Tomley *et al.*, 1987).

2.1.4.6. MONTAGEM DA PARTÍCULA VIRAL

O nucleocapsídeo helicoidal do VBI é formado no citoplasma das células infectadas através da interação dos RNAs genômicos recém-formados e a fosfoproteína N. O nucleocapsídeo é flexível, fracamente espiralado e suas dimensões são, provavelmente, determinadas pelas propriedades de ligação da N. O brotamento das partículas virais ocorre nas membranas do complexo de Golgi e do RER. No sítio de brotamento, as fitas de nucleocapsídeos se alinham em arranjos ordenados na superfície citoplasmática destas membranas, provavelmente em áreas que possuem glicoproteínas virais. A interação do nucleocapsídeo com as membranas do RER e do complexo de Golgi provavelmente ocorre através do domínio citoplasmático da glicoproteína M. O brotamento ocorre nestas membranas intracelulares, onde a M está localizada (Sturman & Holmes, 1983). A glicoproteína S pode ser acumulada em grande quantidade na membrana citoplasmática, porém, não ocorre brotamento das partículas virais nestes sítios, provavelmente porque a M está

ausente. Partículas virais com nucleocapsídeo são liberadas no lúmen do RER e do complexo de Golgi. Após a passagem da partícula viral pelo complexo de Golgi, estas são transportadas em vesículas que migram para a periferia da célula. Estas vesículas fundem com a membrana citoplasmática e liberam numerosas partículas virais. Os mecanismos de interação entre as proteínas estruturais virais e as outras que integram as diversas organelas intracelulares para a formação da partícula viral completa continuam desconhecidos. Após serem liberadas das células infectadas, o que pode iniciar 3-4 horas após infecção, muitas partículas virais adsorvem à membrana citoplasmática e, nesta localização, podem estimular o sistema imune. Esta característica dos coronavírus de serem liberados das células sem causarem lise celular é um fator que permitiria a infecção persistente (Oshiro, 1973), porém, para o VBIg, esta situação só está comprovada com alguns isolados nefrotrópicos (Chong & Apostolov, 1982) e enterotrópicos (Dhinakar Raj & Jones, 1997). Por célula e com uma pequena variação inter-VBIgs, o pico máximo de produção de novas partículas víricas infectantes geralmente é atingido cerca de 12 horas após infecção (Cavanagh & Naqi, 1997).

2.2. GENÉTICA DO VBIg

Provavelmente devido ao grande genoma, o VBIg desenvolveu uma grande variedade de mecanismos genéticos, dentre os quais estão a recombinação do RNA, a geração de RNA interferente defectivo e as mutações, visando manter sua estabilidade genética e gerando produtos com grande diversidade antigênica superficial, o que permite contornar as defesas do hospedeiro (Lai & Cavanagh, 1997). Por tais situações, já comprovadas, pode-se afirmar que cada isolado de surtos clínicos de campo possui uma natureza genética própria, apesar de haver muita similaridade em alguns genes entre as diversas estirpes (Jia *et al.*, 1995).

2.2.1. VARIANTES

2.2.1.1. MUTAÇÃO DO RNA

Os VBIgs que se enquadram nesta categoria de variantes têm sido detectados com um teste de neutralização que utiliza anticorpos monoclonais dirigidos contra epítomos da estrutura espacial (glicopolipeptídeo) da S1 (Cavanagh *et al.*, 1995) ou a técnica de RT-PCR com análise por RFLP do gene codificador da S1 (Kwon *et al.*, 1993a,b). Estes mutantes mantêm algumas propriedades dos VBIgs originais mas podem ter patogenicidades diferenciadas devido aos tropismos celulares alterados. O VBIg norte-americano CU-T2, originalmente classificado como pertencente ao sorotipo Arkansas, sofreu mutações de ponto no gene S1, passando a exibir, também, epítomos do sorotipo Massachusetts na S1 (Jia *et al.*, 1995). Deleções e substituições (inserções) ocorrem com frequência quando passagens seriadas do VBIg são feitas em ovos embrionados de galinha, cultivos celulares e de tecido, onde as pressões negativas de seleção estão ausentes (Wang *et al.*, 1993). As deleções e/ou inserções ocorrem, mais frequentemente, dentro da região hipervariável genômica codificadora do S1 (Kusters *et al.*, 1990). Conseqüentemente, naqueles VBIgs que sofreram deleções e inserções, antigenicidade (Kusters *et al.*, 1990) e patogenicidade poderão ficar alteradas (Lai & Cavanagh, 1997).

2.2.1.2. RECOMBINAÇÃO DO RNA

Existem dois tipos de recombinação do RNA viral: homóloga, considerada a mais freqüente, a qual ocorre entre diferentes estirpes do mesmo vírus, por exemplo, o VBIg, e a heteróloga, entre diferentes gêneros e até famílias de vírus contendo RNA, como, comprovadamente, ocorreu com o gene HE, codificador da glicoproteína de superfície (hemaglutinina - esterase), cuja seqüência de nucleotídeos é idêntica entre o vírus da influenza C e os coronavírus da hepatite murina e dos bovinos (Lai & Cavanagh, 1997). O VBIg possui a habilidade de sofrer

recombinações no RNA com alta frequência, tanto em infecções naturais (Lai, 1992) como experimentais em ovos embrionados de galinha (Kotier *et al.*, 1995). Análises das seqüências gênicas de isolados de surtos da BIG geraram evidências convincentes de que alguns deles são recombinantes de VBIGs conhecidos diferentes. Os sítios de recombinação têm sido detectados na metade 5' do gene S e no terminal 3' do RNA viral (Cavanagh & Davis, 1992; Jia *et al.*, 1995; Wang *et al.*, 1994). Estudos moleculares com vários VBIGs europeus indicaram que a região do gene S2, quando comparada com o gene S1, possui um grande potencial para recombinação devido, em parte, à presença de seqüências de nucleotídeos altamente homólogas (conservadas), principalmente nos VBIGs pertencentes ao mesmo sorotipo e genotipo (Cavanagh *et al.*, 1992a; Gelb *et al.*, 1991; Kusters *et al.*, 1990). O VBIG variante norte-americano CU-T2 sofreu, na natureza, recombinação nos genes S1, S2 e N. É considerado, então, um variante por possuir cerca de 90% das seqüências de nucleotídeos do gene S1, 60% do gene S2 e 50% do gene N idênticos aos do VBIG Ark-99, e, 50% do gene N idêntico ao do VBIG H-52 (Jia *et al.*, 1995). Por sua vez, os 40% restantes do gene S2 pertencem a um VBIG desconhecido. Os VBIGs Ark-99 e H-52 têm sido utilizados, simultaneamente, como vacinas vivas atenuadas nos EUA, podendo, portanto, estar contribuindo para a emergência de variantes no campo, conforme comprovado em estudos visando detectar eventos de recombinações e mutações entre diferentes VBIGs (Jia *et al.*, 1995). O fenômeno da recombinação pode, potencialmente, providenciar, também, um mecanismo genético através do qual os coronavírus mantêm íntegra sua grande seqüência de nucleotídeos do RNA. Devido ao tamanho do RNA viral, é presumível que contenha uma alta frequência de mutações induzidas por erros da RNA polimerase e a recombinação pode ser um mecanismo de reparação providencial (Lai, 1992). A recombinação é, portanto, uma estratégia evolucionária natural do VBIG e de outros coronavírus (Lai & Cavanagh, 1997).

2.2.2. RNAs INTERFERENTES DEFECTIVOS (DI - RNAs) E RNAmSg

Os DI-RNAs, oriundos de uma situação típica de mutação por deleção (item 3.2.1), são aqui destacados devido à sua importância e que deve ser lembrada quando da produção de vacinas (processo de atenuação). As partículas que os contém, são produzidas quando os coronavírus são passados seriadamente e adaptados a sistemas artificiais para replicação (no caso do VBIG: ovos embrionados de galinha e, provavelmente, cultivo de células renais de embriões de galinha - Péntzes *et al.*, 1994; Péntzes *et al.*, 1996). A geração dos DI-RNAs ocorre, provavelmente, devido a um erro de leitura da RNA polimerase ou à recombinação entre RNAs não homólogos durante uma infecção e replicação maciças. Eles são estáveis e infecciosos, considerando que são incorporados ao vírion durante a montagem da partícula viral (envelopamento). Nos sistemas artificiais, as partículas contendo DI-RNAs e RNAmSg têm vantagens seletivas e replicativas imensas sobre as partículas consideradas normais. Esta situação pode ter implicações importantes na produção de vacinas convencionais e, também, no estudo de isolados em sistemas artificiais e, conseqüentemente, adaptados e modificados durante a replicação (Lai & Cavanagh, 1997). Um exemplo bem estudado é o mutante VBIG DI-RNA CD91 que ocorre naturalmente no VBIG M-42 ou Beaudette. Os RNAmSg podem contribuir para a criação de novas variantes por servirem como molde para a RNA polimerase tanto quanto o RNA genômico. Podem ser incorporados nas partículas virais na proporção de um vírion com DI-RNA para cada dez completos do M-42 / Beaudette e, no caso dos RNAmSg, seria de um para cada três para o mesmo VBIG. Com o VBIG M-41, ambas situações ocorrem, mas na proporção de 1:20 (Dalton *et al.*, 1998; Kim *et al.*, 1998; Péntzes *et al.*, 1994; Stirrups *et al.*, 1998).

2.3. A DOENÇA

A interação entre o vírus e o hospedeiro é um dos mais importantes temas da virologia moderna, a começar pelos eventos iniciais da replicação viral na célula infectada, que começam com os receptores celulares que influem diretamente no tropismo celular (Lai & Cavanagh, 1997).

Somente a galinha (*Gallus gallus domesticus*), independente da idade, sexo e linhagem, é naturalmente infectada e sofre doença induzida pelo VBI. Os pintinhos geralmente apresentam sinais de doença respiratória mais grave, seguida de mortalidade elevada induzida pela asfixia com tampões de muco nos brônquios primários na região adjacente a siringe e traquéia. Com o aumento da idade, as galinhas tornam-se mais resistentes aos efeitos provocados pela infecção (Cavanagh & Naqi, 1997).

A BIG é considerada, primariamente, uma doença do sistema respiratório, mas, conforme comprovado em um grande número de trabalhos científicos, muitos VBIGs apresentam tropismos variáveis para diferentes órgãos e sistemas (Dhinakar Raj & Jones, 1997). Alguns destes deles, além de um envolvimento discreto do sistema respiratório, muitas vezes assintomático, apresentam tropismo exacerbado para os rins (Cumming, 1963; Butcher *et al.*, 1990) ou para o oviduto (Cook & Huggins, 1986; McDougall, 1968; Sevoian & Levine, 1957) com sérias conseqüências à saúde da galinha. Outros possuem tropismo para o sistema digestivo, com especial destaque para os intestinos, mas, aparentemente, sem induzir alterações patológicas significantes (Bhattacharjee & Jones, 1997; Darbyshire *et al.*, 1976; Dhinakar Raj & Jones, 1996; Lucio & Fabricant, 1990). Miopatia bilateral dos músculos peitorais (profundos e superficiais) de frango de corte, muitas vezes apresentando edema gelatinoso e hemorragias, tem sido associada a um novo VBIG variante e, neste caso, a etiopatogenia ainda precisa ser melhor estudada (Gough *et al.*, 1992; Dhinakar Raj & Jones, 1997). A patogenicidade de um VBIG é variável e

independente para os vários sistemas e órgãos para os quais possui tropismo (Ratanasethakul & Cumming, 1983). O nome “bronquite infecciosa”, apesar da variabilidade de tropismos, lesões e sinais clínicos induzidos por este vírus, tem sido mantido para evitar confusões (Dhinakar Raj & Jones, 1997).

Muitos fatores intrínsecos (idade e linhagem) e extrínsecos (nutrição, ambiente e infecções paralelas e sinérgicas) influenciam na patogênese da BIG, além das características inerentes ao(s) isolado(s) envolvido(s) (Dhinakar Raj & Jones, 1997). Todas as idades são susceptíveis à infecção, porém, a doença é mais grave em pintos e franginhos (Animas *et al.*, 1994). Com o aumento da idade, diminui a mortalidade induzida pelo VBI (Smith *et al.*, 1985) e aumentam as lesões renais (Albassam *et al.*, 1986) e de oviduto (Crinion & Hofstad, 1972). Todas as linhagens de galinhas também são susceptíveis à infecção, mas, por exemplo, embora as linhagens leves sejam mais susceptíveis do que as pesadas no tocante à infecção por VBIGs nefrotropicos (Cumming & Chubb, 1988), a mortalidade induzida por elas é maior nas linhagens pesadas (Ignjatovic, 1988; Zanella, 1988). Os machos de linhagens pesadas têm duas vezes mais complicações renais do que as fêmeas (Cumming, 1969), mas o comprometimento direto do sistema reprodutor ainda não está comprovado. Com relação à nutrição, lotes submetidos a dietas ricas em proteínas, especialmente de origem animal, apresentam mortalidade mais elevada quando são infectados com VBIGs nefrotropicos (Cumming & Chubb, 1988), o mesmo acontecendo em dietas ricas em cálcio devido ao bloqueio renal por urolitíase (Glahn *et al.*, 1989). Quando lotes sofrem infecção pelo VBI e são portadores de *Mycoplasma gallisepticum* e/ou *Escherichia coli*, exibirão sinais clínicos respiratórios mais graves (coriza, lacrimação, sinusite, ronqueira devido a traqueíte, bronquite, pneumonia e aerossaculite) e complicados (peritonite, perihepatite, pericardite e salpingite), muitas vezes crônicos, além de aumentarem a mortalidade, condenação em abatedouros,

queda de postura e alterações na qualidade interna (clara líquida) e externa (cor, formato e resistência da casca) dos ovos, decorrentes da interação sinérgica entre estes agentes (Cavanagh & Naqi, 1997; Dhinakar Raj & Jones, 1997). Usando este modelo de infecção sinérgica potenciadora, diversos trabalhos descrevem diferenças na virulência de isolados do VBIg e na susceptibilidade de linhagens genéticas de galinhas (Avellaneda *et al.*, 1994; Cubillos *et al.*, 1991; Dhinakar Raj & Jones, 1997). A interação entre o VBIg e outros vírus que infectam os diversos sistemas [respiratório (vírus da doença de Newcastle, da laringotraqueíte infecciosa, da pneumovirose aviária e adenovírus), reprodutor (ídem vírus do sistema respiratório), renal (ídem vírus do sistema respiratório, acrescido do vírus da doença de Gumboro), digestivo (ídem todos vírus já mencionados, acrescidos de enterovírus, reovírus e rotavírus) e imunitário (vírus da doença de Gumboro e vírus da anemia das galinhas)] está razoavelmente estudada em poucos casos, mesmo assim sem esclarecer se há um real sinergismo entre os diferentes vírus. Evidências experimentais demonstram que o vírus da doença de Newcastle não interfere na infecção do VBIg, embora o VBIg (mesmo vacinal) agrave a mortalidade induzida pelo vírus da laringotraqueíte infecciosa e, com relação ao vírus da doença de Gumboro (VDG), o problema está relacionado com a imunossupressão / imunodepressão induzida pelo VDG em infecção precoce ou anterior à do VBIg (Dhinakar Raj & Jones, 1997; Nakamura *et al.*, 1996; Rosenberger & Gelb, 1987).

Todos os aspectos considerados importantes e que favorecem o aparecimento da doença, a imunidade (ativa e passiva), assim como a doença em si, incluindo transmissão, período de incubação, sinais clínicos, achados (macro e microscópicos) relacionados com o VBIg, além de sua prevenção e seu controle, estão descritos, detalhadamente, em vários

trabalhos, revisões e capítulos de livros (Albassam *et al.*, 1986; Andrade *et al.*, 1983; Bumstead *et al.*, 1989; Cavanagh & Naqi, 1997; Cook *et al.*, 1986; Cook *et al.*, 1992; Cowen *et al.*, 1987; Crinion & Hofstad, 1972; Dhinakar Raj & Jones, 1997; Hofstad & Yoder, 1966; Mockett *et al.*, 1987; Otsuki *et al.*, 1990; Siller, 1981).

Desde a confirmação da presença do VBIg no Brasil (Hipólito, 1957), e tomando por base informações divulgadas em relatórios oficiais anuais das últimas duas décadas, principalmente do Ministério da Agricultura, os quais agrupam resultados virológicos de laboratórios (particulares credenciados e oficiais federais e estaduais) que realizam diagnósticos de doenças das aves, este vírus é isolado com frequência a partir de surtos da BIG nos diversos segmentos da avicultura industrial brasileira (Villa, 1998). Vários estudos contribuíram para aumentar o conhecimento a respeito de isolados no Brasil, além de comprovar a permanência e a importância do VBIg em nosso meio (Abreu, 2000; Di Fábio, 1993; Epiphanyo, 1998; Hipólito *et al.*, 1979; Ikuta, 1999; Jorge *et al.*, 1992; Lunge *et al.*, 1998; Martins *et al.*, 1996; Paniago, 1994; Resende *et al.*, 1989; Resende *et al.*, 1998; Santiago *et al.*, 2000; Silva, 1989; Silveira & Marques, 1995; Souza, 1999; Souza, 2000; Wentz, 1992).

A importância econômica decorrente do impacto da ocorrência do VBIg na avicultura industrial norte-americana e, por extensão, mundial, pode ser estimada pela análise dos relatórios anuais da Associação Americana de Patologistas Aviários (sigla, em inglês, é AAAP), nos quais, persistentemente, o VBIg tem sido o mais freqüente agente infeccioso de etiologia vírica isolado a partir de frangos e poedeiras (Cavanagh & Naqi, 1997; Collisson *et al.*, 1992).

Os principais eventos relacionados com a BIG e o VBIg no mundo (incluindo o Brasil) estão agrupados na Tabela 1.

Tabela 1 - Principais eventos relacionados com a BIG e o VBIG no mundo.*

Anos	Eventos
1930-31	- Primeira descrição clínica da BIG (EUA)
1936	- Estabelecimento da etiologia vírica (EUA)
1937	- Primeiro isolamento em ovo embrionado de galinha (VBIG Beaudette ou USA/M-42/37, EUA)
1941	- Isolamento do VBIG USA/M-41/41 (protótipo do sorotipo Massachusetts)
1946	- Estudo sobre sensibilidade química (desinfetantes e detergentes) (EUA)
1947	- Comprovação da transmissão aérea (EUA)
1948	- Primeiro isolamento na Inglaterra
1950	- Primeira descrição dos problemas reprodutivos (queda de postura & postura de ovos anormais) (EUA)
1951	- Isolamento do VBIG USA/A-5968/51 ou C-46 (protótipo do sorotipo Connecticut) (EUA)
1952-56	- Implantação de vacinas vivas atenuadas no controle (EUA)
1954	- Isolamento do primeiro VBIG nefrotrópico (USA/Holte/54 - EUA)
1952-55	- Primeiros isolamentos no Japão e na Holanda (VBIG NL/H/55, usado como vacina, após atenuação)
1956-58	- Primeira tipificação sorológica (vírusneutralização) em larga escala - EUA (detecção de dois novos VBIGs e protótipos de sorotipos: USA/Iowa-97/52 e USA/Iowa-609/53)
1957	- Primeiro isolamento no Brasil (Prof. Osmane Hipólito, Escola de Veterinária, UREM, hoje UFMG)
1957	- Primeiro uso do teste de fixação de complemento no diagnóstico sorológico (EUA)
1959	- Primeiro uso do teste de imunodifusão no diagnóstico sorológico (Alemanha)
1960-64	- Isolamento de novos VBIGs nefrotrópicos (EUA: USA/Gray/60 & Austrália: A/1-62/62 ou "T")
1963	- Confirmação do genoma RNA (EUA)
1964	- Isolamento do VBIG USA/JMK/64 (EUA)
1965	- Primeiro uso do teste de imunofluorescência para detecção direta durante infecção (EUA)
1967	- Isolamento do VBIG USA/SE-17/67 (EUA)
1968	- Utilização de vacinas comerciais inativadas no controle (Inglaterra)
1972	- Isolamento do VBIG USA/Ark-99/72 (EUA)
1973	- Isolamento do primeiro VBIG nefrotrópico brasileiro (Prof. Osmane Hipólito - USP)
1976	- Padronização do teste de neutralização em cultivo de anéis de traquéia (Inglaterra)
1978-79	- Isolamento dos variantes NL/D-1466/78, NL/D-207/79 e NL/D-274/79 (Holanda)
1980	- Autorização oficial da vacinação no Brasil (sorotipo Massachusetts - VBIG "Holland" atenuado)
1981	- Primeiro uso do teste de ELISA no diagnóstico sorológico (Inglaterra)
1982	- Isolamento do variante UK/6-82/82 (Inglaterra)
1981-85	- Isolamento de VBIGs enterotrópicos (Inglaterra / Marrocos)
1986	- Isolamento do variante nefrotrópico B/B-1648/86 (Bélgica)
1981-88	- Seqüenciamento genoma: USA/M-41/41, USA/M-42/37 (Beaudette), UK/6-82/82 e J/KB-8523/83
1989-90	- Primeiros estudos filogenéticos (Holanda)
1991	- Uso da técnica de RT-PCR / RFLP (genes: S2, M e N) no diagnóstico / genotipificação (Japão / EUA)
1992-93	- Uso da técnica de RT-PCR / RFLP (genes: N e S1) no diagnóstico / genotipificação (Holanda / EUA)
1994	- Isolamento do variante recombinante USA/CU-T2/94 (EUA)

* - Fonte: Cavanagh & Naqi, 1997; Collisson *et al.*, 1992; Hipólito, 1957; Hipólito, 1973; Hofstad, 1958; Hofstad, 1961; Hofstad, 1984; Hopkins, 1969; Jia *et al.*, 1995; Johnson *et al.*, 1973; Kusters *et al.*, 1990; McMartin, 1968; Mockett & Darbyshire, 1981; Wang & Tsai, 1996; Villa, 1998.

- Observação: Identificação individual ⇒ País de origem (USA= United States of America - EUA; UK= United Kingdom - Reino Unido; NL= The Netherlands - Holanda ou Países Baixos; B= Belgium - Bélgica; J= Japan - Japão) / sigla ou número do VBIG / ano do isolamento do VBIG e, também, na maioria dos casos, de ocorrência do surto correspondente (exceção: o USA/A-5968/51, também é denominado C-46, devido ao ano de ocorrência do surto - 1946, mas o ano de isolamento foi posterior. O mesmo parece ter ocorrido com o Iowa-609 e o Iowa-97).

2.4. DIAGNÓSTICO

Independentemente dos sistemas afetados, os sinais clínicos desencadeados e as lesões macro e microscópicas não são patognomônicos de uma infecção pelo VBI, sendo necessárias outras providências, posteriores aos exames clínico e anatomopatológico, para confirmação de seu envolvimento (Dhinakar Raj & Jones, 1997). O diagnóstico é baseado na presença ou na elevação dos títulos de anticorpos anti-VBIG ou, preferencialmente, na detecção direta do VBI, seja por detecção antigênica direta intracelular (baseada em vários testes que utilizam anticorpos policlonais ou monoclonais anti-VBIG marcados com uma substância reveladora), pelo isolamento viral ou pela detecção por amplificação, seguida de caracterização genômica - RT-PCR / RFLP (Cavanagh & Naqi, 1997; Dhinakar Raj & Jones, 1997).

2.4.1. SOROLOGIA

Diversos testes sorológicos são rotineiramente usados para monitorar resposta vacinal anti-VBIG e detectar o aparecimento ou aumento nos títulos de anticorpos anti-VBIG após infecções naturais ou experimentais. A possibilidade da presença de múltiplos sorotipos e a variação antigênica verificada em diversos isolados estudados coloca uma complexidade adicional séria na seleção de método sorológico apropriado e na análise dos resultados dos testes. Anticorpos produzidos contra os antígenos do VBI presentes em todos os isolados, são chamados específicos de grupo, e, os contra o glicopolipeptídeo S1, são denominados específicos de tipo (Cavanagh & Naqi, 1997). Os testes convencionais de ELISA (sigla, em inglês, de *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*), imunofluorescência e imunodifusão detectam anticorpos tanto direcionados para os antígenos comuns (de grupo) como os específicos (de tipo) e, por causa desta característica de ligação ampla, não servem para identificação dos diferentes VBIs. Os testes de vírusneutralização (VN) e inibição da

hemaglutinação (IH), no que diz respeito às reatividades grupo/tipo específicas, não são muito melhores do que os três testes mencionados anteriormente. A especificidade destes testes depende, no caso do hipervariável VBI, diretamente da forma de produção e purificação dos antígenos empregados nos mesmos, mas sempre haverá alguma reatividade cruzada (Cavanagh & Naqi, 1997; Martins, 1990).

A sorologia de rotina para o VBI é, usualmente, feita com VN, IH ou ELISA, individualmente ou associados. Os testes de VN (soro constante e vírus diluído ou soro diluído e vírus constante) podem ser conduzidos utilizando ovos embrionados de galinha SPF (OEG/SPF) [(*Specific Pathogen Free* - livres de patógenos especificados) (Cunningham, 1973; Villegas, 1985)], cultivo de anéis de traquéia (CAT) de embriões de galinha obtidos de OEG/SPF com 19 dias de incubação ou de pintos SPF (Cook *et al.*, 1976; Darbyshire *et al.*, 1979) ou cultivo primário de células de rim de embriões ou pintos SPF (Hopkins, 1974). Diferentes procedimentos para realização do teste de IH são utilizados, incluindo o tratamento químico a que o VBI tem que ser submetido (King, 1988; Schultze *et al.*, 1992). Preferencialmente, após vacinação, a sorologia para o VBI com os testes de VN ou IH deve ser conduzida com antígenos homólogos àqueles presentes na vacina utilizada (Cavanagh & Naqi, 1997).

O teste de ELISA é largamente utilizado na sorologia e vários *kits* comerciais estão disponíveis. A resposta de anticorpos pode ser detectada mais precocemente pelo ELISA do que pelo teste de VN (Marquardt *et al.*, 1981). Os procedimentos para a realização do teste de imunofluorescência podem ser diretos e indiretos (Chubb, 1986; Csermelyi *et al.*, 1988). Os anticorpos detectados pelo teste de imunodifusão aparecem de uma forma flutuante e inconstante, levando a resultados variáveis (Gough & Alexander, 1978). Um teste de ELISA de bloqueio empregando anticorpos monoclonais para diagnóstico sorológico específico foi desenvolvido para os sorotipos Massachusetts e Arkansas e

apresentou especificidade semelhante ao VN em teste comparativo (Karaca & Naqi, 1993). Na avicultura industrial, a alta especificidade dos testes sorológicos é mais importante do que a sensibilidade, mas deve-se considerar que a baixa sensibilidade pode ser compensada pela sorologia de grande número de soros individuais que podem facilmente ser obtidos no mesmo plantel (De Wit *et al.*, 1997; De Wit, 2000).

2.4.2. ISOLAMENTO, IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO VBI

2.4.2.1. ISOLAMENTO

Por ser o primeiro e mais freqüente dos sistemas - alvo, o sistema respiratório é o principal sítio de coleta e fornecimento de amostras (traquéia, pulmões e sacos aéreos) para isolamento do VBI (Dhinakar Raj & Jones, 1997). As tonsilas cecais, coletadas durante exame *postmortem*, entretanto, podem ter um grande significado quando a doença já se instalou há mais de uma semana no lote, porque o VBI geralmente desaparece do sistema respiratório antes do sistema digestivo (Cavanagh & Naqi, 1997). Dependendo do histórico clínico da doença, amostras dos rins e oviduto deverão ser coletadas, adicionalmente. Embora seja aparentemente uma tarefa fácil, a seleção de amostras para estudo em um grande lote é dificultada, principalmente quando a doença já saiu da fase aguda e apresenta alterações mais crônicas devido ao envolvimento de outros agentes, principalmente bacterianos, os quais estendem as lesões a sistemas para os quais o VBI normalmente não possui tropismo (Cavanagh & Naqi, 1997; Dhinakar Raj & Jones, 1997; Resende *et al.*, 1989). Nestes casos e com esta finalidade, o uso de galinhas sentinelas SPF (dentro ou ao lado do galpão), durante o período de uma semana de exposição por contato, pode levar a resultados mais satisfatórios do que a coleta de amostras (órgãos e tecidos) diretamente no lote problema (Gelb *et al.*, 1987). Os procedimentos para coleta, remessa e processamento laboratorial de amostras para isolamento do VBI

encontram-se descritos em detalhes (Gelb, 1989).

Visando o isolamento viral, os materiais processados, geralmente trabalhados em *pool* por sistemas (respiratório, renal, reprodutor ou digestivo), são inoculados em OEG/SPF (9-10 dias de incubação – via cavidade alantóidea) ou CAT ou, também, pintos SPF instalados em um ambiente altamente controlado (isoladores). A parte fluida desses sistemas de cultivo (líquido alantóideo de OEG/SPF ou sobrenadante de CAT) deverá ser coletada 48-72 horas após inoculação para que novas passagens sejam realizadas nos sistemas homólogos e, no mínimo, cinco passagens consecutivas deverão ser realizadas antes do material ser considerado negativo. O critério inicial de positividade para o VBI é baseado no aparecimento de alterações macroscópicas dos embriões infectados (nanismo e enrolamento do embrião e urolitíase nos mesonefros), situação que aparece a partir do sexto dia após inoculação em OEG/SPF, ou na detecção de ciliostase e/ou destruição do epitélio ciliado estratificado da mucosa traqueal no CAT ou na traquéia de pintos SPF após exposição (Cavanagh & Naqi, 1997; Dhinakar Raj & Jones, 1997; Epiphany, 1998; Paniago, 1994; Resende *et al.*, 1989). A partir dos materiais processados originais ou dos fluidos dos sistemas de cultivo primário, suspeitos de conterem o VBI, pintos SPF susceptíveis, adequadamente alojados dentro de isoladores, podem ser inoculados (exposição nasal, ocular ou intratraqueal) para reprodução rápida do quadro respiratório, o que geralmente ocorre entre 18 e 36 horas se o VBI estiver presente. Três a quatro semanas após inoculação, os soros destas aves podem ser estudados em estudos comparativos cruzados de neutralização viral que podem ajudar na tipificação sorológica do isolado (Cavanagh & Naqi, 1997; Resende *et al.*, 1989). Os isolados obtidos em sistemas de cultivo devem ser confirmados como sendo VBI por microscopia eletrônica ou por um dos outros procedimentos descritos a seguir.

2.4.2.2. IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO

A – MÉTODOS QUE UTILIZAM ANTICORPOS

Cortes histológicos ou esfregaços de mucosa de traquéia e outros tecidos obtidos de galinhas infectadas com VBIg podem ser examinados por testes de imunofluorescência ou imunoperoxidase (Chubb, 1986; Gelb, 1989; Hawkes *et al.*, 1983; Naqi, 1990; Resende *et al.*, 1989; Yagyu & Ohta, 1990). Igual procedimento pode ser realizado em embriões e outras partes acessórias (membrana cório-alantóidea) de OEG/SPF e em CAT ou pintos SPF infectados com o VBIg (Cavanagh & Naqi, 1997). O VBIg, presente em líquido alantóideo ou em sobrenadante de cultivo celular (células renais de embriões de OEG/SPF ou pintos SPF) ou CAT ou em diversos órgãos/sistemas alvo de pintos SPF após exposição, também pode ser detectado e identificado, inclusive tipificado dentro de um determinado sorotipo, por teste de ELISA utilizando anticorpos monoclonais (Kant *et al.*, 1992; Karaca *et al.*, 1992; Koch *et al.*, 1990; Naqi *et al.*, 1993).

A tipificação sorológica tradicional de isolados do VBIg a partir de surtos ocorridos em lotes de galinhas, previamente vacinados contra o VBIg ou não, é baseada em testes de neutralização cruzada, os quais geralmente utilizam os mesmos sistemas de replicação viral empregados no isolamento e necessitam de uma grande quantidade de soros imunes policlonais mono-específicos anti-estirpes de referência representantes de cada sorotipo conhecido (Cavanagh & Naqi, 1997).

B – MÉTODOS QUE UTILIZAM ÁCIDO NUCLÉICO

A detecção seguida de classificação, tipificação ou agrupamento de isolados do VBIg, pode ser feita *in vitro* pela técnica de RT-PCR / RFLP, resumidamente chamada de tipificação genômica ou genotipificação, dispensando as demoradas e laboriosas técnicas tradicionais de neutralização viral em OEG/SPF com soros imunes de referência sorotipo-específicos (Adzhar *et*

al., 1996; Jackwood *et al.*, 1997; Kwon *et al.*, 1993a,b; Lin *et al.*, 1991a,b; Song *et al.*, 1998; Zwaagstra *et al.*, 1992). O RNA viral pode ser extraído de poucos microlitros do líquido alantóideo de OEG/SPF inoculado com o VBIg, convertido a cDNA (DNA complementar) e amplificado pela RT-PCR (Cavanagh & Naqi, 1997; Kwon *et al.*, 1993a,b; Lin *et al.*, 1991a,b). A análise do(s) produto(s) da RT-PCR / RFLP vem substituindo os métodos tradicionais e consagrados de classificação sorológica, principalmente, pela rapidez e confiabilidade dos resultados (altíssimas sensibilidade e especificidade), permitindo, a um só tempo, confirmar que se trata do VBIg e classificá-lo em genotipo, o que, dependendo do gene estudado, pode ter uma correlação direta de similaridade com o sorotipo obtido no teste sorológico de neutralização cruzada tradicional (Adzhar *et al.*, 1996; Kwon *et al.*, 1993a,b; Lin *et al.*, 1991a,b; Song *et al.*, 1998).

Após a transformação do RNA em DNA pela enzima transcriptase reversa (RT), pode-se realizar a técnica de PCR, durante a qual um único DNA ou, na maioria das vezes, parte dele, mesmo em concentrações muito baixas, serve como molde para vários ciclos de replicação *in vitro* (a cada ciclo, teoricamente, a quantidade de DNA duplica), desde que sejam acrescentados oligonucleotídeos iniciadores à mistura em reação nas condições otimizadas (enzima *Taq* DNA polimerase, nucleotídeos, etc.). Tais iniciadores são seqüências curtas de DNA (geralmente com 18-30 nucleotídeos) complementares às cadeias do DNA-molde, que se ligam a este, formando híbridos e limitando as extremidades 5' e 3' a serem amplificadas. Como a *Taq* DNA polimerase só replica o DNA a partir do sítio onde ocorreu a hibridização, é possível replicar muitas vezes apenas as regiões do DNA-molde delimitadas pelos oligonucleotídeos iniciadores. Isso garante a especificidade: mesmo que existam DNAs diferentes (celulares ou de outros vírus, por exemplo) na mistura em amplificação, só o DNA flanqueado pelos oligos é amplificado. Como os ciclos de replicação ou amplificação exigem etapas em altas temperaturas, a *Taq* DNA polimerase usada

é extraída de bactérias (exemplo: *Thermus aquaticus*) termorresistentes. Desta forma, pode-se obter, após 30-40 ciclos de reação, uma amplificação (da região alvo escolhida) da ordem de 10^9 vezes (Adzhar *et al.*, 1996; Belák & Ballagi-Pordány, 1993; Binns, 1993; Deacon & Lah, 1989; Gravitt & Manos, 1993; Jackwood, 1992; Pfeffer *et al.*, 1995; Rodriguez & Schudel, 1993), mesmo estando o VBIg inativado pelo calor (56°C / 15 min), ilustrando a alta sensibilidade da RT-PCR (Jackwood *et al.*, 1997).

No caso do VBIg, o qual possui algumas partes dos genes S1 e S2 sujeitas a alta variação, a técnica de RT-PCR ideal é aquela que detecta regiões inicialmente flanqueadas com seqüências de nucleotídeos bem conservadas, visando evitar a ocorrência dos falsos negativos (não amplificação da região alvo) decorrentes da baixa similaridade e conseqüente não pareamento dos oligos. Além da real possibilidade do não pareamento de um ou ambos oligos, principalmente nos estudos com isolados de surtos (daí a necessidade da inclusão em qualquer estudo desta natureza de controles positivos bem conhecidos), os falsos negativos podem ocorrer principalmente quando se pretende detectar o VBIg diretamente em tecidos presumivelmente infectados, mas que são ricos em inibidores de alguns componentes importantes da técnica de RT-PCR (por exemplo, inibição da Taq polimerase pela hemoglobina), além de outros compostos não identificados. Também, o genoma do VBIg é facilmente atacável por RNases (intra e extracelulares), quando livre do envelope viral. Para evitar os falsos positivos, os oligos escolhidos devem ser submetidos a uma análise comparativa prévia, utilizando programas adequados, com seqüências de nucleotídeos de genomas disponíveis de outros seres vivos (vírus, bactérias, fungos, protozoários, ácaros, insetos, plantas e animais), principalmente daqueles que podem estar envolvidos nos mesmos sistemas de replicação natural e artificial do vírus [Altschul *et al.*, 1990 - via INTERNET, no GenBank e consulta complementar de busca nos programas BLASTN (nucleotídeos) e, alternativamente, BLASTX

(aminoácidos)]. Neste sentido, também, procedimentos rigorosos de controle são recomendados para prevenir contaminações dentro do ambiente laboratorial, principalmente com segmentos de DNA amplificado previamente (*amplicons*) e que são altamente resistentes aos métodos de desinfecção convencionais, durante a realização da RT-PCR (Beisel, 1992; Binns, 1993; Newton, 1995; Pfeffer *et al.*, 1995).

Na análise por RFLP, devem ser utilizadas enzimas de restrição de ótima procedência e qualidade, como forma de garantir a reproducibilidade e confiabilidade desta técnica, além de ser indispensável a realização de avaliações prévias das mesmas no tocante à capacidade de clivagem de um DNA padrão conhecido. As enzimas de restrição são endonucleases extraídas de bactérias (a maioria delas), recebendo na sua denominação, as iniciais da bactéria (gênero + espécie) que a sintetiza. Elas reconhecem seqüências específicas de bases (nucleotídeos) no DNA fita dupla e cortam o DNA neste ponto. Então, a diferenciação do VBIg em genótipos ou variantes é feito com base na análise da presença ou ausência de sítios de restrição em uma porção específica amplificada do genoma (Pfeffer *et al.*, 1995; Promega, 1998).

Desde os primeiros trabalhos de RT-PCR / RFLP para o VBIg, nos quais as partes alvo estudadas foram um segmento (parte da região N - terminal) do gene S2 (responsável pela codificação do glicopolipeptídeo S2 da glicoproteína peplomérica S) (Lin *et al.*, 1991a,b) e uma região na junção dos genes M - N (Andreasen *et al.*, 1991), vários outros trabalhos, com modificações (n^o ciclos da PCR, gene ou região genômica alvo, enzimas de restrição utilizadas, diferentes VBIgs), foram realizados: gene S1 total (Adzhar *et al.*, 1996; Jackwood *et al.*, 1997; Kwon *et al.*, 1993a,b; Song *et al.*, 1998) e parcial (Wang & Tsai, 1996), parte do gene N (Zwaagstra *et al.*, 1992), parte do gene M (Adzhar *et al.*, 1996) e região parcial da 3'UTR (Adzhar *et al.*, 1996). Alternativamente ao isolamento viral, o VBIg pode ser detectado diretamente, a

partir de tecidos infectados retirados dos sistemas de eleição ou tropismo, com posteriores extração de seu RNA, amplificação de gene(s) específico(s) (ou parte de um deles) por RT-PCR e análise por RFLP para genotipificação (Cavanagh & Naqi, 1997; Song *et al.*, 1998).

A PCR, incluindo suas variações [RT-PCR, RAPD-PCR, RT-Nested PCR, com ou sem marcação (radioativa ou não) nos oligos, etc.], é aplicada, praticamente, a qualquer agente infeccioso [vírus (DNA / RNA), bactérias, clamídias, fungos, protozoários] ou genes (associados ou não a distúrbios genéticos – hormônios, enzimas, etc.). Outros métodos surgirão, mas, as técnicas moleculares são ferramentas que vieram para serem usadas, associadas aos métodos tradicionais, e que, seguramente, deverão variar caso a caso. Uma grande variedade de sistemas e kits de detecção e diagnóstico, além de outras facilidades relacionadas à execução da PCR, tem possibilitado, gradativamente, uma crescente utilização por laboratórios de diagnóstico (Pfeffer *et al.*, 1995). No Brasil, além dos laboratórios de diversos centros de pesquisa nas universidades públicas e privadas, a técnica de PCR e suas variações já são utilizadas por alguns laboratórios particulares com finalidades diagnósticas (medicina, medicina veterinária). Alguns trabalhos com isolados brasileiros do VBIg que utilizaram a técnica de RT-PCR, com ou sem análise por RFLP, já foram publicados [Abreu, 2000 (parte do gene N com análise por RFLP); Lunge *et al.*, 1998 (gene S1 total com análise por RFLP + seqüenciamento de parte do gene N); Resende *et al.*, 1998 (parte do gene S2); Santiago *et al.*, 2000 (gene S1 total com análise por RFLP); Silveira & Marques, 1995a,b (a: parte do gene N; b: gene S1 total com análise por RFLP)].

2.5. ESTUDOS DE RELACIONAMENTOS GENÉTICOS ENTRE VBIGs

Seqüências de genes de VBIGs de diversos países foram estudadas e publicadas, estando disponíveis, gratuitamente, no GenBank [via Internet (seqüências disponíveis no endereço eletrônico do

“National Institute of Health – NCBI”: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>] (Binns *et al.*, 1985; Binns *et al.*, 1986; Bournsnel *et al.*, 1987; Brown *et al.*, 1984; Cavanagh & Davis, 1992; Sutou *et al.*, 1988; Wang & Tsai, 1996). Os resultados obtidos pela técnica de RT-PCR / RFLP de isolados de VBIG, mesmo quando não seqüenciados, podem ser comparados, classificados e agrupados com base nas seqüências e informações moleculares disponíveis (Song *et al.*, 1998; Wang & Tsai, 1996). A RT-PCR / RFLP tem o potencial de identificar pequenas mudanças na seqüência genômica do VBIG e a ausência ou presença de sítios de restrição enzimática é suficiente para diferenciar isolados. Com a genotipificação, que pode ter ou não correlação direta com a sorotipificação tradicional (Cavanagh & Naqi, 1997; Kusters *et al.*, 1990; Kwon *et al.*, 1993a,b; Lin *et al.*, 1991a; Wang & Tsai, 1996; Zanotto *et al.*, 1996), pois o genotipo pode agrupar isolados que pertencem a diferentes sorotipos (Song *et al.*, 1998), a construção de árvores filogenéticas tornou-se possível com a aplicação de um ou mais métodos e programas de computador disponíveis, permitindo-se estimar o parentesco de isolados e estirpes do VBIG (Kusters *et al.*, 1989b; Kusters *et al.*, 1990; Lin *et al.*, 1991a; Zwaagstra *et al.*, 1992). O conhecimento genotípico de isolados do VBIG prevalentes em uma determinada região, quando associado ao seu relacionamento filogenético, respeitados os limites da filogenia molecular (Zanotto *et al.*, 1996), é importantíssimo na elaboração de futuras estratégias de controle do VBIG (Song *et al.*, 1998).

2.6. CONTROLE

Na avicultura industrial mundial, o controle do VBIG tem sido feito, com relativo sucesso, pela combinação de medidas básicas de biossegurança (isolamento, lotes próximos com idade única, *all-in-all-out*, limpeza, desinfecção e vazão sanitário) que incluem programas de vacinação desenvolvidos de acordo com cada região ou país. As vacinas vivas utilizadas são constituídas de VBIGs vivos atenuados (atenuação por passagens seriadas em

ovos embrionados de galinha, podendo ser ou não clonados em cultivo primário de células de embrião de galinha) e liofilizados e, as inativadas podem conter os mesmos VBIGs atenuados das apresentações vivas, associados ou não a VBIGs patogênicos (inativados), quando se trata de uso regional ou autóctone (geralmente emulsionados em óleo mineral e associados com diferentes vírus e/ou bactérias). As vacinas vivas com VBIGs atenuados se destinam a aves jovens e/ou em crescimento (frangos de corte, poedeiras e reprodutores em fase de recria), devendo ser aplicadas, preferencialmente, de forma massiva (*spray* - aerossol), rápida e em pelo menos duas aplicações distintas (intervalo de 20-30 dias entre aplicações), visando minimizar a possibilidade real de reversão de virulência e melhorar a resposta imune local ou de mucosas, especialmente do sistema respiratório, principal porta de entrada do VBIG. As vacinas inativadas oleosas, combinadas ou não, se destinam a galinhas de vida útil longa (poedeiras comerciais e matrizes) e devem ser aplicadas de um a dois meses antes do amadurecimento sexual (puberdade), sempre após a utilização anterior de vacinas vivas anti-VBIG (mínimo de duas aplicações distintas prévias com vacinas vivas atenuadas para garantir um *booster* de resposta imune de longa duração com a vacina inativada) (Cavanagh & Naqi, 1997).

A vacinação contra o VBIG com vírus homólogo àquele responsável pelo desafio reduz a transmissão do vírus por contato direto, a gravidade das lesões macro e microscópicas, sinais clínicos respiratórios, perdas por condenação no abatedouro, queda de postura, postura de ovos anormais e mortalidade, mas não impede a infecção com concomitante aparecimento de quadro subclínico (Abreu, 2000; De Wit *et al.*, 1998; Sander *et al.*, 1997).

No Brasil, a vacinação contra o VBIG tem sido feita desde 1980. Os VBIGs importados liberados para uso pelo Ministério da Agricultura e abastecimento (Portaria Ministerial Nº 24/80, de 17 de janeiro de 1980 "Aprova as normas para o controle e o emprego de vacinas contra a bronquite

infecciosa das aves") são atenuados por passagens seriadas em OEG/SPF (H-120, H-90 e H-52 - o "H" vem de "Holland" e os números representam a quantidade de passagens em OEG/SPF e quanto maior, maior a atenuação) ou naturalmente apatogênicos, imunogênicos e clonados (exemplo: MA-5), sendo todos pertencentes ao sorotipo/genotipo Massachusetts (Abreu, 2000; Resende, 1983; Villa, 1998). Os VBIGs "Holland", independente da intensidade de atenuação, podem causar danos aos rins (Winterfield & Albassam, 1984). Estes VBIGs são utilizados tanto em vacinas vivas liofilizadas como nas inativadas oleosas mistas ou não. A decisão de se optar por VBIGs vacinais do sorotipo Massachusetts baseou-se no fato de que eles, com base nas informações disponíveis na literatura científica internacional daquela época (1980), conferiam uma imunogenicidade mais ampla, inclusive sobre VBIGs pertencentes a outros sorotipos (Resende, 1983; Silva, 1989). Foi uma decisão emergencial e desprovida de um necessário estudo prévio de eficiência vacinal frente a isolados brasileiros do VBIG (Resende, 1983).

Diversos países, além dos VBIGs usados como vacina na avicultura industrial brasileira, utilizam outros pertencentes a sorotipos/genotipos diferentes (Tabela 4), tanto regionalmente como nacionalmente, vivos ou inativados, sendo que diferentes VBIGs vivos, mesmo atenuados, quando usados concomitantemente no mesmo plantel ou região, acabaram recombinando entre si e/ou com VBIGs de campo e colaboraram com o aparecimento de surtos da doença causados por VBIGs variantes naqueles lotes vacinados (Cavanagh & Naqi, 1997; De Wit *et al.*, 1998; Jia *et al.*, 1995; Kwon *et al.*, 1993b; Kusters *et al.*, 1989a,b; Kusters *et al.*, 1990; Lin *et al.*, 1991a,b; Song *et al.*, 1998; Wang & Tsai, 1996; Wu *et al.*, 1998).

Entretanto, a despeito dos programas de vacinação sistemática contra o VBIG, os surtos da BIG continuam ocorrendo em plantéis vacinados na avicultura industrial de diversos países, inclusive no Brasil. Estes surtos têm ocorrido devido à

combinação de diversos fatores que podem estar diretamente relacionados ao VBIg [vírus vacinal diferente do de campo pela hipervariabilidade viral (mutação e/ou recombinação), alta ou baixa atenuação do VBIg vacinal] ou outros fatores (imunodepressão, manejo inadequado da vacina, etc.) (Ikuta, 1999; Jia *et al.*, 1995; Lunge *et al.*, 1998; Song *et al.*, 1998; Wang & Tsai, 1996; Wu *et al.*, 1998). Alguns países, ainda que para uso regional ou autóctone em matrizes e poedeiras, têm utilizado vacinas inativadas oleosas preparadas com VBIgs patogênicos, variantes ou não (Gelb *et al.*, 1983; Cavanagh & Naqi, 1997).

3. MATERIAL E MÉTODOS

O projeto foi idealizado e desenvolvido no Setor de Doenças das Aves do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva da Escola de Veterinária da UFMG (EV / UFMG). Contou, ainda, nas fases iniciais, com a colaboração (facilidades no uso de equipamentos relacionados com PCR) do Laboratório de Genética Molecular (hoje não existe mais) do Departamento de Zootecnia da EV / UFMG e dos Laboratórios de Virologia Comparada e Virologia (Humana) do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG (ICB / UFMG).

O suporte financeiro foi obtido junto à FAPEMIG (principal - 85%), da FINEP (10%) e outros [CNPq; FEP / MVZ - Coordenação Preventiva (5%)].

3.1. VBIgs (ESTIRPES DE REFERÊNCIA E ISOLADOS BRASILEIROS)

Vinte e três VBIgs foram replicados em OEG/SPF (item 3.3) e usados neste estudo: oito VBIgs de referência (Tabela 2) representando os sete sorotipos padrões mais importantes, conforme Johnson & Marquardt (1975) e Kwon *et al.* (1993a,b) [seis norte-americanos: USA/M-41/41 (ATCC / VR-21) (sorotipo Massachusetts), USA / A-5968/51 (ATCC / VR-817) / (Connecticut ou C-46), USA/Ark-99/72 (ATCC / VR-841) (Arkansas 99), USA/JMK/64, USA/SE-17/67 e o USA/lowa-

97/53 e dois europeus: NL/H-52/55 (holandês, usado no Brasil como vacina viva atenuada e/ou inativada) e o UK/6-82/82 (inglês)], sendo alguns empregados como vacinas vivas atenuadas (M-41, A-5968 / C-46, Ark-99, JMK e H-52) e/ou inativadas oleosas (idem atenuadas mais o UK/6-82 não atenuado) em programas autóctones de controle do VBIg nos países de origem (Binns *et al.*, 1986), e, 15 isolados brasileiros [(Tabela 3) BR/208/72, BR/G/75, BR/TII/75, BR/29/78, BR/200/81, BR/283/83, BR/290/83, BR/297/83, BR/319/83, BR/327/83, BR/351/84, BR/PM1/87, BR/PM2/87, BR/PM3/89, BR/PM4/89], previamente caracterizados como VBIg (Martins *et al.*, 1996; Resende *et al.*, 1989; Resende *et al.*, 1998). Dentre os VBIgs de referência importados, três (USA/M-41/41, USA/A-5968/51 / C-46, USA/Ark-99/72) tiveram autorização de importação oficial do Ministério da Agricultura e Abastecimento do Brasil (MAA) e, os outros quatro (USA/JMK/64, USA/SE-17/67, USA/lowa-97/53 e UK/6-82/82), foram adquiridos [não concentrados, volume total (500 mL) de uma mistura (*pool*) de líquidos alantóideos - LAs de OEG/SPF inoculados no laboratório de origem / VBIg] previamente inativados pelo calor (56°C / 15 min) devido ao fato de que este procedimento técnico não danifica o RNA do VBIg (Jackwood *et al.*, 1997). Estes quatro VBIgs de referência foram adquiridos inativados por não ter sido solicitada liberação de importação ao referido órgão oficial brasileiro (MAA). O VBIg UK/6-82 foi gentilmente cedido pela Dra. Jane K. A. Cook ao Professor Nelson Rodrigo da Silva Martins da Escola de Veterinária / UFMG. O VBIg NL/H-52/55, mantido liofilizado e lacrado na embalagem original da USDA / EUA, estava liberado para uso como vacina no Brasil e foi gentilmente cedido pelo Dr. Max Augusto Jorge da EPAMIG / EMBRAPA. Os isolados brasileiros foram obtidos a partir de surtos naturais da BIG em lotes da avicultura industrial (não vacinados contra o VBIg) no estado de Minas Gerais (Regiões Alto São Francisco e Metalúrgica), ocorridos no período entre 1972 e 1989. Dos isolados brasileiros, 13 ainda não foram tipificados por métodos convencionais (sorotipificação) e nenhum por métodos moleculares (genotipificação).

Os isolados BR/208/72 e BR/29-78/78 pertencem ao sorotipo Massachusetts (Epiphany, 1998) e foram estudados no tocante à patogenia comparada em pintos SPF e gnotobióticos (axênicos) (Resende *et al.*, 1989). O único procedente de plantel de poedeiras adultas (BR/208/72), gentilmente cedido pelo Professor Maurício Resende (Laboratório de Virologia Comparada do Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG), foi isolado a partir de surto no qual os lotes afetados apresentavam problemas respiratórios graves associados à queda de postura com concomitante postura de ovos anormais (alterações externas na casca: cor, formato e fragilidade, e/ou internas: clara liquefeita, etc.) mas sem mortalidade elevada. Dos outros 14 isolados, os quais foram isolados a partir de frangos de corte

(em todos os surtos, acima de 30 dias de idade) no Laboratório de Doenças das Aves do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva da Escola de Veterinária da UFMG, dez (BR/G/75, BR/TII/75, BR/29-78/78, BR/200/81, BR/290/83, BR/297/83, BR/PM1/87, BR/PM2/87, BR/PM3/89 e BR/PM4/89) são provenientes de plantéis apresentando doença respiratória grave associada à mortalidade elevada (achados macroscópicos à necropsia: traqueíte, pneumonia, aerossaculite, pericardite e perihepatite) e, quatro (BR/283/83, BR/319/83, BR/327/83 e BR/351/84), de plantéis que, além da doença respiratória, apresentavam diarreia, desidratação, mortalidade elevada e, à necropsia, comprometimento renal bilateral grave (síndrome nefrite - nefrose: hipertrofia renal e retenção uratos no parênquima renal).

Tabela 2 - VBIGs (estirpes) de referência usados como controles positivos.

VBIG ^a (ESTIRPE)	Sorotipo ^b	Número de passagens (OEG/SPF) ^c	Procedência ^d
USA/M-41/41	Massachusetts	8	ATCC (VR-21) / EUA ^e
USA/A-5968/51	Connecticut	10	ATCC (VR-817) / EUA
USA/JMK/64	JMK	15	Spafas / EUA ^f
USA/SE-17/67	SE-17	16	Spafas / EUA
USA/Ark-99/72	Arkansas 99	7	ATCC (VR-841) / EUA
UK/6-82/82	UK/6/82	5	Houghton / Ing ^g
USA/Iowa-97/53	Iowa-97	9	Spafas / EUA
NL/H-52/55 ^h	Massachusetts	53	USDA / EUA ⁱ

a - Identificação individual= País de origem (USA: United States of America - Estados Unidos da América - EUA; UK: United Kingdom - Reino Unido; NL: The Netherlands - Holanda ou Países Baixos) / sigla ou número do VBIG / ano do isolamento do VBIG e, também, na maioria dos casos, de ocorrência do surto correspondente (exceção: o USA/A-5968/51, também é denominado C-46, devido ao ano de ocorrência do surto - 1946, mas o ano de isolamento foi posterior. O mesmo parece ter ocorrido com o Iowa-97).

b - Denominação individual de sorotipo conforme Johnson & Marquardt (1975) e Kwon *et al.* (1993a,b). Outrora, os VBIGs JMK e SE-17 foram classificados como pertencentes aos sorotipos Delaware e Georgia, respectivamente (Hopkins, 1974).

c - Número total de passagens em ovos embrionados de galinha (OEG) isentos de patógenos especificados (SPF): somatória das realizadas nos laboratórios do país de origem (procedência) e do Setor de Doenças das Aves do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva da Escola de Veterinária da UFMG, incluindo a realizada para extração do RNA total, incluindo o viral.

d - Os VBIGs da Spafas (EUA) e de Houghton (Inglaterra) foram adquiridos previamente inativados pelo calor (56°C / 15 min).

e - ATCC= American Type Culture Collection, Rockville, MD, EUA.

f - Spafas, Norwich, CT, EUA.

g - AFRC, Institute for Animal Health, Houghton Laboratory, Houghton, Huntingdon, Cambridgeshire, Inglaterra (VBIG gentilmente cedido pela Dra. Jane K. A. Cook ao Professor Nelson Rodrigo da Silva Martins (Escola de Veterinária / UFMG).

h - VBIG "Holland", com 52 passagens consecutivas em OEG/SPF, usado como vacina viva atenuada e inativada em diversos países, inclusive no Brasil, e originalmente isolado, estudado e utilizado como vacina na Holanda. Foi gentilmente cedido pelo Dr. Max Augusto Jorge da EPAMIG / EMBRAPA.

i - USDA= United States Department of Agriculture (Departamento de Agricultura, EUA).

Tabela 3 - Isolados do VBIG a partir de surtos clínicos da BIG na avicultura industrial do estado de Minas Gerais (Regiões Alto São Francisco e Metalúrgica) no período entre 1972 e 1989.

Identificação do Isolado ^a	Número de passagens (OEG/SPF) ^b	Tipo de criação ^c	Sinais principais no surto de origem ^d
BR/208/72	6	P	R + QP + POA
BR/TII/75	6	FC	R
BR/G/75	8	FC	R
BR/29-78/78	6	FC	R
BR/200/81	4	FC	R
BR/283/83	3	FC	R + SNN
BR/290/83	3	FC	R
BR/297/83	3	FC	R
BR/319/83	4	FC	R + SNN
BR/327/83	3	FC	R + SNN
BR/351/84	4	FC	R + SNN
BR/PM1/87	4	FC	R
BR/PM2/87	3	FC	R
BR/PM3/89	3	FC	R
BR/PM4/89	3	FC	R

a - Identificação individual ⇒ Brasil / sigla ou número do isolado / ano do isolamento e, também, de ocorrência do surto correspondente. O BR/208/72 foi isolado pelo Professor Maurício Resende no Laboratório de Virologia Comparada do Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG. Os outros 14 foram isolados no Laboratório do Setor de Doenças das Aves do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva da Escola de Veterinária da UFMG, sendo três (BR/TII/75, BR/G/75 e BR/29-78/78) pelo Professor Regino Leonardo de Oliveira e os outros 11 pelo Professor José Sérgio de Resende. Todos os isolados foram provenientes de lotes da avicultura industrial sem histórico de vacinação contra o VBIG.

b - Número de passagens em ovos embrionados de galinha (OEG) isentos de patógenos especificados (SPF), incluindo a realizada para a extração do RNA total, incluindo o viral.

c - Tipo de ave ⇒ P= poedeira comercial leve; FC= frango de corte.

d - Sinais clínicos principais no surto de origem ⇒ R= doença respiratória; QP= queda de postura; POA= postura de ovos anormais (interna / externamente); SNN= síndrome nefrite - nefrose (desidratação + diarreia).

3.2. ISOLAMENTO DOS VBIGs BRASILEIROS

Nos surtos inicialmente suspeitos e posteriormente confirmados como sendo de BIG, os procedimentos foram conduzidos de acordo com protocolos estabelecidos para o isolamento de VBIG (Gelb, 1989; Lukert, 1975; Villegas, 1985). Nos casos onde ocorreram problemas respiratórios, associados ou não a problemas reprodutivos, foram coletados traquéias, pulmões e sacos aéreos torácicos e abdominais de várias aves doentes do plantel para processamento (necropsia em grupo), enquanto naqueles com síndrome nefrite - nefrose, independentemente se estavam associados a problemas respiratórios, somente os rins de várias aves foram utilizados. No laboratório, os materiais coletados ou foram estocados diretamente

em freezer de ultrabaixa temperatura (-80°C, Revco, EUA) ou foram mantidos refrigerados (4°C - máximo 24 h) para posterior processamento. Dentro de ambiente controlado [capela equipada com cabine de fluxo laminar (mod. FLV - classe II, Trox, Brasil)], foram homogeneizados (usando gral e pistilo com areia, autoclavados) o mais rapidamente possível em uma suspensão (20% - P/V) com salina fosfatada tamponada (PBS pH 7,2) previamente autoclavada e resfriada (4°C). Após centrifugação (3.000 xg / 4°C / 10 min - centrífuga refrigerada, mod. RC5B, rotor GSA, Sorvall DuPont, EUA), o sobrenadante foi coletado, tratado com solução estéril de PBS (pH 7,2) contendo antibióticos [Dose final / OEG/SPF: penicilina G potássica (2.500 UI) + sulfato de estreptomicina (2,5 mg) + sulfato de gentamicina (0,05 mg),

diluídos em PBS (pH 7,2) previamente autoclavado e, a mistura final, filtrada (Swinnex 0,22 μm , Millipore, EUA)] e inoculado (seringa graduada 1 mL equipada com agulha 25 x 7, estéreis e descartáveis, dose / ovo: 250 μL) na cavidade alantóidea de 50 OEG/SPF [(Spafas / Rezende, Brasil) (SPF = Specific Pathogen Free = livres de patógenos especificados)] com dez dias de incubação a 37°C (Incubadora automática eletrônica Petersime / Rooster, mod. Labo 9 e mod. Labo 13, Brasil). Rapidamente foram reincubados e, após três dias (72 horas após inoculação), 30 a 40 OEG/SPF, cujos embriões permaneciam vivos, foram resfriados em geladeira [(4°C) durante 16 horas para morte embrionária, procedimento que facilita obtenção de líquidos alantóideos (LAs) claros]. Os LAs dos OEG/SPF resfriados foram colhidos assepticamente (dentro de cabine de fluxo laminar vertical, mod. FLV - classe II, Trox, Brasil, após desinfecção prévia da casca com álcool iodado 5% e usando seringas, agulhas, tesouras, pinças e vidraria autoclavados), testados individualmente quanto à presença direta (espontânea) de atividade hemaglutinante (100 μL de LA + 100 μL de suspensão 5% de hemácias de galinha adulta em PBS pH 7,2), propriedade que o VBIG naturalmente não possui, agrupados (*pool* de LAs) e estocados a -80°C (Freezer Revco, E.U.A) até a próxima passagem em OEG/SPF (quando dos isolamentos virais, pelo menos cinco passagens consecutivas em OEG/SPF foram realizadas antes de serem considerados negativos). Os OEG/SPF restantes com embriões vivos foram mantidos na incubadora por mais cinco dias (18 dias de incubação total ou oito dias após inoculação) quando foram abertos para observação das lesões típicas nos embriões causadas pelo VBIG (nanismo, enrolamento e presença de uratos nos mesonefros). Antes de serem considerados VBIG, cada isolado individual foi submetido a outras provas de confirmação comprobatórias padrões: sensibilidade ao éter - clorofórmio, ausência de atividade hemaglutinante direta (espontânea) frente a uma suspensão (5%) de hemácias de galinha, testes de vírusneutralização com soros imunes de referência anti - vírus da doença de

Newcastle e adenovírus tipo 1 (Lukert, 1975; Villegas, 1985; Gelb, 1989), e, mais recentemente, em estudos utilizando técnicas de ELISA com anticorpos monoclonais (Martins *et al.*, 1996; Souza, 1999; Souza, 2000) e RT-PCR (Abreu, 2000; Resende *et al.*, 1998; Santiago *et al.*, 2000). O BR/208/72 foi isolado pelo Professor Maurício Resende no Laboratório de Virologia Comparada do Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG e os outros 14 foram isolados no Laboratório do Setor de Doenças das Aves do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva da Escola de Veterinária da UFMG (três BR/TII/75, BR/G/75 e BR/29-78/78 foram isolados pelo Professor Regino Leonardo de Oliveira e, os outros 11, pelo Professor José Sérgio de Resende). Desde a época do isolamento, todos os isolados brasileiros do VBIG foram mantidos em nitrogênio líquido [(-196°C) botijão criogênico, Cryometal, mod. SM-33, SP, Brasil] em pequenas alíquotas (criotubos de 2 mL, Nunc, Dinamarca), o que também foi realizado com os VBIGs de referência importados (vivos ou inativados pelo calor - vide item 3.1), sendo denominados *vírus - semente*. A conservação do VBIG (isolados suspeitos de serem VBIGs e/ou de VBIGs de referência) em nitrogênio líquido é altamente recomendável porque dispensa passagens seriadas e freqüentes no sistema ideal de replicação deste vírus (OEG/SPF) durante sua estocagem e manutenção. Tudo isto porque o VBIG é hipervariável e passagens seriadas são geralmente acompanhadas de alterações irreversíveis nas suas propriedades biológicas mais importantes (antigenicidade e patogenicidade) (Cavanagh & Naqi, 1997).

3.3. REPLICAÇÃO VIRAL

Cada VBIG (referência ou isolado) foi inoculado em 50 OEG/SPF para obtenção de uma mistura individual (*pool* de LAs), sendo utilizado um intervalo de trabalho (entre a inoculação e a coleta do líquido alantóideo - LAs dos OEG/SPF) mínimo de uma semana (entre cada isolado ou VBIG trabalhado), aliado aos procedimentos padrões (lavagem, preparo e desinfecção

rigorosa de materiais e ambiente), os quais visavam evitar contaminações entre VBIGs ou isolados. Resumidamente, o procedimento de inoculação iniciou com a diluição (1:1.000) do vírus-semente em PBS (pH 7,2) previamente autoclavado, o qual permaneceu em banho de gelo até o momento da inoculação (100 μ L por OEG/SPF - via cavidade alantóideia). Os procedimentos posteriores, inclusive para confirmação da replicação do VBIG pelos OEG/SPF inoculados, foram similares aos descritos anteriormente (item 3.2). Ao *pool* de LAs obtido foi acrescido um inibidor de proteases [PMSF (1 mg / mL), *phenyl methyl sulfonyl fluoride*, isento de RNases/DNases, BRL, EUA - conforme Ignjatovic & Galli, 1994] para prevenir ruptura do VBIG e liberação prévia indesejável do seu RNA. Em seguida, a mistura (*pool* de LAs + PMSF) foi clarificada (5.000 xg / 60 min / 4°C - centrífuga refrigerada mod. RC5B, rotor GSA, Sorvall DuPont, EUA) para obtenção de um sobrenadante límpido livre de resíduos celulares e de outros componentes grosseiros provenientes dos OEG/SPF.

3.4. CONCENTRAÇÃO DA MISTURA DE LÍQUIDOS ALANTÓIDEOS (LAs)

Diferentemente da metodologia descrita por Lin *et al.* (1991a) e base deste trabalho, no qual foram utilizadas ultracentrifugações (40.000 xg / 120 min / 4°C), primeiramente com colchão e posteriormente com gradiente de sacarose, para concentração e purificação do VBIG, neste trabalho, cada VBIG (referência ou isolado, vivo ou inativado), na forma de um *pool* de LAs clarificado (item 3.3), foi colocado (200 mL) dentro de tubos de diálise (Spectrapor, mwco 12.000, Sigma, EUA) preparados de acordo com as recomendações do fabricante [previamente lavados externa / internamente com detergente neutro (Extran MA O2 - Merck), enxaguados diversas vezes em água de torneira, reenxaguados em água destilada e deionizada (dd) e fervidos (15 min) dentro de becker com água 18 M Ω não estéril]. Em seguida, foram submersos em uma solução concentrada (P/V ou 50% em PBS pH 7,2) de um polímero sintético (PVP-360,

polyvinylpyrrolidone, Sigma, EUA), previamente autoclavada e resfriada (24 - 48 h / 4°C). A massa úmida concentrada (desidratada) foi ressuspensa com água ultrapura (18 M Ω) livre de RNases/DNases [(MilliQ, Millipore, EUA) tratada com 0,1% de DEPC (*diethylpyrocarbonate*, Sigma, EUA) e, posteriormente, autoclavada para eliminação do DEPC (Wang & Tsai, 1996)], na proporção de 1:100 do volume do *pool* de LAs original clarificado, sendo estocada em nitrogênio líquido (duas alíquotas 1mL cada / VBIG ou isolado) até o momento da extração do RNA total, incluindo o viral. Esta massa liquefeita densa foi chamada de *vírus-trabalho*. A título de comprovação da concentração do VBIG com a metodologia empregada, o VBIG de referência M-41 foi titulado em OEG/SPF (Lukert, 1975; Villegas, 1985), antes e após a concentração, e os títulos encontrados foram 10^{5,6} doses infectantes (50%) para o embrião de OEG/SPF (DIE₅₀) / 0,1 mL e 10^{8,8} DIE₅₀ / 0,1 mL, respectivamente. Os outros não foram titulados.

3.5. CONTROLES NEGATIVOS (ESPECIFICIDADE E SISTEMA DE PRODUÇÃO)

Como controle negativo de especificidade, foi utilizada a estirpe La Sota do vírus da doença de Newcastle (VDN - Spafas, EUA), a qual possui genoma RNA, pertence à Família *Paramyxoviridae*, Subfamília *Paramyxovirinae* e Gênero *Avulavirus*, é replicada otimamente em OEG/SPF (tanto quanto o VBIG), sendo utilizada como vacina (viva ou inativada) contra esta doença no Brasil e em diversos países. As técnicas de replicação e concentração foram idênticas às feitas com os VBIGs (itens 4.2, 4.3 e 4.4).

Como controle negativo de sistema de produção, foi utilizado um *pool* de LAs de OEG/SPF não inoculados, obtido e processado como para os VBIGs e o VDN.

3.6. PROCEDIMENTOS DE BIOSSEGURANÇA LABORATORIAL

3.6.1. CONSUMO

De acordo com as recomendações para trabalhos com RNA e DNA (Newton, 1995; Powell, 1995; Promega, 1998; Sambrook *et al.*, 1989), todos os reagentes utilizados nas diversas fases experimentais deste trabalho foram de qualidade ultrapura e desenvolvidos para biologia molecular pelos laboratórios fabricantes, sendo, obrigatoriamente, isentos de RNases, DNases e proteases.

As soluções foram preparadas com água 18M Ω livre RNases/DNases [(18 MegaOhm, MilliQ, Millipore, EUA) tratada com DEPC (0,1% - Sigma, EUA) e, posteriormente, autoclavada (60 min / 121°C) para eliminação do DEPC (Wang & Tsai, 1996)]. Os materiais plásticos usados neste trabalho (ponteiros com barreira contra aerossol, microtubos de 1.500 e 500 μ L - tipo PCR, criotubos, etc.) foram novos, estéreis, livres de RNases/DNases e descartáveis, obtidos de laboratórios conceituados e especializados no fornecimento de materiais para biologia molecular. Luvas novas, descartáveis e isentas de pó (Safeskin Hypoclean, EUA), foram usadas em todas as fases de manipulação deste material, além de máscaras e aventais lavados. Na lavagem de aventais, visando destruir *amplicons* residuais, além do tradicional sabão em pó, utilizou-se água sanitária comercial (solução alvejante de hipoclorito de sódio) em um molho pré-lavagem (a troca de avental foi diária).

Antes do início dos experimentos, cerca de 200 mL de água 18M Ω livre RNases/DNases (tratada com DEPC) destinada ao preparo de soluções de extração de RNA, diluição dos oligos (estoque e uso), transcrição reversa (RT), PCR e RFLP, foi alíquotada (1.000 μ L / alíquota em microtubos 1.500 μ L, estéreis, livres de RNases/DNases), dentro de cabine de fluxo laminar (onde nunca se trabalhou com material amplificado por RT-PCR) e congelada em freezer. Após o uso, o

microtubo que continha água 18M Ω era descartado por ser considerado contaminado.

3.6.2. VIDRARIA

Toda a vidraria reutilizável (cor âmbar, normalmente, e utilizada com soluções tampões estoques concentradas mantidas à temperatura ambiente, além de provetas, etc.) foi submetida a um sistema de lavagem especial, consistindo de: um primeiro tratamento com um produto comercial removedor de RNases (RNaseAWAY, BRL, ou RNaseZAP, Sigma, EUA), dez enxágües subseqüentes com água destilada e deionizada (dd) convencional e um último enxágües com água 18M Ω não estéril, seguidos de secagem (100°C), resfriamento natural, embalagem (papel alumínio), esterilização a seco [(5 h / 150-200°C), forno de secagem e esterilização a seco, Fanem, Brasil] visando destruir RNases/DNases residuais, resfriamento natural, embalagem complementar em filme de PVC sem remoção do papel alumínio e estocagem em ambiente livre de pó. Luvas novas, descartáveis e isentas de pó, foram usadas em todas as fases de preparo da vidraria.

3.6.3. BIOSSEGURANÇA LABORATORIAL

Para a biossegurança laboratorial (e, por conseqüência, ambiental e pessoal) adotada neste trabalho, foi feito um levantamento prévio de todas as possíveis situações que poderiam acontecer e, durante a montagem (sempre prévia) dos protocolos de execução técnica, passo a passo, foram discutidas, previamente, com toda a equipe envolvida. Algumas destas situações previstas (tanto com base nas informações descritas na literatura disponível como na eventual experiência da equipe em uma tarefa específica, além daquelas que acompanham os produtos tóxicos) aconteceram e foram resolvidas adequadamente. Outra precaução adotada importante foi, quando possível, a realização de pré-experimentos, mesmo em escala reduzida, para que as situações de risco ou emergenciais e comportamentais,

fossem enfrentadas de forma adequada e pertinente. Neste trabalho (composto de diversas etapas seqüenciais de desenvolvimento experimental), cada uma das diversas etapas foi realizada de forma gradual, sem a pressa que tanto prejudica os trabalhos científicos, repetindo o que fosse necessário e possível, para não prejudicar os resultados finais.

Nas etapas iniciais envolvendo replicação e concentração virais (itens 3.3 e 3.4, respectivamente), os materiais contaminados resultantes daqueles procedimentos foram desinfetados de acordo com a natureza do material. Os reutilizáveis (vidraria em geral, seringas, agulhas, pinças e tesouras de aço inoxidável) foram imersos em solução aquosa (água dd) com 10% formol comercial (24 h / temperatura ambiente - TA) dentro de balde plástico (com tampa de pressão manual) para posterior lavagem e preparo do material. Os resíduos biológicos (OEG/SPF inoculados ou não - após coleta dos LAs) e utensílios descartáveis (membranas de diálise, luvas, máscaras, papéis toalha e de forração) foram colocados dentro de balde plástico (com tampa de pressão manual) contendo solução desinfetante [água de torneira com 50% de formol comercial (72 h / TA) e, posteriormente, remetidos para forno crematório.

Nas etapas intermediárias e finais envolvendo as atividades relacionadas com biologia molecular (geralmente realizadas em bloco), dois laboratórios foram utilizados: um, denominado "Extra Lab" para atividades de extração de RNA e síntese de cDNA (transcrição reversa - RT e montagem da PCR) e outro, denominado "Biomol Lab", para "incubação da PCR" e eletroforese para análise de produtos da PCR e da restrição enzimática (RFLP), sendo, este último, considerado contaminado com *amplicons* (material amplificado - segmentos de DNA), os quais são praticamente indestrutíveis no ambiente laboratorial e muito contaminantes (Beisel, 1992; Binns, 1993; Newton, 1995; Pfeiffer *et al.*, 1995). Assim, após qualquer atividade no laboratório contaminado, nunca se retornou

ao outro no mesmo dia e, na maioria das vezes, nem naquela semana ou naquele mês. Apesar dos cuidados usuais (substituição sistemática de aventais, luvas descartáveis, muito papel toalha, forração de mesas e bancadas de trabalho), principalmente durante a realização de eletroforese com conseqüente manipulação dos géis para análise e documentação fotográfica, o risco de contaminação ambiental sempre foi grande. Por isto, soluções e quaisquer reagentes, mesmo destinados a PCR, não ficaram jamais neste laboratório. Nestes casos, o preparo das soluções e alíquotamento (para uso único ou gradativo) sempre foi realizado no laboratório livre de *amplicons* (Extra Lab) e o transporte (material acondicionado em estante plástica apropriada para microtubos) para o outro laboratório (Biomol Lab) foi realizado em banho de gelo. As micropipetas (Socorex, Wheaton, EUA e Pipetman, Gilson, França) sempre foram utilizadas com ponteiras descartáveis com barreira contra aerossol e as de um laboratório jamais foram para o outro, sob pena de por todo o experimento a perder, em termos de resultados confiáveis (outro grande problema quando do emprego destas técnicas).

Além da questão da contaminação do ambiente laboratorial com *amplicons*, foi dada atenção especial ao destino dos produtos tóxicos descartáveis, principalmente no tocante ao *Trizol LS* (item 3.7), altamente tóxico, e aos géis de eletroforese (agarose e poliacrilamida) e soluções contendo brometo de etídio [(EtBr) tóxico e mutagênico]. Tubos contendo *Trizol LS*, ponteiras usadas, os géis, soluções contendo EtBr, papéis toalha (usados na limpeza de cubas de eletroforese e do transiluminador UV após o uso) e forração de mesas e bancadas, foram acondicionados em garrafas plásticas transparentes (aquelas de refrigerante 2 L), devidamente identificadas, e estão estocadas em sala de uso reservado até serem destinadas, provavelmente, a um forno crematório ou empresa (pública ou privada) especializada em tratamento e descarte de rejeitos químicos. Quando géis de poliacrilamida foram utilizados na

eletroforese (fase inicial da RFLP - item 3.9.2), além de luvas, utilizou-se máscara contra pó fino (3M, Brasil), objetivando evitar o contato e a inalação de acrilamida não polimerizada, neurotóxica e, após o uso, os géis foram acondicionados em garrafas plásticas, a exemplo dos tubos com *Trizol LS* (Abreu, 2000; Newton, 1995).

3.7. EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DO RNA TOTAL (INCLUINDO O VIRAL)

Para a extração e quantificação do RNA total incluindo o viral (RNAtiv), foi utilizado um processo rápido, sem a ultracentrifugação para peletização inicial do VBIG utilizada por Lin *et al.* (1991a) e, também, sem os tratamentos posteriores com SDS (sulfato dodecil sódico) e proteinase K utilizados por Kwon *et al.* (1993a) visando a degradação protéica. Nesta fase, os VBIGs (*pool* de LAs de OEG/SPF inoculados com estirpes de referência e isolados - item 3.4), o VDN e *pool* de LAs de OEG/SPF não inoculados (item 3.5), foram processados em bloco (ao mesmo tempo) usando-se dois microtubos novos (1.500 μ L, estéril, livre RNases/DNases, Eppendorf, Alemanha) por material (*vírus-trabalho* / controles) nas fases iniciais envolvendo maior volume de solução. Os VBIGs concentrados, denominados *vírus-trabalho*, e os controles negativos (VDN e *pool* de LAs de OEG/SPF não inoculados), foram retirados (um criotubo com 1 mL cada / *vírus-trabalho* e controles) do nitrogênio líquido (-196°C) e descongelados rapidamente em banho-maria (10 min / 37°C). Imediatamente, foram centrifugados para clarificação [(6.500 xg / 10 min / 4°C) (microcentrífuga Centrimicro mod. 212, rotor com adaptadores em ângulo fixo, instalada dentro de geladeira comum, Fanem, Brasil)] e deixados em repouso em banho de gelo. Foi utilizado um produto comercial denominado "*Trizol LS*" (BRL, EUA), uma solução monofásica composta de fenol e isotiocianato de guanidina (desenvolvida por Chomczynsky & Sacchi, 1987), e seguido o protocolo recomendado pelo fabricante (BRL, 1993b).

Resumidamente, à temperatura ambiente (TA) e em cima da bancada (forrada com

papel absorvente descartável), todos microtubos (previamente identificados com o nome do VBIG ou número do isolado) receberam 750 μ L de *Trizol LS*. Em seguida, adicionaram-se 250 μ L do sobrenadante de cada VBIG (concentrado e clarificado) aos microtubos correspondentes. Com a própria ponteira utilizada na aplicação individual, homogeneizou-se (dez vezes) e a mistura foi deixada em repouso (15 min / TA), sem apertar a tampa dos microtubos. Adicionaram-se 200 μ L de clorofórmio (livre RNases/DNases, Sigma, EUA) à mistura de cada microtubo, homogeneizou-se manualmente, com vigor, durante 15 segundos e deixou-se em repouso (15 min / TA). Centrifugou-se (13.000 xg / 15 min / 4°C) e apareceu um sobrenadante incolor (fase aquosa) contendo o RNAtiv solubilizado. No fundo do microtubo ficou o clorofórmio e, no meio (vermelho), a fase orgânica (DNA e proteínas degradadas pelo *Trizol LS*). Transferiram-se 400 μ L da fase aquosa superficial para dois novos microtubos (1.500 μ L) [o restante (contendo *Trizol LS* + clorofórmio) foi descartado em local adequado - vide item 3.6.3 - relativo a biossegurança laboratorial], adicionaram-se 500 μ L de isopropanol (livre RNases/DNases, Sigma, EUA), misturou-se delicadamente (inversão manual / dez vezes) e deixou-se em repouso (10 min / TA). O RNAtiv foi sedimentado por centrifugação (13.000 xg / 10 min / 4°C). Em seguida, removeu-se o sobrenadante, descartando-o. Adicionaram-se 1.000 μ L de uma solução de etanol 75% [preparada com etanol (Sigma, EUA) e água 18M Ω , ambos livres RNases/DNases] e vortexou-se rapidamente. Logo após, centrifugou-se (6.500 xg / 5 min / 4°C) e removeu-se o etanol por derramamento, descartando-o. Os microtubos foram deixados (5 a 10 min / TA), abertos e deitados, dentro de uma cabine de fluxo laminar (mod. FLV - classe II, Trox, Brasil), observando continuamente para não deixar o *pellet* (gel semitransparente de difícil visualização) de RNAtiv secar. Adicionaram-se 50 μ L de água 18M Ω (livre RNases/DNases) em cada um dos microtubos, aspirando e expelindo para deslocar e dissolver o *pellet*. As

misturas dos dois microtubos contendo RNAtiv do mesmo VBig / isolado foram agrupadas em um único microtubo novo (500 μL , tipo PCR, estéril, livre RNases/DNases, Eppendorf, Alemanha) e incubou-se em banho-maria (10 min / 60°C) para dissolução completa do *pellet*. Em seguida, homogeneizou-se (aspirando e expelindo) novamente a mistura e transferiram-se 20 μL para um microtubo novo (1.500 μL) contendo 1.000 μL de água 18M Ω (livre RNases/DNases) para determinação da concentração de RNAtiv por espectrofotometria (foram realizadas leituras comparativas em dois espectrofotômetros: Shimadzu, Japão e GeneQuant, Pharmacia, EUA), conforme recomendação de Jackwood *et al.* (1992) e Lin *et al.* (1991a). A mistura restante (80 μL) foi estocada em geladeira (máximo 16 horas) aguardando o resultado da espectrofotometria e posterior uso na reação de transcrição reversa (RT) ou síntese de cDNA (DNA complementar).

3.8. SÍNTESE DO cDNA (DNA COMPLEMENTAR) / TRANSCRIÇÃO REVERSA E REAÇÃO EM CADEIA PELA POLIMERASE (RT – PCR)

3.8.1. OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES (OLIGOS)

Os oligos utilizados neste trabalho são os mesmos descritos por Lin *et al.* (1991a) e foram desenhados com base na análise comparativa (alinhamento) das seqüências dos genes codificadores da glicoproteína S (S1 + S2) de quatro VBigS [dois norte-americanos (M-41 e M-42 / Beaudette), um inglês (UK/6-82) e um japonês (KB-8523)], publicadas na década de 80 (Binns *et al.*, 1985; Binns *et al.*, 1986; Sutou *et al.*, 1988). No gene S, a região escolhida, por ser razoavelmente conservada nestes quatro VBigS, está inserida na região codificadora da glicoproteína S2 (gpS2). Os oligos escolhidos flanqueiam um segmento de 400 pares de bases (pb) limitando a porção 198-598 pb na extremidade N-terminal deste gene (Lin *et al.*, 1991a).

Os nomes dos oligos, seqüências de bases e localização individual no gene codificador

da gpS2 do VBig foram BIGS21 [(fita "forward" +) 5' - TGG ATA AGC TCC AAA TTA ATT G - 3' na região 198-220 pb] e BIGS22 [(fita reversa ou complementar -) 5' - AGC AAA CCA TTA TAT TCA CGA G - 3' na região 576-598 pb], sendo ambos com 22 bases. Os oligos BIGS21 e BIGS22, denominados IBP1 e IBRP2 por Lin *et al.* (1991a), respectivamente, foram analisados [via INTERNET (seqüências disponíveis no endereço eletrônico do "National Institute of Health - NCBI": <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), conforme Altschul *et al.*, 1990], para busca de similaridade, com todas as seqüências depositadas no GenBank (Database: non-redundant PDB + GenBank + EMBL + DDBJ). O oligo BIGS22, por pertencer à fita complementar reversa (-), foi analisado em sua fita invertida (5' - C TCG TGA ATA TAA TGG TTT GCT - 3'). Os resultados da análise comparativa encontram-se no item 4.4.1. O cálculo da temperatura de anelamento / dissociação "Tm" (*melting temperature*) de cada oligo foi feito utilizando-se a fórmula simplificada [Tm = 2 (A + T) + 4 (G + C)] proposta por Ausubel *et al.* (1992), sendo de 58°C a "Tm" do BIGS21 e de 60°C a do BIGS22.

Os oligos foram sintetizados pela New England Biolabs (NEBiolabs, EUA) e fornecidos purificados (HPLC), liofilizados, concentrados (\cong 1 μM) e divididos em 12 criotubos (cada um com 5 OD / A260). A diluição foi realizada dentro de cabine de fluxo laminar (mod. FLV - Classe II, Trox, Brasil) com água 18M Ω (livre RNases/DNases) de forma a obter uma solução estoque de cada oligo com aproximadamente 100 μM (100 pmol / μL). A quantidade de água 18M Ω (livre RNases/DNases) utilizada foi baseada nos parâmetros fornecidos pelo fabricante para cada oligo (μg / OD, OD's e peso molecular). Em seguida, dentro dos próprios criotubos de origem, foram vortexados (5 s) e centrifugados rapidamente (6.500 xg / 1 min / 4°C), sendo mantidos na geladeira (24 h / 4°C) para dissolução completa dos oligos. Após este período, foram retiradas amostras (5 μL) de cada oligo e diluídas em 495 μL de água 18M Ω (livre RNases/DNases) para análise em

espectrofotometria (GeneQuant, Pharmacia, EUA) a 260 nm, para a determinação da concentração de DNA. A partir daí, com o resultado da espectrofotometria, as soluções estoques foram novamente diluídas e alíquotadas (50 μL). Para cada oligo, uma alíquota da solução estoque foi novamente diluída com água 18M Ω (livre RNases/DNases) de forma a obter soluções de uso com 10 μM e alíquotada em vários criotubos pequenos com quantidade suficiente para poucas RT-PCR, sempre descartando a sobra após uso. Para uso na RT, uma alíquota da solução de uso do oligo BIGS22 (10 μM) foi novamente diluída com água 18M Ω (livre RNases/DNases) para obtenção de solução de uso (2 μM) na RT. Tanto as soluções estoques quanto de uso ficaram estocadas em freezer comum em criotubos (200 μL , estéril, livre RNases/DNases, Nunc, Dinamarca) com tampa rosqueável e anel de vedação para impedir desidratação e conseqüente alteração da concentração durante estocagem. Esta fase foi realizada antes da extração do RNAtiv.

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

Nos estudos com vírus RNA, a transcrição reversa (RT) ou síntese do cDNA (DNA complementar fita simples) é obrigatória antes da realização da PCR (Lin *et al.*, 1991a,b). Após a extração do RNAtiv e sua dosagem por espectrofotometria (similar à utilizada para os oligos, porém nas absorvâncias A260, A280 e A320), foi realizada a RT tendo como orientação básica a metodologia descrita por Lin *et al.* (1991a), mas utilizando um *Kit* para esta finalidade específica (*Kit SuperScript II RT RNase H System*, BRL, USA) e seguindo o protocolo do fabricante (BRL, 1993a). Devido à grande variação nas concentrações ($\mu\text{g} / \text{mL}$) dos RNAtiv's individuais (VBIGs referência e isolados) e dos controles negativos (concentrações individuais estão apresentados no item 4.3), foi utilizada uma concentração também variável de RNAtiv na RT [concentração mínima de 0,14 μg (*pool* de LAs) e máxima

de 1,96 μg (M-41) por reação, após diluição]. Considerando que o protocolo do fabricante recomenda de 1 μg a 5 μg de RNAtiv por RT, seis misturas com altas concentrações de RNAtiv (M-41, H-52, 283, 327, PM1 e PM2), além do processamento normal, também foram diluídas (água 18M Ω livre RNases/DNases) e trabalhadas com concentrações mínimas (0,14 $\mu\text{g} / 10 \mu\text{L} / \text{RT}$) para comprovar a eficiência da metodologia utilizada frente a situações como a da baixa concentração de RNAtiv obtido no controle negativo (sistema de produção - *pool* de LAs de OEG/SPF não inoculados). Trabalhando dentro de cabine de fluxo laminar para não contaminar o RNAtiv, a fase inicial da RT consistiu na transferência de 10 μL da solução de RNAtiv de cada VBIG de referência / isolado / controle negativo [(80 μL) estocada em geladeira (item 3.7) durante a espectrofotometria] para um microtubo novo (500 μL , tipo PCR, estéril, livre RNases/DNases, Eppendorf, Alemanha) e, imediatamente, adicionou-se 2 μL da solução de uso preparada com oligo BIGS22 (reverso ou complementar) contendo 2 μM de concentração final. Com a própria ponteira, homogeneizou-se a mistura (dez vezes) e incubou-se (70 $^{\circ}\text{C} / 10$ min) para pareamento do oligo complementar. Em seguida, a mistura foi para banho de gelo. Para cada VBIG de referência, isolado e controle negativo, adicionaram-se 8 μL de uma mistura contendo os seguintes componentes que acompanham o *Kit*: 2 μL de tampão de PCR 10 X [200 mM Tris-HCl (pH 8,4) e 500 mM KCl], 2 μL de uma solução 25 mM de MgCl_2 , 1 μL de uma mistura de dNTP's (10 mM de cada deoxirribonucleosídeo trifosfatado: dATP, dTTP, dCTP e dGTP), 2 μL de uma solução de ditioneitol (DTT - 0,1 M), 1 μL de inibidor de RNases [RNasin, 40 U (unidades) / μL , Promega, EUA] e, no final, após a mistura ser vortexada (10 s) e centrifugada (6.500 $\times\text{g} / 5\text{min} / 4^{\circ}\text{C}$), adicionou-se 1 μL (200 U) de enzima *SuperScript II* (transcriptase reversa do vírus "Moloney" da leucemia murina), a qual foi modificada para remoção da atividade RNase H⁺ que degrada o RNA durante a transcrição reversa (BRL, 1993a). Dois

microtubos contendo 21 μL da mistura final foram preparados para cada VBIG / isolado e controles negativos. Após serem vortexadas (5 s) e centrifugadas rapidamente (6.500 xg / 1 min / 4°C), as misturas foram incubadas em aparelho termociclador também usado para PCR (PTC - 100, MJ Research, EUA), nas seguintes condições: 42°C / 90 minutos para RT seguidos de aquecimento (70°C / 15 min para inativação da enzima e paralisação da reação), resfriamento rápido (25°C / 5 min), remoção do aparelho e imersão em banho de gelo. Mantendo-as resfriadas, foi adicionado 1 μL de enzima RNase H⁺ (vem no *Kit*) em cada mistura após a RT visando eliminar o RNA residual não transcrito em cDNA, o qual, se presente na solução de cDNA, poderia interferir negativamente na amplificação (PCR). Estas misturas foram vortexadas, centrifugadas rapidamente (idem passos anteriores) e incubadas (37°C / 20 min). Os cDNAs dos VBIGs controles positivos (referência), isolados brasileiros e controles negativos (VDN e *pool* de LAs de OEG/SPF não inoculados), foram mantidos em freezer (-18°C a -25°C) até a realização da amplificação do segmento de interesse (PCR) do gene S2.

3.8.3. AMPLIFICAÇÃO DO cDNA OU REAÇÃO EM CADEIA PELA POLIMERASE (PCR)

A PCR foi realizada com os cDNAs previamente preparados (item 3.8.2) a partir dos VBIGs (referência / isolados) e controles negativos (VDN e *pool* de LAs de OEG/SPF não inoculados).

Na primeira etapa de realização da PCR, foi usada a metodologia descrita por Lin *et al.* (1991a) [realizada em um volume total de 50 μL de uma mistura contendo 10 mM Tris-HCl (pH 8,3); 1,5 mM MgCl₂; 50 mM KCl; 30 ng de cada oligo; 0,5 mM de cada dNTP; 3 μL de cDNA e 2,5 U de *Taq* DNA polimerase. O programa utilizado consistiu de: 20 ciclos, sendo cada ciclo de 1 min a 92°C para desnaturação térmica da fita dupla de DNA, 2 min a 52°C para anelamento dos oligos e 3 min a 72°C para

extensão de cadeia], variando apenas a procedência dos reagentes e equipamentos (naquele trabalho a maioria era de origem japonesa e, neste, norte-americana). Os resultados encontrados na primeira etapa mostraram que algumas modificações precisavam ser feitas ou otimizadas na metodologia original descrita por Lin *et al.* (1991a) [a banda esperada (segmento de DNA) de aproximadamente 400 pb única e forte foi obtida nos VBIGs / isolados M-41, Ark-99, UK/6-82, H-52, 208, 29-78, 319, 327, PM1, PM2 e PM4, foi única e fraca nos VBIGs / isolados A-5968 / C-46, JMK, SE-17, Iowa-97, PM3 e 200, e, nos isolados 283, 290, 297, 351, G, TII e nos controles negativos (VDN - La Sota e LAs) não houve amplificação ou nenhuma banda foi detectada].

Na segunda etapa, tecnicamente denominada “etapa de otimização da PCR”, foram testados vários parâmetros: variação na concentração final do MgCl₂ na mistura em reação (de 1 a 3 mM); variação no número de ciclos (25 a 40); variação nos tempos de duração das três fases internas de cada ciclo (desnaturação da fita de DNA → anelamento dos oligos → extensão de cadeia); variação na temperatura de anelamento (48, 50, 54, 55, 56 e 58°C) e, inclusão de um ciclo inicial de desnaturação (92°C / 3 min) e outro final para extensão de cadeia (72°C / 10 min). Além disso, foram testados um *Kit* comercial de reagentes básicos para PCR (*PCR Reagent System*, BRL ou Promega, EUA), o qual não é “um *kit* específico para o VBIG”, e enzimas *Taq* DNA polimerase de diferentes fabricantes (BRL, Promega, Pharmacia, Sigma, NEBiolabs - EUA), quantidade de cDNA ideal (0,5 a 2 μL), além de reamplificações a partir de materiais pobremente e/ou adequadamente amplificados e não do cDNA (Powell, 1995).

O estabelecimento das condições ideais de amplificação [aparecimento de banda forte única específica esperada de 400 pb em todos VBIGs estudados (referência / controles positivos e isolados) e ausência de quaisquer bandas nos controles negativos (VDN e *pool* de LAs de OEG/SPF não inoculados)] foi obtido utilizando uma

metodologia “híbrida” entre as recomendações do *Kit* comercial de reagentes básicos para PCR (PCR Reagent System, BRL, EUA) e de Lin *et al.* (1991a), sendo denominada fase final da otimização. Para cada cDNA individual (VBIG / isolado), a PCR foi realizada dentro de um microtubo novo (500 µL, tipo PCR, estéril, livre RNases/DNases, Eppendorf, Alemanha) em um volume total de 50 µL contendo 5 µL de tampão de PCR 10 X [(sem MgCl₂ e com Triton) - 50 mM Tris-HCl (pH 8,0) + 100 mM de NaCl, + 0,1 mM EDTA + 1 mM DTT + 50% glicerol + 1% Triton X-100 (Promega, EUA)]; 4 µL de uma solução de MgCl₂ (25mM) (Promega, EUA); 1 µL de uma mistura de dNTP's (com 10mM de cada um dos dATP, dTTP, dCTP e dGTP) (BRL ou Promega, EUA); 1 µL de cada oligo (10 µM) (NEBiolabs, EUA); 2 µL de cDNA; 0,5 µL (2,5 U) de *Taq* DNA polimerase (Promega, EUA) e 35,5 µL de água 18MΩ (estéril e livre de RNases/DNases). Em seguida, a mistura foi homogeneizada rapidamente (ponteira com barreira contra aerossol) e coberta com duas gotas (30-40 µL) de óleo mineral (livre RNases/DNases, BRL ou Sigma, EUA). Os microtubos com as misturas preparadas foram colocados em um aparelho termociclador automático (PTC-100, MJ Research, EUA) utilizando o seguinte programa de PCR: um ciclo inicial de 94°C / 3 min, seguidos de 40 ciclos repetitivos de 92°C / 45 s, 52°C / 30 s e 72°C / 1 min e 30 s, uma etapa final a 72°C / 10 min, e resfriamento rápido a 25°C / 10 min. Os microtubos (dois / VBIG ou isolado, 50 µL cada) com material supostamente amplificado foram mantidos em freezer até a eletroforese em gel de agarose 2-3,5% e análise sobre luz ultravioleta (UV) após coloração com brometo de etídio (EtBr). Nesta última ou terceira etapa da PCR, cDNAs de todos os VBIGs (referência / isolados) foram novamente amplificados visando a obtenção de volume necessário (oito microtubos 50 µL cada / VBIG ou isolado) para uso na RFLP (análise dos produtos obtidos na restrição enzimática). Os microtubos contendo as misturas com materiais supostamente amplificados foram estocados congelados (-20°C) até

confirmação da amplificação adequada e uso na restrição enzimática.

3.9. ANÁLISE DOS PRODUTOS DA RT - PCR E POR RESTRIÇÃO ENZIMÁTICA (RFLP)

3.9.1. ELETROFORESE

Na primeira etapa da amplificação (item 3.8.3), 8 µL do material (supostamente amplificado de cada VBIG / isolado, após a RT-PCR) foram misturados com 2 µL de tampão corante de amostra [conforme Sambrook *et al.*, 1989, foi preparado com 15% de Ficoll 400; 0,03% de azul de bromofenol; e 0,03% de xileno-cianol FF, diluídos em tampão de corrida TBE 1X (100 mM de Tris-base; 2 mM de solução 0,5 M de EDTA; e 50 mM de ácido bórico anidro em água 18MΩ) (tudo livre RNases/DNases, BRL ou Sigma, EUA)] e submetidos à eletroforese em géis de agarose 2, 3 e 3,5% (4 mm espessura, corrida a 60 V / 1 h / TA com tampão de corrida TBE 1X, em aparelho de eletroforese Horizon 8•10, BRL, EUA). Após a corrida, os géis foram corados com EtBr (0,5 µg / mL em água 18MΩ) durante 15 min, analisados visualmente quanto à presença de bandas de DNA amplificado em aparelho transiluminador UV (302 nm, Macrovue, Hoefer / Pharmacia, EUA) e simultaneamente fotografados com câmera especial (GelCam, equipada com filme Polaroid 667 e filtro laranja nº 15, Polaroid / Pharmacia, EUA).

Na Segunda etapa da amplificação (item 3.8.3), além dos géis de agarose idênticos aos da primeira etapa, foram utilizados géis de poli(acrilamida) 6% na eletroforese [PAGE (*polyacrylamide gel electrophoresis*) convencional e, também, desnaturante com uréia, conforme Sambrook *et al.*, 1989; 0,7 mm espessura, corrida a 40 V / 4 h / TA, em aparelho de eletroforese duplo vertical minigel 10 x 8 cm, Sigma e/ou Pharmacia, EUA] e corados pela prata (conforme Herring *et al.*, 1982) para visualização dos produtos da RT-PCR (fase de otimização).

Na terceira e última etapa da amplificação, preferencialmente, foram utilizados géis de

agarose 3,5% como na primeira etapa, porque deram boa resolução nas etapas anteriores e são de fácil confecção, além serem atóxicos (exceto quando estavam corados pelo EtBr - mutagênico - Newton, 1995).

3.9.2. RESTRIÇÃO ENZIMÁTICA E ANÁLISE POR RFLP

A análise do perfil de restrição enzimática (RFLP - *Restriction Fragment Length Polymorphism*) dos produtos amplificados (obtidos na RT-PCR) frente às enzimas de restrição *Bst*YI, *Dde*I, *Hae*III, *Hin*clI, *Hin*fI, *Hpa*II, *Mae*III, *Sca*I e *Pst*I, sendo a *Mae*III adquirida da Boehringer Mannheim (Alemanha) e, as outras, da NEBiolabs (EUA), foi realizada com base na metodologia descrita por Lin *et al.* (1991a). Antes do uso, todas as enzimas foram testadas quanto à atividade pela restrição enzimática de 1 µg de DNA [λ DNA (bacteriófago Lambda, Sigma, EUA) e pUC19 (DNA plasmidial que confere resistência à ampicilina em *Escherichia coli*, NEBiolabs, EUA)] em condições ótimas de atividade [tampões adequados (acompanham as enzimas) e temperatura ideal de incubação: 55°C / 4 h (*Mae*III), 60°C / 4 h (*Bst*YI) e 37°C / 4 h para as outras]. As enzimas de restrição foram diluídas nos respectivos tampões, seguindo as recomendações dos fabricantes, adicionando-se 5 U de enzima a 20 µL de cada produto amplificado na RT-PCR, em um volume final de 25 µL em reação [obtido pela adição de água 18MΩ (livre RNases / DNases)].

Diferentemente de Lin *et al.* (1991a), os produtos amplificados (RT-PCR) destinados à análise por RFLP não foram trabalhados para purificação do segmento amplificado (purificação do DNA ou *amplicon* a partir do produto amplificado pelo tratamento com solução 4M de acetato de amônio e precipitação com isopropanol) e, também, não foram amplificados com oligos marcados com isótopos radioativos na extremidades 5' (fita + ou -).

As misturas (produto amplificado + enzimas) foram incubadas na temperatura de maior atividade de cada enzima. Para avaliação da restrição enzimática, as misturas foram, inicialmente, submetidas à eletroforese em géis de poliacrilamida 6% (PAGE), coradas pela prata como no item 3.9.1 (Herring *et al.*, 1982) e fotografadas sobre transiluminador de luz visível convencional [câmera fotográfica Olympus OM-2, Japão, equipada com lente macro, filtro vermelho e filme (P&B) Panatomic-X Kodak ASA 32 ou Plus-X-Pan Fuji ASA 125]. Posteriormente, devido à praticidade, todas as misturas foram submetidas à eletroforese em géis de agarose 3,5% [aparelhos de eletroforese com géis e tempos de corrida maiores - *Horizon 11•14* (TBE 1X / 75V / 2 h / TA) e *Horizon 20•25* (TBE 1X / 100 V / 4 h / TA), ambos da BRL, EUA)], analisadas e fotografadas conforme descrito na primeira etapa da eletroforese (item 3.9.1). Além da análise visual dos resultados documentados em fotografias, foi usado um programa de computador (*Software Seqaid* - DNAfrag, versão 3,03 - Schaffer & Sederoff, 1981) para se calcular o peso molecular de cada banda presente nos géis de agarose 3,5%.

3.10. RFLP COMPARADA COM DADOS OBTIDOS NA ANÁLISE DAS SEQÜÊNCIAS DO GENE S2 DISPONÍVEIS NO GENBANK E DOS RESULTADOS DE Lin *et al.* (1991a)

As seqüências (parte de interesse flanqueada pelos oligos BIGS21 e BIGS22 - segmento de DNA com 400 pb - oligos inclusos) no gene S2 dos 20 diferentes VBIGs disponíveis no GenBank [quatorze norte-americanos (M-41, M-42 / Beaudette, Ark-99, Ark-DPI, Ark-3168, Ark-3668-4, Ark-4257, C-46 / A-5968, CAV-1013, CU-T2, Fla-18288, GAV-92, JMK e SE-17), um inglês (UK/6-82), um belga (B-1648), um japonês (KB-8523) e três holandeses (D-207, D-274 e D-1466)] foram acessadas [via Internet (seqüências disponíveis no endereço eletrônico do "National Institute of Health - NCBI": <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)] e submetidas a um simulador de restrição enzimática [via Internet - WebGene (<http://darwin.bio.geneseo.edu/~yiu/webgene/RE.html>)] com as mesmas enzimas de restrição utilizadas neste estudo. Também,

embora não tenha sido possível obter os tamanhos dos fragmentos de DNA com as exatidões encontradas nas seqüências disponíveis no GenBank, foram utilizados os resultados obtidos na RFLP (mapa contendo sítios de restrição 5' → 3') do trabalho de Lin *et al.* (1991a) com sete VBIGs norte-americanos (M-41, M-42 / Beaudette, A-5968 / C-46, Holte, Gray, Iowa-97 e Iowa-609) e cinco japoneses (C-78, K-79, KH, Ishida e ON). Informações complementares adicionais importantes dos VBIGs, cujos genes S2 estão disponibilizados no GenBank e daqueles estudados por Lin *et al.* (1991a), foram colocadas na Tabela 4. Os dados obtidos na RFLP (levantamento das seqüências de interesse de VBIG disponíveis no GenBank e posterior análise por RFLP no simulador WebGene + informações sobre o mapa com sítios de restrição enzimática do trabalho de Lin *et al.*, 1991a) foram comparados com os resultados da RFLP deste trabalho (VBIGs de referência e isolados brasileiros), principalmente no tocante à presença e ausência de sítios de restrição, os quais foram denominados padrões de restrição enzimática neste trabalho (Tabela 7).

3.11. CONSTRUÇÃO DAS ÁRVORES FILOGENÉTICAS

Utilizando metodologia específica para este fim [*Software* para construção e desenho de árvores filogenéticas – “*TREECON for Windows*” - Van de Peer & De Wachter (1994) e atualizado em 1998, via Internet (<http://bioc-www.uia.ac.be/u/yvdp/treeconw.html>)], foi possível a construção (desenho) de duas árvores filogenéticas básicas: com (*rooted tree*) ou sem raiz (*unrooted tree*). Para isto, foram utilizados os resultados da RFLP dos VBIGs / isolados deste trabalho (Tabelas 6 e 10), idem para aqueles cujos genes S2 (parte flanqueada pelos oligos BIGS21 e BIGS22) estão disponíveis no GenBank (Tabela 8) e dos utilizados por Lin *et al.* (1991a) (Tabela 9). No caso de árvores com raiz, os VBIGs M-41 e H-52 foram escolhidos como parentais (raízes), separadamente (Figuras 15 e 16). Neste estudo, também foram testadas reduções nos números de enzimas de restrição

utilizadas na RFLP, quando da construção das árvores filogenéticas, visando simplificar a metodologia utilizada [por exemplo, redução de nove para cinco (*Bst*YI, *Ddel*, *Hpa*II, *Pst*I e *Scal* - Figuras 17 e 18), substituição de uma enzima (troca da *Bst*YI pela *Maell*III, mantendo cinco enzimas - Figuras 19 e 20) e redução para quatro enzimas (*Ddel*, *Hpa*II, *Pst*I e *Scal*, sem a *Bst*YI e a *Maell*III - Figuras 21 e 22)]. Árvores sem raiz, somente com os 15 isolados brasileiros, com nove e cinco enzimas de restrição utilizadas na RFLP deste trabalho, também foram construídas em duas formas de apresentação (formatos convencional retangular e circular) para um melhor entendimento da situação regional (Figuras 23, 24, 25 e 26). Outras situações foram estudadas, mas os resultados não foram aproveitados.

3.12. GENOTIPIFICAÇÃO

Visando a genotipificação dos 15 isolados brasileiros, duas árvores filogenéticas sem raiz com todos os 46 VBIGs foram construídas (com nove enzimas de restrição - Figura 27, e, com cinco enzimas de restrição - Figura 28) usando a mesma metodologia específica para este fim anteriormente descrita (item 3.11).

3.13. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Na construção das árvores filogenéticas com raiz (*rooted tree*), a estimativa da distância genética entre VBIGs foi calculada pelo método de Link *et al.* (1995) e a inferência de topologia das árvores foi realizada pelo método *Neighbor - Joining* (Saitou & Nei, 1987; Studier & Keppler, 1988). A análise *bootstrap*, aplicada após os cálculos anteriormente mencionados, confere intervalos de confiança nas filogenias, expressados conjuntamente às percentagens de distanciamentos genéticos (evolutivos) e, por isto, é uma análise estatística, considerando que verifica a confiabilidade das ramificações das árvores evolucionárias construídas (Swofford *et al.*, 1996).

Tabela 4 - Informações complementares adicionais* dos VBIGs de outros países utilizados na RFLP comparada e na construção de árvores filogenéticas.

VBIGs ^a (ESTIRPE)	Sorotipo ^b	Número de passagens (OEG/SPF) ^c	Tipo de criação ^d	Sinais clínicos principais no surto de origem ^e	Histórico de vacinação ^f
USA/M-41/41	Massachusetts	10	P	R + QP + POA	NV
USA/M-42/37 ^g	Massachusetts	>250	P (FR)	R	NV
USA/A-5968/51 (C-46)	Connecticut	ni	P	R	NV
USA/Iowa-609/52	Iowa-609	ni	P	R	NV
USA/Iowa-97/53	Iowa-97	ni	P	R	NV
USA/Holte/54	Holte	ni	P (FR)	R + SNN	V (M + C)
USA/Gray/60	Gray	ni	FC	R + SNN	V (M + C)
USA/JMK/64	JMK	ni	FC	R	V (M + C)
USA/SE-17/67	SE-17	ni	P	R + QP + POA	NV
USA/Ela-18288/70	Connecticut	ni	P	QP + POA	V (M + C)
USA/Ark-99/72	Arkansas 99	ni	FC	R	V (M + C)
USA/Ark-DPI/81	Arkansas	40	FC	R	V (M + C + J)
USA/Ark-3168/81	Arkansas	ni	FC	R	V (M + C + J)
USA/Ark-3668-4/81	Arkansas	ni	FC	R	V (M + C + J)
USA/Ark-4257/81	Arkansas	ni	FC	R	V (M + C + J)
USA/GAV-92/?	GAV	ni	FC	R	V (M + C)
USA/CAV-1013/?	CAV	ni	FC	R	V (M + C)
USA/CU-T2/94	CU-T2	ni	P	R + QP + POA	V (M + A)
UK/6-82/82 ^h	UK/6/82	ni	FC	R	V (M)
J/KB-8523/83 ⁱ	Massachusetts	ni	P (FR)	R	NV
J/KH/60	Massachusetts	10	P	R	NV
J/K-79/79	C-78 / K-79	10	P	R	V (M)
J/C-78/78 ^j	C-78 / K-79	40	P	R	V (M)
J/Ishida/60 ^j	Massachusetts	40	FC	R	NV
J/ON/74 ^j	Gray	40	FC	R + SNN	NV
B/B-1648/86	B-1648	3	FC	R + SNN	V (M)
NL/H-52/55	Massachusetts	52	P	R + QP + POA	NV
NL/D-1466/78 ^k	D-1466	>27	FC	R	V (M)
NL/D-207/79 ^l	D-207	>110	P + FC	R	V (M)
NL/D-274/79 ^l	D-274	>50	P + FC	R	V (M)

a-Identificação individual⇒País de origem (USA=United States of America-EUA; UK=United Kingdom-Reino Unido; NL=The Netherlands-Holanda ou Países Baixos; B=Belgium-Bélgica; J=Japan-Japão)/sigla ou número do VBIG/ano do isolamento do VBIG e, também, na maioria dos casos, de ocorrência do surto correspondente (exceção: o USA/A-5968/51, também é denominado C-46, devido ao ano de ocorrência do surto-1946 de isolamento foi posterior. O mesmo parece ter ocorrido com o Iowa-609 e o Iowa-97). Regiões onde ocorreram os surtos com alguns VBIGs nos países de origem= **EUA**:M-42 ou Beaudette (North Dakota), Holte (Wisconsin), Gray e JMK (Delaware), SE-17 e GAV-92 (Geórgia-o "v" da GAV é de *variant*), CAV-1013 (Califórnia), CU-T2 (Nova York); **Holanda**: H-52, D-1466, D-207 e D-274 (Doorn); **Bélgica**: B-1648 (fronteira com a França); **Japão**:KB-8523 (Wakayama), e, os KH e K-79, de granjas próximas a Tóquio (os outros são vacinas); **b**-Denominação individual de sorotipo conforme Johnson & Marquardt (1975) e Kwon *et al.* (1993a,b); **c**-OEG/SPF⇒nº de passagens em ovos embrionados (OEG) de galinha isentos de patógenos especificados (SPF)-ni=não informada em nenhuma fonte consultada, inclusive nas informações complementares adicionais e/ou básicas para realização da RFLP no GenBank e em Lin *et al.* (1991a). **d**-Tipo de criação. P=poedeira adulta; P(FR)=poedeira em crescimento (fase de recria); FC=frango de corte. **e**-Sinais clínicos principais no surto de origem: R=doença respiratória; QP=queda de postura; POA=postura de ovos anormais; SNN=síndrome nefrite-nefrose (desidratação+diarria); **f**-Histórico de vacinação nos lotes onde os VBIGs foram isolados. NV=não vacinado; V=vacinado previamente com um ou mais VBIG(s) vivo(s) atenuado(s) pertencente(s) ao(s) sorotipo(s) Massachusetts (M), Connecticut (C), Arkansas-99 (A) e/ou JMK (J). Nos VBIGs holandeses, quando era frango de corte, recebia só o VBIG vacinal atenuado H-120 (uma ou duas doses), e, quando era poedeira adulta, recebia primeiro o H-120 seguido do H-52 menos atenuado do que o outro (VBIGs atenuados vivos mas com diferentes graus de atenuação-ambos oriundos do VBIG "Holland" pertencente ao sorotipo Massachusetts); **g**-VBIG Beaudette (M-42)=devido à alta adaptação (alto número de passagens consecutivas->250) para OEG/SPF, não é mais patogênico para galinhas-é "vírus de laboratório"; **h**-VBIG isolado, a partir do surto de origem, em cultivo de anéis de traquéia de embrião de galinha SPF (CAT); **i**-VBIG adaptado a OEG/SPF e, posteriormente, clonado em cultivo celular primário de células renais de pintos SPF; **j**-VBIGs usados como vacinas vivas atenuadas no Japão; **k**-VBIG usado como vacina inativada oleosa na Holanda; **l**-VBIGs usados como vacinas vivas atenuadas e inativadas oleosas na Holanda.

*-Além do GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) e Lin *et al.* (1991a), as informações complementares adicionais foram obtidas nas seguintes referências bibliográficas: Avellaneda *et al.* (1994); Bijlenga (1956); Bins *et al.* (1986); Cavanagh *et al.* (1992); Cavanagh & Naqi (1997); Cook (1984); Davelaar *et al.* (1984); Doi *et al.* (1982); Fields (1973); Gelb *et al.* (1981); Gelb *et al.* (1983); Hoekstra & Rispens (1960); Hofstad (1958); Hofstad (1961); Hopkins (1969); Jia *et al.* (1995); Koch *et al.* (1990); Kusters *et al.* (1990); Meulemans *et al.* (1987); Sutou *et al.* (1988); Winterfield & Hitchner (1962); Winterfield *et al.* (1964); Winterfield *et al.* (1971); Zwaagstra *et al.* (1992).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. VBIGs DE REFERÊNCIA (IMPORTADOS) E OS ISOLADOS BRASILEIROS

A escolha dos isolados brasileiros, provenientes de surtos da BIG em granjas da avicultura industrial do estado de Minas Gerais e abrangendo duas décadas (período entre 1972 e 1989) desta importante atividade da pecuária nacional, visou atender a um antigo sonho no sentido de procurar entender melhor as situações que, hipoteticamente, estariam envolvidas em todo aquele processo saúde / doença. Assim, nada melhor do que estudar os isolados de VBIG que, seguramente, tiveram importante papel naqueles acontecimentos e têm muita história para contar, mas a linguagem informativa deles é diferente da humana e a idéia foi começar a interpretá-la com a metodologia molecular disponível atualmente para esta finalidade. Isto é uma das coisas importantes e positivas do futuro: poder resgatar o passado.

Os VBIGs de referência importados foram importantíssimos porque, além de ajudarem no controle das atividades de processamento do material nas diversas fases do desenvolvimento experimental, propiciaram sustentação científica ao trabalho realizado e, conseqüentemente, confiabilidade aos resultados encontrados. A utilização do banco de seqüências (GenBank) da parte de interesse do gene S2 dos VBIGs idênticos aos trabalhados (M-41, A-5968 / C-46, Ark-99, JMK, SE-17 e UK/6-82) foi de fundamental importância neste trabalho por aumentar o grau de confiabilidade, inclusive na metodologia utilizada (funcionaram como controles, praticamente, em todas as etapas experimentais). Dos VBIGs vacinais atenuados utilizados na avicultura industrial brasileira, os quais poderiam ter sido adquiridos no comércio ou diretamente nos laboratórios que os produzem, optou-se apenas pelo H-52 em razão do fato de ser um vírus - semente original procedente de uma fonte confiável (Departamento de Agricultura dos Estados Unidos da América - USDA/EUA). Os VBIGs vacinais,

principalmente quando são atenuados e, quase sempre, são intensamente manipulados nos laboratórios que os produzem, muitas vezes geram resultados diferentes dos esperados em função da seleção involuntária de mutantes e clones, situação que pode não interferir diretamente na eficiência vacinal mas seguramente prejudica a análise final em trabalhos com biologia molecular, conforme observado por outros autores (Dalton *et al.*, 1998; Kim *et al.*, 1998; Kusters *et al.*, 1989a,b; Kusters *et al.*, 1990; Song *et al.*, 1998; Stirrups *et al.*, 1998; Wang & Tsai, 1996). A metodologia utilizada permitiu detectar os VBIGs adquiridos com o propósito de serem referência (controles positivos) mas que, na verdade, estavam contaminados / trocados por outros, provavelmente no laboratório onde foram processados anteriormente (JMK, SE-17 e Iowa-97 – SPAFAS, EUA). Ao contrário do que pode parecer, esta situação aumentou ainda mais o grau de confiabilidade dos resultados encontrados por terem sido detectados tais problemas (contaminação entre VBIGs) no momento certo (RFLP comparada).

4.2. REPLICAÇÃO E CONCENTRAÇÃO VIRAL

Dentro da linha de pesquisa “Diagnóstico, epidemiologia e controle das doenças dos animais” do DMVP / EV / UFMG, os estudos já realizados pelo Grupo de Pesquisa em Saúde Avícola do Setor de Doenças das Aves, envolvendo alguns aspectos básicos e aplicados do VBIG, permitem afirmar que a metodologia utilizada (replicação e concentração viral objetivando a detecção deste vírus por RT-PCR) foi além da necessária para um teste desta natureza (bastariam poucos microlitros de LA - OEG/SPF contendo virions completos para que os resultados fossem os mesmos). A justificativa para a adoção de toda aquela metodologia laboriosa inicial deste trabalho foi que, até no momento de sua execução, o recomendado era concentrar o VBIG por ultracentrifugação em colchão ou gradiente de sacarose visando a purificação viral (Andreasen *et al.*, 1991; Jia *et al.*, 1995; Kwon *et al.*, 1993a,b; Lin *et al.*, 1991a; Sutou *et al.*, 1988; Zwaagstra *et al.*, 1992)

para extração do RNA viral puro, condição que era considerada vital para a realização de uma adequada RT-PCR livre de inibidores (Andreasen *et al.*, 1991; Lin *et al.*, 1991a). A decisão de realizar a concentração dos LAs de OEG/SPF contendo VBig por desidratação foi tomada mais pela praticidade, indisponibilidade de ultracentrífuga, intuição de que este obstáculo não poderia ser o principal entrave para um teste tão genial (jamais seria utilizado no diagnóstico rotineiro, caso dependesse de ultracentrífuga) do que pela confiabilidade prévia no sucesso da técnica. Felizmente, a escolha foi correta (Abreu, 2000; Resende *et al.*, 1998) e daria certo de qualquer jeito (uso direto do LA com VBig sem concentração ou, por exemplo, após concentração por precipitação com solução saturada de sulfato de amônio - ambas testadas e aprovadas, posteriormente, mas os resultados não são apresentados aqui), desde que a integridade viral fosse mantida até o momento da extração adequada do RNA viral, acompanhado de outros RNAs ou puro. Os passos posteriores, realmente, foram os mais importantes e exigiram maiores cuidados, principalmente aqueles previstos nos protocolos de execução, caso a caso.

4.3. EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DO RNA TOTAL (INCLUINDO O VIRAL)

O RNAtiv extraído com a metodologia utilizada neste trabalho permaneceu íntegro e o emprego do produto comercial denominado "Trizol LS" (BRL, EUA) foi de fundamental importância, principalmente por ser altamente eficiente e rápido (passo único), diferentemente das recomendações publicadas para extração de RNA de VBig até aquele momento (Andreasen *et al.*, 1991; Jackwood *et al.*, 1992; Kwon *et al.*, 1993a,b; Lin *et al.*, 1991a). A manipulação do RNAtiv, durante a realização da espectrofotometria para dosagem de sua concentração final e diluição para uso na RT, recomendada por Jackwood *et al.* (1992) e Lin *et al.* (1991a), foi importante mas, dentro da filosofia original da RT-PCR (rapidez, simplicidade e amplificação a partir de um único RNA transcrito em cDNA, teoricamente), pareceu um contra-senso

naquele momento. Ocorreu uma grande variação nas concentrações ($\mu\text{g} / \text{mL}$) dos RNAtiv_s individuais dos VBig_s / isolados [M-41 (196), A-5968 / C-46 (76), JMK (66), SE-17 (54), UK/6-82 (40), Ark-99 (64), H-52 (138), Iowa-97 (40), 208 (98), 29-78 (118), 283 (138), 290 (60), 297 (46), 319 (126), 327 (134), 351 (40), PM1 (140), PM2 (148), PM3 (80), PM4 (62), G (80), TII (66), 200 (138) e, também, dos controles negativos VDN - La Sota (40) e o *pool* de LAs (14) - a percentagem de pureza do RNA variou de 74 a 87% nos RNAtiv_s, inclusive nos controles negativos, conforme obtido com a utilização da metodologia descrita no item 3.7], o que era esperado com base nas informações da literatura consultada (Andreasen *et al.*, 1991; Jackwood *et al.*, 1992; Kwon *et al.*, 1993a,b; Lin *et al.*, 1991a). A implicação direta desta variabilidade natural nas concentrações dos RNAtiv foi a necessidade do uso de concentrações também variáveis dos RNAtiv individuais na RT [concentração mínima de 0,14 μg (*pool* de LAs) e máxima de 1,96 μg (M-41) por reação (20 μL), após diluição], sendo que o recomendado era o uso de 1 a 5 μg de RNAtiv por RT (BRL, 1993a; Lin *et al.*, 1991a). Os resultados posteriores (RT-PCR, após otimização) mostraram que esta variação não interferiu nos resultados esperados, a julgar pela amplificação normal dos cDNAs de dois VBig_s de referência (controles positivos - M-41 e H-52) e quatro isolados brasileiros (283, 327, PM1 e PM2) com altas concentrações de RNAtiv, os quais, paralelamente ao trabalho normal, foram diluídos (água 18M Ω livre RNases/DNases) e submetidos à RT nas concentrações mínimas trabalhadas (0,14 $\mu\text{g} / 10 \mu\text{L} / \text{RT}$), visando comprovar a eficiência da metodologia utilizada mesmo quando o total de RNAtiv estava muito abaixo do recomendado. Certamente, nem todo o RNAtiv pertencia ao VBig e, também, dificilmente estava 100% puro, além de nem todos estarem íntegros (degradação ocorre com relativa frequência durante a remoção da nucleoproteína N protetora do RNA) (Adzhar *et al.*, 1996; Newton, 1995; Resende *et al.*, 1998).

4.4. SÍNTESE DE cDNA (DNA COMPLEMENTAR) / TRANSCRIÇÃO REVERSA E REAÇÃO EM CADEIA PELA POLIMERASE (RT-PCR)

4.4.1. OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES (OLIGOS)

Uma das razões da escolha dos oligos originalmente descritos por Lin *et al.* (1991a) para uso neste trabalho deveu-se ao fato que flanqueiam uma região altamente conservada do genoma do VBig e isto possibilitaria um interessante estudo filogenético dos isolados brasileiros (a partir do material amplificado e submetido à análise por RFLP). Os oligos (BIGS21 e BIGS22) utilizados neste trabalho foram comparados às seqüências de DNA disponíveis no GenBank (*Database: non-redundant* PDB + GenBank + EMBL + DDBJ) usando o programa BLAST (Altschul *et al.*, 1990) disponível no endereço eletrônico do “National Institute of Health - NCBI”: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>. O oligo BIGS22, por pertencer à fita complementar reversa (-), foi analisado em sua fita complementar invertida (5' - C TCG TGA ATA TAA TGG TTT GCT - 3'). Para o BIGS21, ocorreram similaridades (entre as seqüências de 22 bases) nas seguintes percentagens: VBIGs disponíveis (genomas integrais ou parciais disponíveis mas sempre dentro da parte de interesse do gene S2 - codificador da gp S2) - 100% para os VBIGs M-41, M-42, UK/6-82, KB-8523, D-207 e D-274; 96% para os Ark-99, B-1648 e A-5968 / C-46; 87% para o CU-T2, e, 82% para o D-1466. Foram encontradas percentagens menores de similaridade com outros organismos, como por exemplo, 87% com uma parte do genoma de um *Rhinovirus* humano, 86% com a levedura *Saccharomyces cerevisiae*, 82% com o vírus do papiloma humano, 73% com o *Bacillus subtilis* e a *Musca domestica*, e 66% com a *Drosophila melanogaster*. Com o BIGS22 ocorreram similaridades (entre as seqüências de 22 bases) nas seguintes percentagens: VBIGs disponíveis (genomas integrais ou parciais mas sempre dentro da parte de interesse do gene S2) - 100% para os VBIGs M-41, M-42, Ark-99, UK/6-82, KB-8523, D-207 e D-274; 96% para os A-5968 /

C-46, 91% para o CU-T2, 87% para o B-1648, e, 73% para o D-1466, 82% com *Bacillus fragilis*, 83% com duas diferentes *Escherichia coli*, e outros mais (nematódeos, vírus de outras espécies animais, plantas, etc.), em lista extensa mas com porcentagem decrescente de similaridade, e que, provavelmente, não devem ter chegado à área de trabalho e, conseqüentemente, não são apresentados, sendo esta consideração final válida, também, para o BIGS21. Com a disponibilização de novas seqüências completas do gene S2 de outros VBIGs (disponíveis no GenBank em março e maio de 2000), outra pesquisa de similaridade dos oligos utilizados neste trabalho foi realizada e os resultados foram: para o BIGS21, 96% para os VBIGs JMK, SE-17, Ark-DPI, Ark-3168, Ark-3668-4, Ark-4257, GAV-92 e Fla-18288; 91% para o CAV-1013; para o BIGS22, foram: 100% para os JMK, SE-17, Ark-DPI, Ark-3168, Ark-3668-4, Ark-4257, CAV-1013 e GAV-92; 96% para Fla-18288. Com base no alinhamento comparativo [similaridade maior possível (100%) ou a menor encontrada (73%) - teoricamente perigosa (dúvida porque não foi testada, na prática, neste trabalho) em uma RT-PCR usada no diagnóstico de rotina] dos dois oligos frente às seqüências (parte de interesse do gene S2) dos VBIGs disponíveis no GenBank, ficou claro que sua escolha foi acertada, mesmo se fossem considerados apenas os resultados do primeiro levantamento de similaridade comparativa (fevereiro de 1995) e a despeito da situação atípica encontrada com o VBig D-1466. Não foi objetivo deste trabalho propor e testar novos oligos que flanqueassem a mesma região estudada ou uma parte interna dela (“nested - PCR”, por exemplo), outras regiões do mesmo gene ou todo o gene codificador da gpS2, mas este trabalho deve ser realizado no futuro para ampliar o conhecimento sobre estes isolados brasileiros do VBig e outros mais, se possível.

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

Os resultados desta etapa do trabalho somente foram avaliados após a realização da amplificação do cDNA (PCR) e, conforme relatado no próximo item (4.4.3), foram um sucesso, independente da grande variação individual nas concentrações dos RNAtivs (descrita no item 4.3). A utilização de um *kit* para esta finalidade específica (*Kit SuperScript II RT RNase H⁻ System*, BRL, USA) simplificou esta fase experimental e garantiu sua execução sem tropeços, reforçada com o uso adicional de um inibidor de RNases (RNasin, 40 U / μ L, Promega, EUA), o qual não acompanha o *kit* mas é recomendado por diversos autores para garantir a síntese de cDNA (Adzhar *et al.*, 1996; Jackwood *et al.*, 1997; Kwon *et al.*, 1993a; Song *et al.*, 1998; Wang & Tsai, 1996). Durante este trabalho, os cDNAs (2 x 20 μ L / VBIG e/ou isolado) ficaram estocados congelados em freezer e, durante quatro anos, foram congelados e descongelados por cerca de dez vezes, sem que tenham ocorrido problemas com sua amplificação (PCR) devido à degradação do cDNA. Os cDNAs, devido às ínfimas quantidades produzidas na RT, não têm suas concentrações determinadas para uso na PCR para o VBIG e o ajuste da quantidade de uso (μ L) deve ser feito durante a fase de otimização da RT-PCR (Adzhar *et al.*, 1996; Andreasen *et al.*, 1991; Jackwood *et al.*, 1997; Kwon *et al.*, 1993a,b; Lin *et al.*, 1991a; Song *et al.*, 1998; Wang & Tsai, 1996; Zwaagstra *et al.*, 1992).

4.4.3. AMPLIFICAÇÃO DO cDNA OU REAÇÃO EM CADEIA PELA POLIMERASE (PCR)

Os resultados da primeira e da segunda etapa (otimização) da PCR, assim como o detalhamento das atividades nelas realizadas, encontram-se descritos e relatados no item 3.8.3 do Material e Métodos. Apesar de importantes, os resultados destas duas etapas não serão apresentados aqui pelo entendimento que são inerentes ao adequado uso de uma técnica desta natureza (Belák & Ballagi-

Pordány, 1993; Binns, 1993; Deacon & Lah, 1989; Gravitt & Manos, 1993; Jackwood, 1992; Newton, 1995; Pfeffer *et al.*, 1995; Rodriguez & Schudel, 1993) e a extensa documentação fotográfica dos diversos géis de eletroforese (cada alteração mínima gerava um novo gel), destinada à análise subsequente visando a otimização da PCR, nada acrescentaria ao conteúdo realmente útil desta parte do trabalho.

Na primeira etapa, durante a qual foi utilizado o programa de amplificação proposto por Lin *et al.* (1991a) sem modificações, as amplificações dos cDNAs geraram produtos com bandas únicas esperadas e fortes, com aproximadamente 400 pb, nos VBIGs / isolados M-41, Ark-99, UK/6-82, H-52, 208, 29-78, 319, 327, PM1, PM2, PM3, PM4 e 200, e, nos VBIGs A-5968 / C-46, JMK, SE-17 e Iowa-97, geraram banda única e fraca. Os cDNAs dos isolados 283, 290, 297, 351, G e TII não amplificaram e, felizmente, os controles negativos [especificidade (VDN - La Sota) e sistema de produção viral (*pool* de LAs de OEG/SPF não inoculados)] também não. Corroborando com os resultados da primeira etapa deste estudo (seis em 15 isolados brasileiros não amplificaram), Wang & Tsai (1996), utilizando a mesma metodologia descrita por Lin *et al.* (1991a), somente amplificaram seis dentre 14 isolados de VBIG em Taiwan e os resultados podem ser atribuídos ao fato de que não otimizaram a técnica, principalmente no tocante ao número de ciclos repetitivos (\cong 20). Não foi possível comprovar a ligação dos resultados variáveis encontrados durante a primeira etapa de amplificação deste trabalho com o único fator que comprovadamente variou: as concentrações dos RNAtivs e, conseqüentemente dos cDNAs, mas este problema já foi comprovado quando o cDNA se destina a gerar segmentos amplificados acima de 1.500 pb (Adzhar *et al.*, 1996).

Na segunda etapa, a utilização de *kit* comercial de reagentes básicos para PCR (PCR Reagent System, BRL ou Promega, EUA - não é *kit* de diagnóstico por RT-PCR específico para o VBIG) ou de enzima *Taq* DNA polimerase que é comercializada acompanhada de soluções prontas (tampão

de PCR 10 X com 1% de Triton X-100 + solução 25 mM MgCl₂, Promega, EUA), simplificou e colaborou positivamente na otimização do sistema (Powell, 1995; Resende *et al.*, 1998). A suspeita de que o programa de amplificação de Lin *et al.* (1991a) continha um número insuficiente de ciclos repetitivos (20), além da ausência dos ciclos inicial de desnaturação e final para extensão de cadeia, foi comprovada como verdadeira quando os produtos fracamente ou não amplificados foram reamplificados (novos 20 ciclos repetitivos - totalizando 40, mesmo microtubo, apenas adicionando, novamente, a *Taq* DNA polimerase) com aparecimento da banda esperada única e forte, à exceção dos controles negativos que não amplificaram. Corroborando com os resultados obtidos neste trabalho com a otimização (23 em 23 amplificaram), Adzhar *et al.* (1996) usaram os mesmos oligos de Lin *et al.* (1991a), mas com um programa de amplificação também modificado (ciclos inicial e final e 35 ciclos repetitivos), e conseguiram amplificar 41 VBIGs / isolados oriundos de diversos países [Austrália (1), EUA (5), França (1), Holanda (6 + 2 VBIGs vacinais), Inglaterra & Escócia (19 + 2 VBIGs vacinais), Japão (3), Portugal (2)].

Após a segunda etapa, foi realizada a última etapa de PCR, na qual foram obtidos grandes volumes de materiais amplificados individuais para uso na RFLP (demandou grandes volumes de material amplificado em decorrência de repetições por possíveis erros de pipetagem, na montagem dos géis de eletroforese, documentação fotográfica, etc.). Conforme esperado (Lin *et al.*, 1991a,b; Resende *et al.*, 1998), após a otimização, produtos com bandas únicas de aproximadamente 400 pares de bases (pb) foram obtidos nos oito VBIGs importados (referência) e, também, nos quinze isolados brasileiros submetidos à RT-PCR para o VBIG neste trabalho (Figura 5). Aparentemente, nenhuma deleção ou inserção com alteração significativa no tamanho do produto amplificado dos VBIGs estudados (referência e isolados brasileiros) foi detectada (teoricamente, os produtos obtidos teriam < 400 pb ou > 400 pb, respectivamente), situação que, também, foi encontrada em estudos que utilizaram os

mesmos oligos (Adzhar *et al.*, 1996; Lin *et al.*, 1991a,b). A extrema exatidão de tamanho (sempre 400 pb) encontrada nas seqüências (parte do gene S2 flanqueada pelos oligos BIGS21 e BIGS22) que estão disponíveis no GenBank (Tabela 11 - total de 20 VBIGs: M-41, M-42 / Beaudette, C-46 / A-5968, JMK, SE-17, Ark-99, Ark-DPI, Ark-3168, Ark-3668-4, Ark-4257, Fla-18288, UK/6-82, CAV-1013, GAV-92, KB-8523, CU-T2, D-1466, D-207, D-274, B-1648), a despeito do fato de que alguns deles são comprovadamente variantes (B-1648, CAV-1013, D-1466, D-207, D-274, GAV-92 e UK/6-82) e/ou recombinantes (CU-T2 e KB-8523) e poderiam ter alterações significativas no tamanho do segmento de DNA estudado, permite afirmar que os isolados brasileiros tiveram amplificado um segmento de exatos 400 pb, até prova contrária. O que variou, até onde a metodologia utilizada permitiu elucidar, foram substituições de nucleotídeos e que, algumas delas, foram detectadas pela restrição enzimática (RFLP - item 4.5). Estes resultados confirmaram o caráter de uso universal proposto por Adzhar *et al.* (1996) para os oligos BIGS21 e BIGS22 utilizados originalmente por Lin *et al.* (1991a) na amplificação de parte do gene codificador da gpS2 do VBIG, a julgar pela detecção dos quinze isolados brasileiros (Figura 5). Conseqüentemente, também até prova contrária, pode-se afirmar que a RT-PCR utilizada e modificada (após a otimização), pode identificar isolados suspeitos de serem VBIG e teria aplicação no diagnóstico rápido de rotina (24 - 48 h), diretamente a partir do LA (não concentrado - resultados não publicados) de OEG/SPF inoculados previamente (48 - 72 h) com material suspeito de conter VBIG. Por sua vez, a quantidade (extraída e utilizada) de RNAtiv na síntese de cDNA não precisaria ter sido determinada, conforme a metodologia descrita por Abreu (2000).

Outros vírus que podem infectar o mesmo sistema ideal de isolamento do VBIG (OEG/SPF) e que, portanto, deveriam fazer parte dos controles negativos deste trabalho, como por exemplo, os vírus da doença infecciosa bursal (RNA - VDIB ou Gumboro), da EDS-76 (*Egg Drop Syndrome*)

- adenovírus, DNA, vacinal, adaptado a este sistema) e da laringotraqueíte infecciosa das galinhas (herpesvírus, DNA), todos com muitos dos seus genes completos já publicados no GenBank, não foram empregados porque, a exemplo de outros coronavírus que sabidamente não infectam OEG/SPF (murino, canino, suíno, bovino, peru, etc.), sequer foram detectados no levantamento de similaridade comparativa dos oligos (item 4.4.1), mas os três primeiros (Gumboro, EDS-76 e Laringotraqueíte) já foram testados anteriormente (Wang & Tsai, 1996) quanto à especificidade no tocante aos oligos usados neste trabalho.

A técnica modificada (otimizada) precisa ser testada com materiais coletados diretamente de galinha proveniente de

granja com surto suspeito de BIG [orgão(s) do(s) sistema(s) - alvo(s) do VBIG; *swabs* (traquéia, cloaca); etc. - Gelb *et al.*, 1987; Gelb, 1989] e ajustes serão necessários nestes casos, inclusive no que se refere ao título mínimo de VBIG detectável ou prova de sensibilidade de técnica (Adzhar *et al.*, 1996; De Wit, 2000). Entretanto, o isolamento do VBIG [OEG/SPF (Cunningham *et al.*, 1973; Villegas, 1985) e CAT (Cook *et al.*, 1979; Darbyshire *et al.*, 1976; Epiphany, 1998)] é essencial porque permite outros estudos (patogenia; desenvolvimento de vacinas convencionais autóctones; etc.) com o(s) isolado(s) e que normalmente não poderiam ser realizados simplesmente com a detecção molecular (Cavanagh & Naqi, 1997; Dhinakar Raj & Jones, 1997; Resende *et al.*, 1989; Resende *et al.*, 1998).

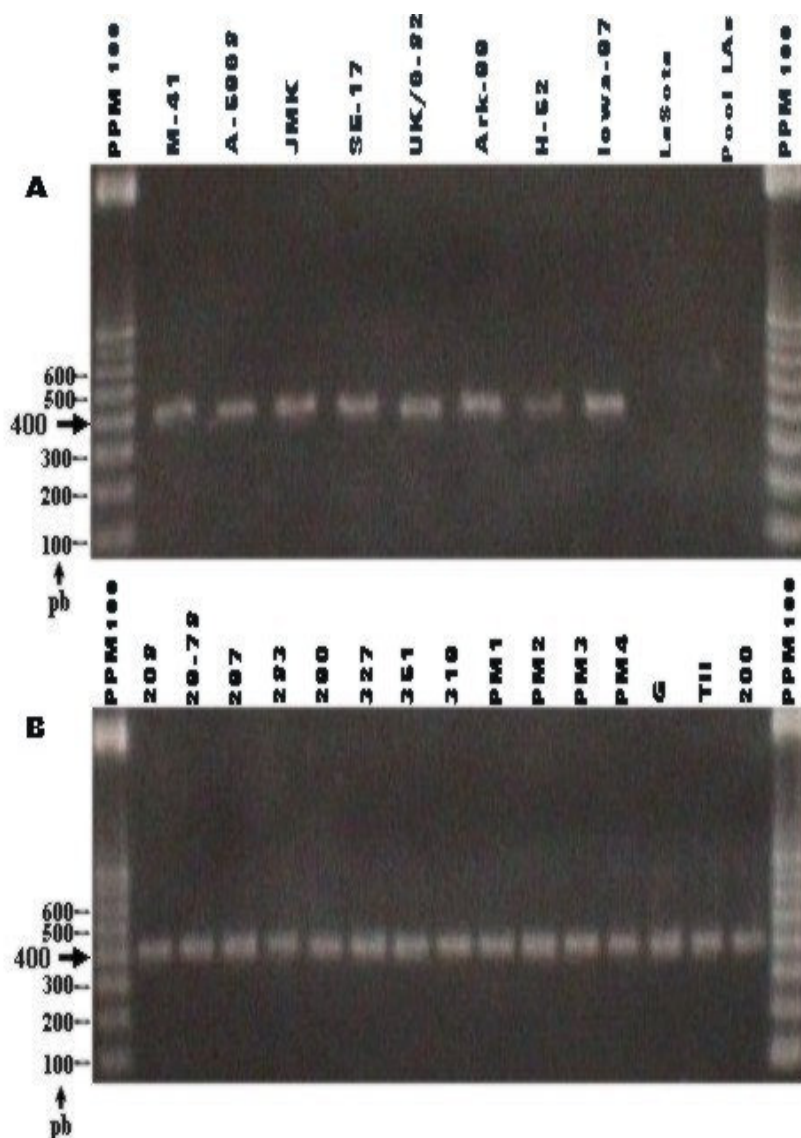


Figura 5 - Eletroforese dos produtos da RT-PCR. Visualização, sob luz UV, dos géis de agarose 3,5% corados com EtBr após eletroforese dos produtos amplificados (parte do gene S2) obtidos de 23 VBIgGs (PPM 100: padrão molecular de fragmentos de DNA fita dupla de diferentes tamanhos - 100 *bp* DNA *Ladder*; pb: pares de bases). Gel A - Oito VBIgGs de referência e dois controles (negativos) de especificidade (VDN - La Sota) e de sistema (*pool* de LAs de OEG/SPF). Gel B - Quinze isolados brasileiros.

4.5. RESTRIÇÃO ENZIMÁTICA E ANÁLISE POR RFLP

Após a realização da RT-PCR para obtenção de volume de material amplificado (400 µL / VBIG), fez-se a confirmação da amplificação da banda de interesse (única, forte e esperada com \cong 400 pb) principalmente pela eletroforese em géis de agarose 3,5% (no início, foi utilizada eletroforese em géis de poliacrilamida 6%, conforme Lin *et al.*, 1991a) e posteriormente corados com EtBr e fotografados sobre luz UV para análise (Newton, 1995; Sambrook *et al.*, 1989). Visando detectar pequenas diferenças (a substituição de até mesmo um simples nucleotídeo pode induzir ou inibir a restrição por uma determinada enzima) dentro dos DNAs amplificados dos diferentes VBIGs / isolados, os produtos da amplificação foram submetidos à restrição enzimática (RE) com nove enzimas de restrição (*Bst*YI, *Dde*I, *Hae*III, *Hinc*II, *Hinf*I, *Hpa*II, *Mae*III, *Pst*I e *Sc*I), conforme recomendado (Lin *et al.*, 1991a), mas sem purificar o DNA amplificado de cada VBIG / isolado ou usar marcação das extremidades dos oligos com isótopo radioativo, em uso alternado e em PCRs diferentes (duas PCRs / VBIG / ainda durante a amplificação para produção de volume). A purificação do DNA amplificado [corte de banda específica e posterior purificação em *kit* adequado para esta finalidade (utilizado por Kwon *et al.*, 1993a - DNA do gene S1) ou purificação por precipitação similar à extração de RNAtiv deste trabalho (Lin *et al.*, 1991a)] é necessária quando a otimização da RT-PCR não foi adequada [presença de banda(s) inespecífica(s) e/ou uso de isótopos radioativos - se não for purificado, não se consegue foto/radiografar e analisar adequadamente nem o produto amplificado e nem os fragmentos de DNA após RFLP], o que não foi o caso deste trabalho. A marcação dos oligos com isótopos radioativos, em uso alternado (ora o oligo direto, ora o reverso, em duas ampliações distintas por cDNA de cada VBIG / isolado) conforme Lin *et al.* (1991a), visando determinar com exatidão qual banda pertencia à extremidade 5' ou à 3' durante a RFLP, sequer foi tentada neste trabalho

porque, mesmo adquirindo o enxofre (S^{35}) por três vezes consecutivas na Amersham - Inglaterra (na primeira aquisição, o piloto recusou a embarcar o material; noutra, o material foi para Santiago - Chile; e, na última, chegou seis meses antes da data combinada), foi impossível realizar a tarefa. Felizmente, graças ao uso de várias enzimas de restrição e das informações obtidas nas seqüências de interesse dos vinte VBIGs disponibilizadas no GenBank, principalmente dos VBIGs de referência e de procedência confiável (M-41, A-5968 / C-46, Ark-99 e UK/6-82), foi possível montar a RFLP comparada e contornar, satisfatoriamente, a situação descortinada sem prejudicar os objetivos originais do trabalho.

Os produtos amplificados pela RT-PCR e submetidos à restrição enzimática, geraram diversos fragmentos de DNA, os quais foram visualizados e fotografados após eletroforese em gel de agarose 3,5% corado com EtBr: *Bst*YI (Figura 6), *Dde*I (Figura 7), *Hae*III (Figura 8), *Hinc*II (Figura 9), *Hinf*I (Figura 10), *Hpa*II (Figura 11), *Mae*III (Figura 12), *Sc*I (Figura 13), e *Pst*I (Figura 14). Com base nos resultados encontrados na restrição enzimática (RFLP), antes da elaboração da RFLP comparada e, conseqüentemente, da determinação dos padrões de restrição enzimática (PRE), foi possível determinar quais "VBIGs e isolados" foram "cortados ou não" pelas enzimas utilizadas e, até, pequenas diferenças nos padrões de corte foram detectadas. A *Bst*YI, cujo sítio de restrição é (A ou G)↓GATC(T ou C), gerou um padrão de restrição enzimática (PRE) único: cinco VBIGs de referência (A-5968 / C-46, JMK, SE-17, UK/6-82 e Ark-99) e quatro isolados brasileiros (327, PM3, PM4 e 200) foram cortados, enquanto os outros 14 não (Figura 6). Com a *Dde*I, cujo sítio de restrição é C↓T(A ou T ou C ou G)AG, todos foram cortados e quatro PRE distintos foram encontrados: um primeiro com a maioria dos VBIGs e isolados (M-41, A-5968 / C-46, JMK, SE-17, UK/6-82, Ark-99, Iowa-97, 208, 327, 319, PM1, PM2, PM4 e 200), um segundo com os 297, 283 e 290, um terceiro com os 351, G e TII e um quarto

com os H-52, 29-78 e PM3 (Figura 7). A *HaeIII*, cujo sítio de restrição é $\underline{GG\downarrow CC}$, gerou dois PRE distintos: um com a maioria dos VBIGs e isolados (M-41, A-5968 / C-46, JMK, SE-17, UK/6-82, Ark-99, Iowa-97, 208, 327, 319, PM1, PM2, PM4 e 200) e outro com os 297, 283, 290, 351, G e TII, enquanto os H-52, 29-78 e PM3 não foram cortados (Figura 8). A *HincII*, cujo sítio de restrição é $\underline{GT(T\text{ ou }C)\downarrow(A\text{ ou }G)AC}$, gerou um resultado bem simples: ou cortou com um PRE único (M-41, A-5968 / C-46, JMK, SE-17, UK/6-82, Ark-99, Iowa-97, 208, 327, 319, PM1, PM2, PM3, PM4 e 200) ou não (H-52, 29-78, 297, 283, 290, 351, G e TII) (Figura 9). A *Hinfl*, cujo sítio de restrição é $\underline{G\downarrow A(A\text{ ou }T\text{ ou }C\text{ ou }G)TC}$, curiosamente, cortou todos os 23 VBIGs / isolados estudados com um mesmo PRE e não ajudou a diferenciar os VBIGs / isolados (Figura 10). A *HpaII*, cujo sítio de restrição é $\underline{C\downarrow CCGG}$, também, gerou um resultado bastante simples: ou cortou com um PRE único (M-41, H-52, Iowa-97, 208, 29-78, 327, 319, PM1, PM2, PM3, PM4 e 200) ou não (A-5968 / C-46, JMK, SE-17, UK/6-82, Ark-99, 297, 283, 290, 351, G e TII) (Figura 11). A *MaeIII*, cujo sítio de restrição é $\underline{\downarrow GT(A\text{ ou }T\text{ ou }C\text{ ou }G)AC}$, gerou dois PRE distintos (um com os M-41, UK/6-82, Ark-99, 208, 351, 319, PM1, PM2, G e TII, e outro com os 297, 283 e 290) ou não cortou (A-5968 / C-46, JMK, SE-17, H-52, Iowa-97, 29-78, 327, PM3, PM4 e 200) (Figura 12). A *MaeIII* foi a única enzima cuja aquisição e uso foram problemáticos (produção demorada, sob encomenda e muito cara – atualmente, tem sido fabricada e/ou comercializada pela Pharmacia a um custo dez vezes menor). Até por este motivo, não foi possível a necessária repetição da restrição enzimática e, também, uma adequada documentação fotográfica, mas os resultados obtidos mostraram-se corretos, conforme verificado após a RFLP comparada (GenBank + WebGene e Lin *et al.*, 1991a). Com a *PstI*, cujo sítio de restrição é $\underline{CTGCA\downarrow G}$, dois PRE distintos foram gerados (um com os VBIGs / isolados M-41, Ark-99, H-52, Iowa-97, 208, 29-78, 327, 319, PM1, PM2, PM3, PM4 e 200, e, outro, com os A-5968 / C-46, JMK, SE-17, UK/6-82, 297, 283 e 290) e os isolados 351,

G e TII não foram cortados (Figura 13). A *Scal*, cujo sítio de restrição é $\underline{AGT\downarrow ACT}$, nos VBIGs / isolados que foram cortados, gerou, também, dois PRE distintos (um com os UK/6-82, 297, 283, 290, 351, G e TII, e, outro, com os A-5968 / C-46, JMK e SE-17) e, os outros, não foram cortados (Figura 14). Os resultados encontrados (Tabelas 5, 6 e 10) foram sempre os mesmos em três repetições distintas de restrição enzimática (única exceção foi a *MaeIII* - só foi possível adquirir 50 U, suficiente para uma única RFLP), inclusive com produtos amplificados em diferentes ampliações (PCR), mostrando que eles foram confiáveis e reprodutíveis, como, também, conseqüentemente, a metodologia utilizada na obtenção dos mesmos. Nesta fase, os problemas com os VBIGs de referência (controles positivos) JMK, SE-17 e Iowa-97 utilizados neste estudo ainda não haviam sido detectados (com certeza, somente foram confirmados após a RFLP comparada - item 4.6), apenas havia a questão da similaridade dos resultados da RFLP dos JMK e SE-17 com o do A-5968 / C-46, principalmente por causa do PRE encontrado nestes VBIGs após a restrição enzimática (*BstYI*, *DdeI* e *Hinfl* - Tabela 10).

Na tentativa de calcular o tamanho exato de cada banda (fragmento de DNA) no gel de agarose 3,5%, independente de sua posição no gene (5' → 3'), foi usado um programa de computador (*Software Seqaid* - DNAfrag versão 3,03), especialmente desenvolvido para medições dos tamanhos dos fragmentos (DNA e/ou proteína) em géis de agarose e/ou SDS-PAGE (Schaffer & Sederoff, 1981). Para isto, nas fotografias dos géis, primeiramente, foram medidos com uma escala milimetrada os deslocamentos das bandas do padrão molecular de fragmentos de DNA fita dupla de diferentes tamanhos (PPM 100 = 100 bp DNA *Ladder*) e, posteriormente, o deslocamento das bandas dos VBIGs. De posse dos resultados dos tamanhos dos fragmentos do padrão molecular (tamanhos reais: 100, 200, 300 e 400, e os calculados: 106, 203, 266 e 430), foi montada uma curva padrão. O desvio padrão individual e, finalmente, o médio, foi calculado, ficando em torno de 22,57 pares de bases (pb).

Traduzindo, com este desvio padrão, a banda calculada como tendo 106 pb teve um erro de mais ou menos 22,57 pb, ou seja, o tamanho estimado variou de 83,43 até 128,57 pb. Como o cálculo tornou-se difícil em decorrência do fato de que o total dos fragmentos de DNA obtidos na restrição enzimática quase sempre ultrapassou os 400 pb de cada VBIG, além de que as

bandas abaixo de 100 pb tiveram baixa resolução e os erros foram grandes (resultados não apresentados), os cálculos visuais foram implementados (Tabela 5). O ideal seria um programa que fizesse os cálculos diretamente a partir das fotografias (hoje está disponível), mas não foi possível obtê-lo para uso neste trabalho.

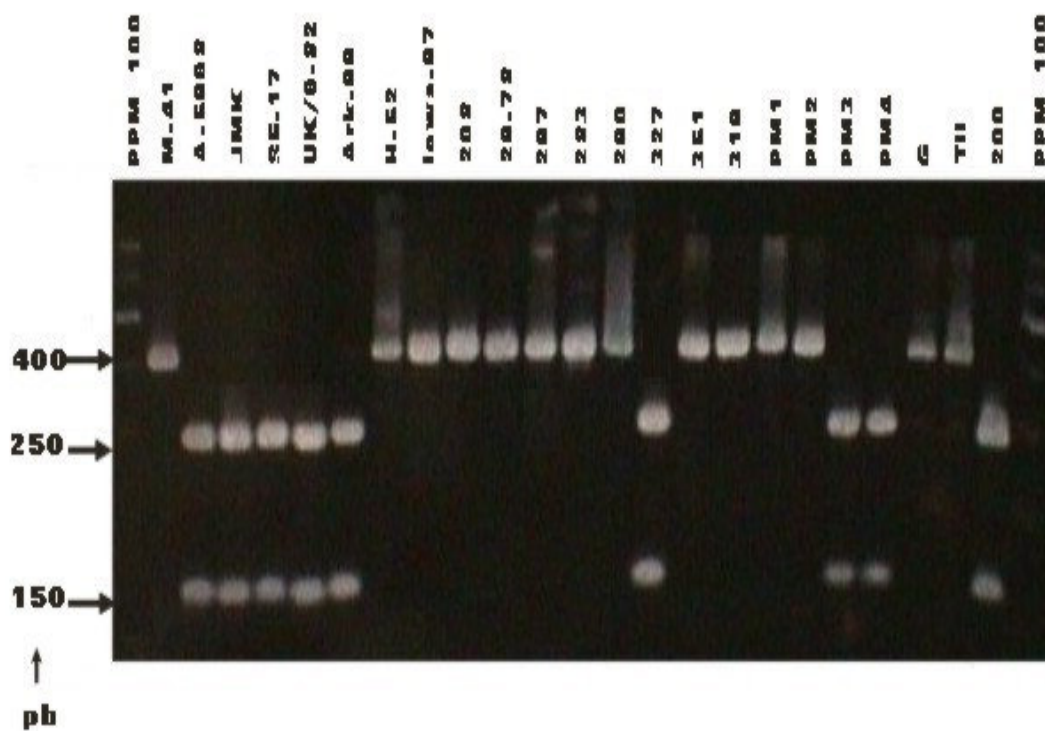


Figura 6 - Visualização dos produtos da restrição enzimática com *Bst*YI. RFLPs dos produtos amplificados (parte do gene S2) por RT-PCR de 23 VBIGs [oito de referência (M-41 → Iowa-97) e quinze isolados brasileiros (208 → 200)] sobre luz UV após eletroforese em gel de agarose 3,5% corado com EtBr (PPM 100: 100 *bp* DNA Ladder; pb: pares de bases).

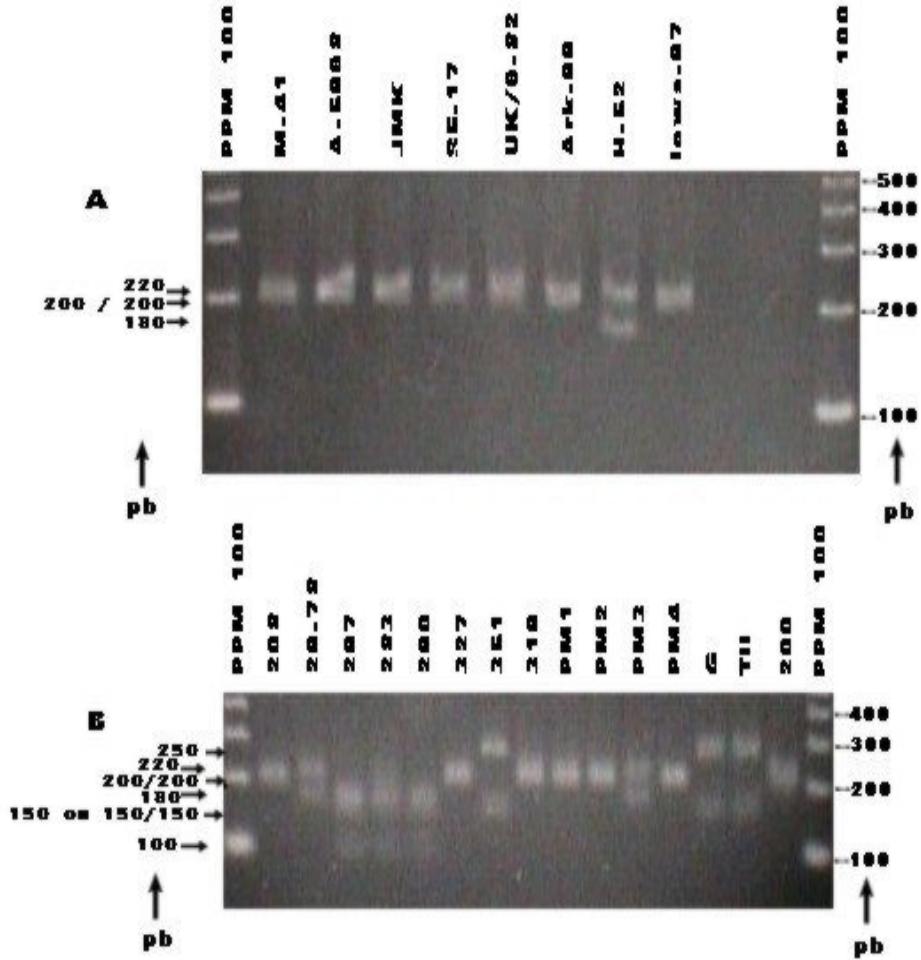


Figura 7 - Visualização dos produtos da restrição enzimática com *Ddel*. RFLPs dos produtos amplificados (parte do gene S2) por RT-PCR de 23 VBIGs sobre luz UV após eletroforese em géis de agarose 3,5% corados com EtBr (PPM 100: 100 *bp* DNA Ladder, pb: pares de bases). Gel A - Oito VBIGs de referência. Gel B - Quinze isolados brasileiros.

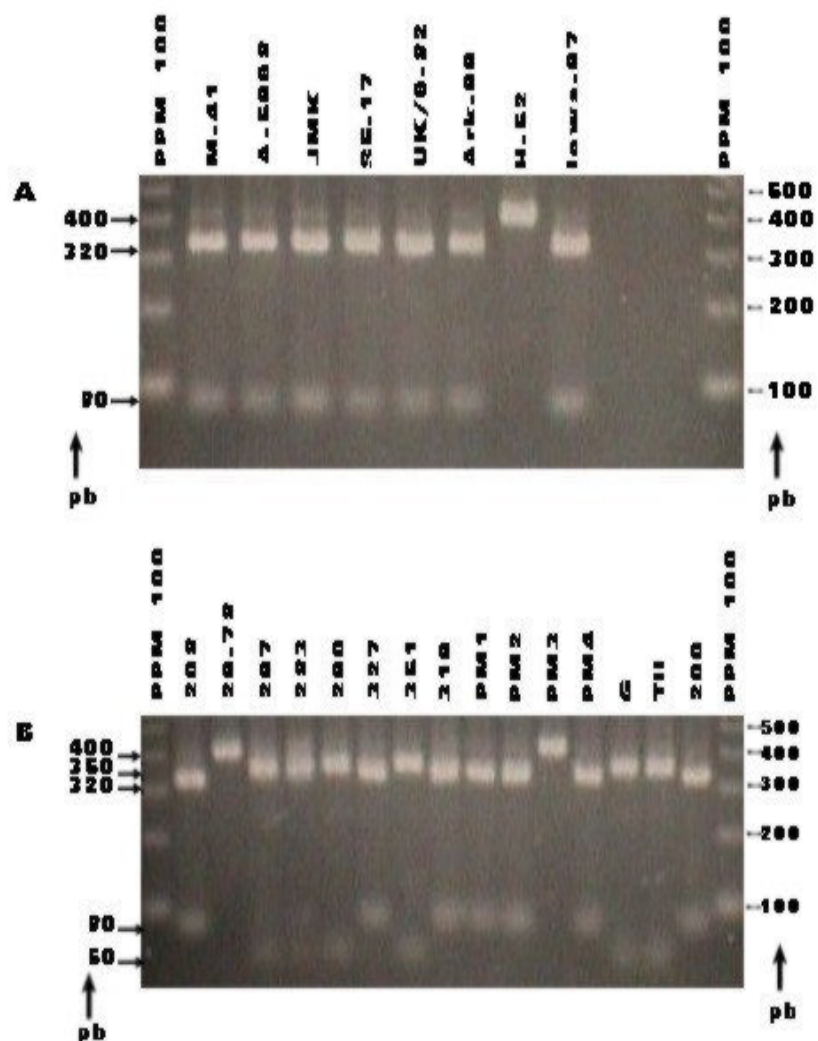


Figura 8 - Visualização dos produtos da restrição enzimática com *HaeIII*. RFLPs dos produtos amplificados (parte do gene S2) por RT-PCR de 23 VBIGs sobre luz UV após eletroforese em géis de agarose 3,5% corados com EtBr (PPM 100: 100 *bp* DNA Ladder, pb: pares de bases). Gel A - Oito VBIGs de referência. Gel B - Quinze isolados brasileiros.

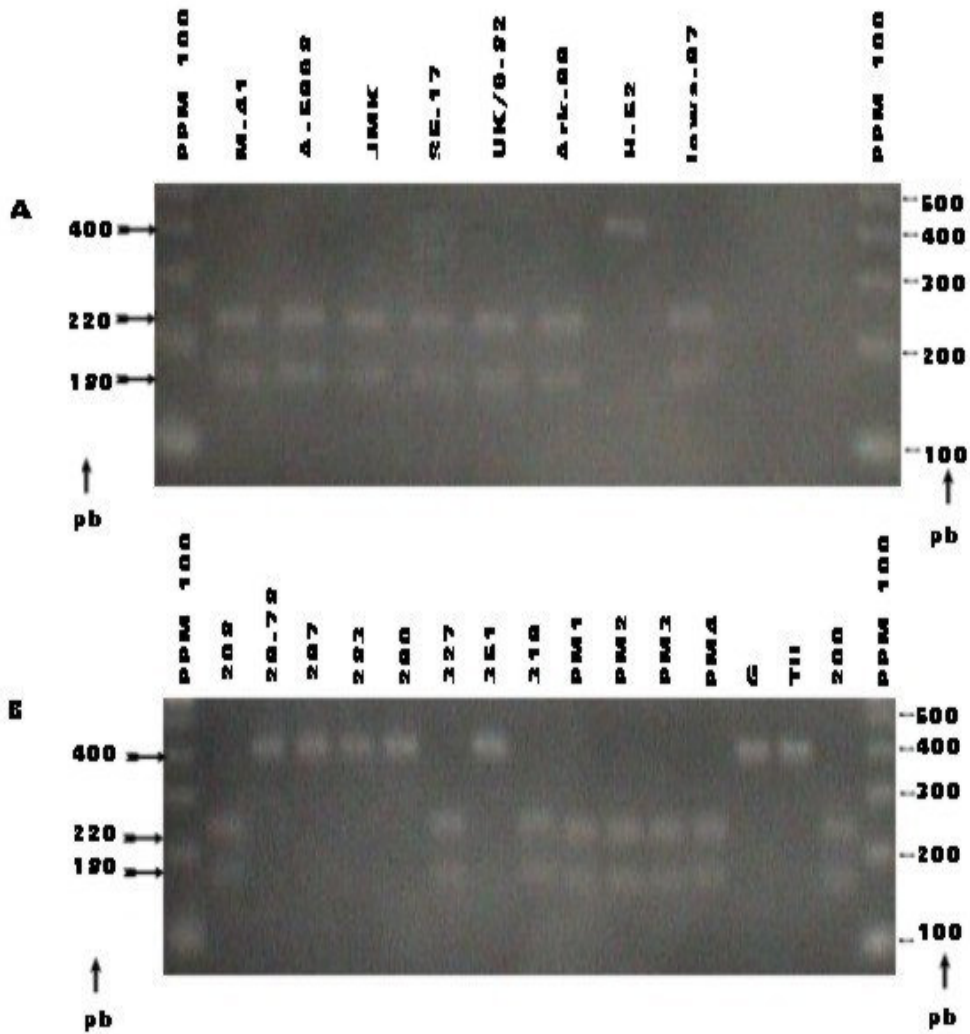


Figura 9 - Visualização dos produtos da restrição enzimática com *HincII*. RFLPs dos produtos amplificados (parte do gene S2) por RT-PCR de 23 VBIGs sobre luz UV após eletroforese em géis de agarose 3,5% corados com EtBr (PPM 100: 100 *bp* DNA Ladder, pb: pares de bases). Gel A - Oito VBIGs de referência. Gel B - Quinze isolados brasileiros.

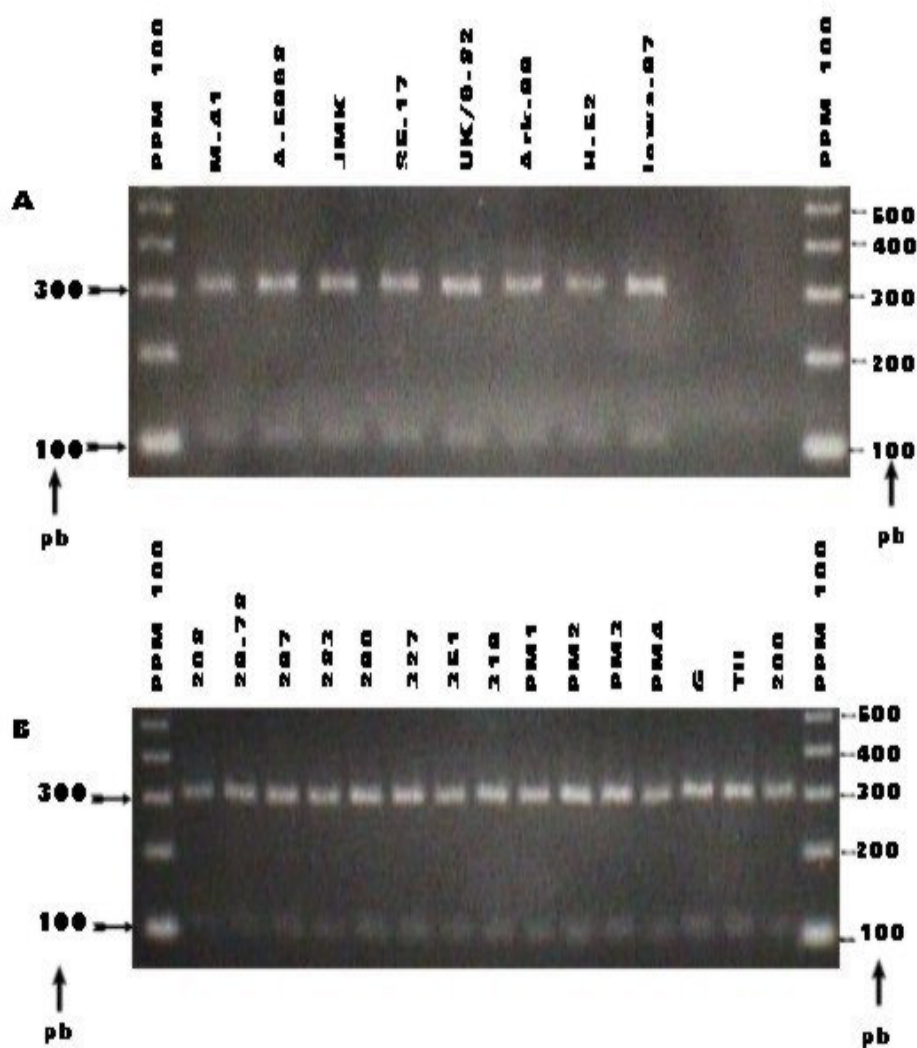


Figura 10 - Visualização dos produtos da restrição enzimática com *Hinf*I. RFLPs dos produtos amplificados (parte do gene S2) por RT-PCR de 23 VBIGs sobre luz UV após eletroforese em géis de agarose 3,5% corados com EtBr (PPM 100: 100 *bp* DNA Ladder, pb: pares de bases). Gel A - Oito VBIGs de referência. Gel B - Quinze isolados brasileiros.

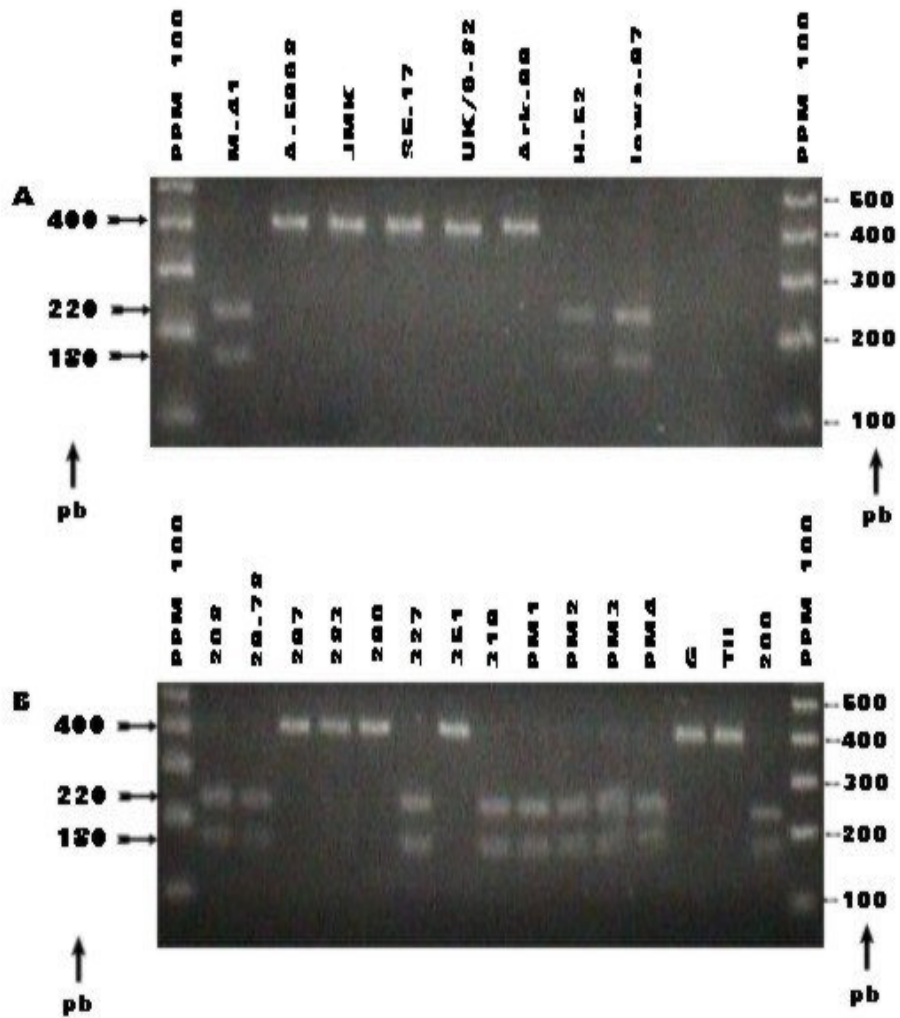


Figura 11 - Visualização dos produtos da restrição enzimática com *HpaI*. RFLPs dos produtos amplificados (parte do gene S2) por RT-PCR de 23 VBIGs sobre luz UV após eletroforese em géis de agarose 3,5% corados com EtBr (PPM 100: 100 *bp* DNA Ladder, pb: pares de bases). Gel A - Oito VBIGs de referência. Gel B - Quinze isolados brasileiros.

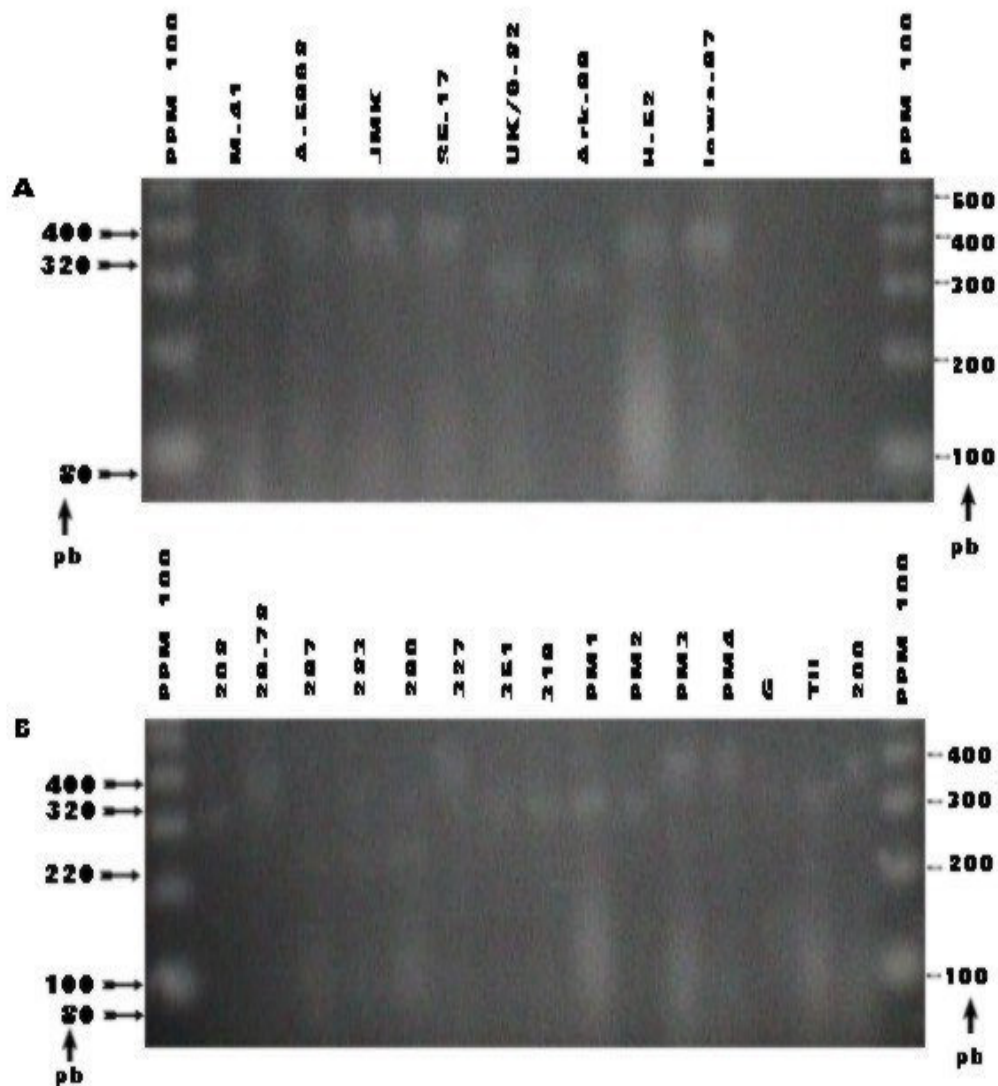


Figura 12 - Visualização dos produtos da restrição enzimática com *MaeIII*. RFLPs dos produtos amplificados (parte do gene S2) por RT-PCR de 23 VBIGs sobre luz UV após eletroforese em géis de agarose 3,5% corados com EtBr (PPM 100: 100 *bp* DNA Ladder; pb: pares de bases). Gel A - Oito VBIGs de referência. Gel B - Quinze isolados brasileiros.

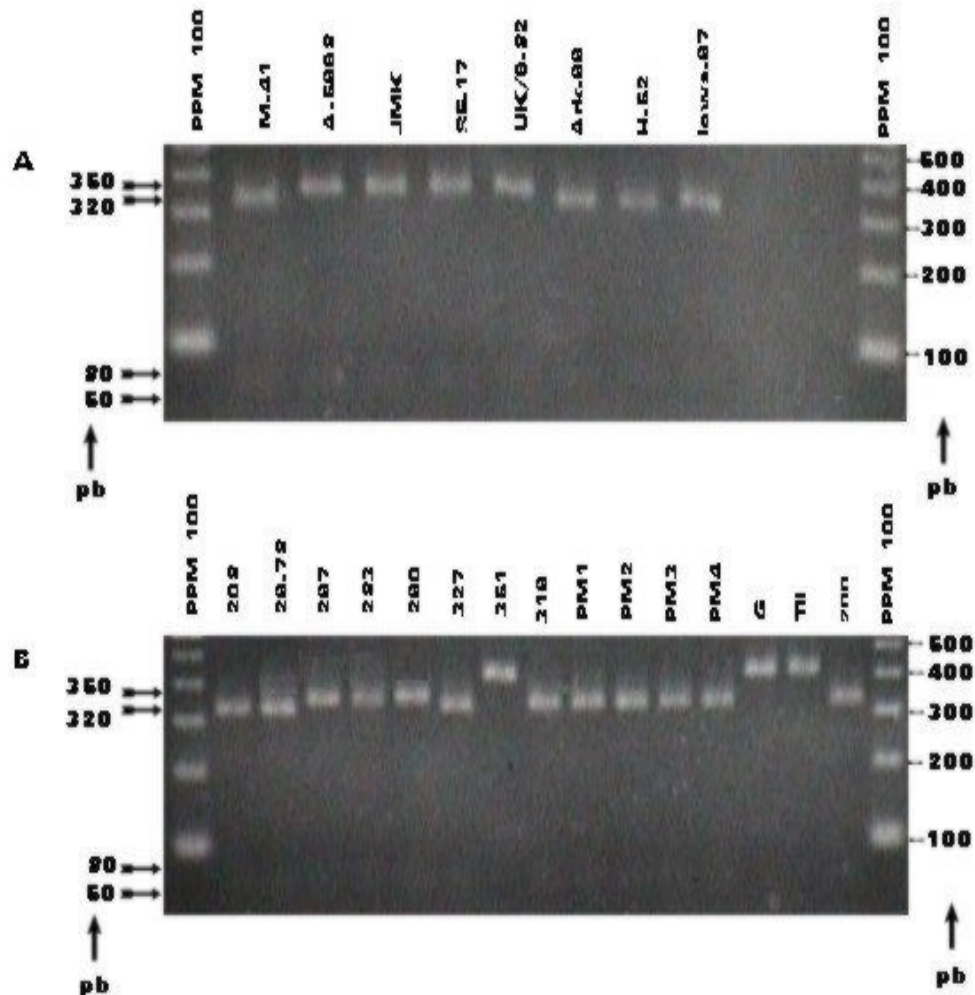


Figura 13 - Visualização dos produtos da restrição enzimática com *Pst*I. RFLPs dos produtos amplificados (parte do gene S2) por RT-PCR de 23 VBIGs sobre luz UV após eletroforese em géis de agarose 3,5% corados com EtBr (PPM 100: 100 *bp* DNA Ladder, pb: pares de bases). Gel A - Oito VBIGs de referência. Gel B - Quinze isolados brasileiros.

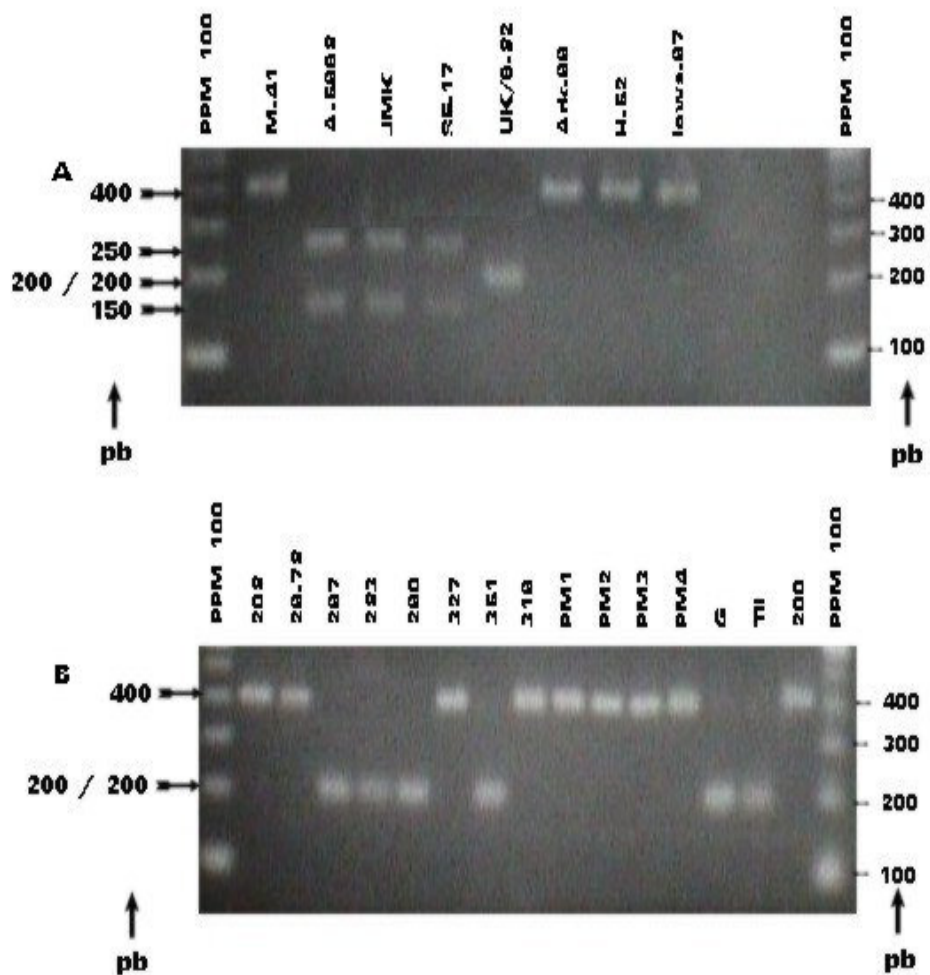


Figura 14 - Visualização dos produtos da restrição enzimática com *ScaI*. RFLPs dos produtos amplificados (parte do gene *S2*) por RT-PCR de 23 VBIGs sobre luz UV após eletroforese em géis de agarose 3,5% corados com EtBr (PPM 100: 100 *bp* DNA *Ladder*, pb: pares de bases). Gel A - Oito VBIGs de referência. Gel B - Quinze isolados brasileiros.

Tabela 6 – Padrões de corte encontrados na RFLP (análise inicial) do segmento amplificado de S2 obtido por RT-PCR de 23 VBIGs (oito de referência e 15 isolados brasileiros).*

Restrição enzimática (RFLP - análise inicial) X padrões de corte (PC)																
VBIGs ↓	<i>Bst</i> YI	<i>Ddel</i>				<i>Hae</i> III		<i>Hinc</i> II	<i>Hinf</i> I	<i>Hpa</i> II	<i>Mae</i> III		<i>Pst</i> I		<i>Sca</i> I	
PC ^a →	C	A	B	C	F	D	E	F	G	F	D	H	D	E	A	C
M-41	-	+	-	-	-	+	-	+	+	+	+	-	+	-	-	-
A-5968	+	+	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-	+
JMK	+	+	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-	+
SE-17	+	+	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-	+
UK/6-82	+	+	-	-	-	+	-	+	+	-	+	-	-	+	+	-
Ark-99	+	+	-	-	-	+	-	+	+	-	+	-	+	-	-	-
H-52	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-
Iowa-97	-	+	-	-	-	+	-	+	+	+	-	-	+	-	-	-
208	-	+	-	-	-	+	-	+	+	+	+	-	+	-	-	-
29-78	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-
297	-	-	+	-	-	-	+	-	+	-	-	+	-	+	+	-
283	-	-	+	-	-	-	+	-	+	-	-	+	-	+	+	-
290	-	-	+	-	-	-	+	-	+	-	-	+	-	+	+	-
327	+	+	-	-	-	+	-	+	+	+	-	-	+	-	-	-
351	-	-	-	+	-	-	+	-	+	-	+	-	-	-	+	-
319	-	+	-	-	-	+	-	+	+	+	+	-	+	-	-	-
PM1	-	+	-	-	-	+	-	+	+	+	+	-	+	-	-	-
PM2	-	+	-	-	-	+	-	+	+	+	+	-	+	-	-	-
PM3	+	-	-	-	+	-	-	+	+	+	-	-	+	-	-	-
PM4	+	+	-	-	-	+	-	+	+	+	-	-	+	-	-	-
G	-	-	-	+	-	-	+	-	+	-	+	-	-	-	+	-
TII	-	-	-	+	-	-	+	-	+	-	+	-	-	-	+	-
200	+	+	-	-	-	+	-	+	+	+	-	-	+	-	-	-

* - Análise inicial dos resultados da RFLP deste estudo antes da realização da RFLP comparada (análise final) com VBIGs de outras fontes de informação - GenBank + WebGene e Lin *et al.* (1991a).

a - Padrões de corte (PC) encontrados após eletroforese nos géis de agarose 3,5% (Figuras 6 a 14) e análise por RFLP inicial deste trabalho, antes da realização da RFLP comparada quando, então, passaram a ser usados números no lugar de letras. As letras, conforme pode ser observado na Tabela 5, correspondem aos seguintes fragmentos de DNA em pares de bases (bandas: maior: → menor e não estão na posição 5' → 3'): A (200 ↔ 200), B (150 ↔ 150 → 100), C (250 → 150), D (320 → 80), E (350 → 50), F (220 → 180), G (300 → 100) e H (220 → 100 → 80).

4.6. RFLP COMPARADA COM DADOS OBTIDOS NA ANÁLISE DAS SEQUÊNCIAS DO GENE S2 DISPONÍVEIS NO GENBANK E DOS RESULTADOS DE Lin *et al.* (1991a)

Com a análise por RFLP do segmento de DNA delimitado pelos oligos BIGS21 e BIGS22 dos 20 VBIGs depositados no GenBank, após submetê-las à simulação restrição enzimática no programa WebGene, foi possível fazer um detalhamento discriminatório dos sítios de restrição enzimática e, conseqüentemente, dos fragmentos de DNA resultantes (Tabela 7). Além das considerações positivas deste fato e que já foram mencionadas no item 4.1, a ampliação das informações aumentou, consistentemente, a importância dos resultados e a profundidade da discussão. Adicionalmente aos resultados obtidos no GenBank + WebGene (Tabela 8), foi necessário “traduzir para uma linguagem universal matemática” as informações do mapa contendo sítios de restrição enzimática apresentado na análise por RFLP de 12 VBIGs (cinco japoneses) do trabalho de Lin *et al.* (1991a) e calcular o tamanho presuntivo dos fragmentos de DNA, coincidentes ou não, com os obtidos anteriormente (Tabelas 7, 8 e 9).

Visando a homogeneização das informações obtidas nas análises por RFLP dos 23 VBIGs (oito de referência e 15 isolados brasileiros) deste trabalho (Tabelas 6 e 10), dos 20 VBIGs com gene S2 disponíveis no GenBank (Tabela 8) e dos 12 VBIGs de Lin *et al.* (1991a) (Tabela 9), foi montada uma tabela (Tabela 7) considerada essencial à compreensão do conjunto do trabalho. Nesta tabela, foram discriminados 28 padrões (perfis) de restrição enzimática (PRE) englobando os oito padrões de corte (PC) encontrados na RFLP (análise inicial) deste trabalho (Tabelas 5 e 6). Alguns PRE (62, 63, 71, 73 e 83) somente foram estabelecidos em função da RFLP dos VBIGs do trabalho de Lin *et al.* (1991a) (Tabelas 7 e 9). Os fragmentos de DNA encontrados na análise por RFLP deste trabalho (Tabelas 5, 6 e 10) tiveram seus tamanhos aproximados determinados cruzando as informações das três diferentes

fontes, sendo, inicialmente, entre os VBIGs “homólogos” de referência (M-41, A-5968 / C-46, Ark-99, JMK, SE-17, UK/6-82, H-52 e Iowa-97) e, posteriormente, entre todos os outros (Tabelas 6, 8, 9 e 10). Diferentes enzimas de restrição que apresentaram resultados semelhantes quanto ao tamanho dos fragmentos de DNA gerados após a restrição enzimática, ajudaram na discriminação e/ou estabelecimento dos PREs, inclusive no provável posicionamento (5' → 3') dos fragmentos de DNA (bandas) encontrados, principalmente quando a opção foi única (ou corta com padrão único ou não). Certamente, a posição de migração das bandas em gel de agarose 3,5% utilizado neste trabalho (Tabela 5) não ajudou na identificação do posicionamento das mesmas.

Comparando os resultados deste trabalho com os do GenBank + WebGene e de Lin *et al.* (1991a), ficou comprovado que três VBIGs de referência (JMK, SE-17 e Iowa-97) são realmente VBIGs mas não os esperados. Os VBIGs JMK e SE-17 deste trabalho apresentaram um conjunto de PRE diferentes dos obtidos a partir dos dados do GenBank + WebGene e idênticos, ambos, ao do A-5968 / C-46 nas duas fontes adicionais de informação (Tabelas 8 e 9). O VBIG Iowa-97 deste trabalho apresentou um conjunto de PREs diferentes do mesmo obtido por Lin *et al.* (1991a) e idênticos ao M-42 (Beaudette) do GenBank + WebGene. Os outros VBIGs de referência (M-41, A-5968 / C-46, Ark-99 e UK/6-82), excetuando o H-52 [gene S2 indisponível no GenBank e não foi estudado por Lin *et al.* (1991a)], apresentaram conjuntos de PRE idênticos aos do GenBank + WebGene, sendo, no caso dos M-41 e A-5968 / C-46, idênticos aos PREs encontrados em Lin *et al.* (1991a), o que validou os resultados obtidos neste trabalho.

Com a determinação dos PREs dos VBIGs de referência, a despeito do problema da baixa resolução dos géis de agarose 3,5% e das inexatidões do tamanho e da posição (5' → 3') dos fragmentos de DNA obtidos na análise por RFLP deste trabalho, foi possível discriminar e/ou determinar os

PREs dos 15 isolados brasileiros estudados (Tabelas 3, 5, 6 e 10). A dificuldade descortinada com o surgimento dos PREs parecidos (após eletroforese em gel de agarose 3,5%) obtidos com as enzimas *Bst*YI (42 e 43), *Dde*I (11 e 12), *Hae*III (62 e 63), *Hin*fI (72 e 73), *Hpa*II (23 e 24) e *Mae*III (81, 82 e 83) foi resolvida analisando os resultados com as outras enzimas de restrição e as possibilidades individuais (presença ou ausência de restrição, caso a caso) em conjunto com os resultados encontrados no GenBank + WebGene e em Lin *et al.* (1991a). Este foi o caso, por exemplo, da *Hin*fI, onde a opção em bloco pelo PRE 72, de difícil discriminação do PRE 73, levou em conta os resultados dos VBIGs do GenBank + WebGene e de Lin *et al.* (1991a) e não poderia ser de outra forma. Desta maneira, não foi difícil optar pelos PREs mais prováveis (Tabela 10).

Dentre os isolados brasileiros (Tabelas 3, 6 e 10), os 297, 283 e 290, seguidos de perto pelos 351, G e TII, foram os que apresentaram maiores modificações no conjunto dos PREs encontrados, aproximando-os dos encontrados para os japoneses C-78 e K-79 e, também, dos europeus B-1648 (belga) e D-1466 (holandês). No caso dos PREs (81, 82 e 83) obtidos com a *Mae*III nos isolados 297, 283 e 290, e, portanto, de determinação mais complicada, a opção por qualquer um dos três PREs não mudou o resultado final substancialmente (são muito próximos) (Tabelas 7 e 10). Em sua maioria (nove), os isolados brasileiros apresentaram conjuntos de PREs individuais parecidos com os do M-41 e diferentes do A-5968 / C-46. Estas situações individuais ficaram evidentes quando da montagem das árvores filogenéticas (item 4.7).

O emprego do conjunto das nove enzimas de restrição (*Bst*YI, *Dde*I, *Hae*III, *Hin*cII, *Hin*fI, *Hpa*II, *Mae*III, *Pst*I e *Sc*aI) no diagnóstico de rotina (detecção direta do

VBIG por RT-PCR e análise por RFLP) é possível mas os resultados, também encontrados por Lin *et al.* (1991a) e nos VBIGs do GenBank + WebGene, confirmaram que a *Hin*fI, isoladamente, serviria para a identificação de grupo do VBIG, em um teste de triagem, logo após a RT-PCR [apenas a D-1466 apresentou um PRE diferente com esta enzima; a situação da verdadeira Iowa-97 (Lin *et al.*, 1991a) não é diferente quando da análise do gel (Tabelas 7, 8, 9 e 10)].

A redução de nove para cinco enzimas de restrição (neste caso, *Bst*YI, *Dde*I, *Hpa*II, *Pst*I e *Sc*aI) não mudou substancialmente os resultados e permitiu o agrupamento dos VBIGs com maiores afinidades no tocante ao conjunto dos PREs (item 4.7). Uma redução para quatro (excluindo a *Bst*YI) permitiu aglutinar aqueles relacionados (mesmo parcialmente) com a M-41 em um único bloco (grupo genotípico) mas não resolveu o posicionamento dos outros VBIGs, os quais permaneceram isolados ou agrupados.

Os VBIGs M-42 (Beaudette) das duas fontes de informações adicionais (GenBank + WebGene e Lin *et al.* 1991a) (Tabelas 8 e 9) apresentaram PREs distintos com a *Hin*cII, provavelmente devido ao fato de que este VBIG foi excessivamente manipulado em laboratório (Tabela 4) (Kusters *et al.*, 1989; Kusters *et al.*, 1990) e, por isto, não foi utilizado neste trabalho.

O conjunto dos PREs encontrados com as nove enzimas de restrição favoreceu a escolha das opções, provavelmente acertadas, quando PREs semelhantes foram encontrados, mas estas situações podem ser resolvidas definitivamente com a técnica de seqüenciamento genômico. Novas enzimas de restrição podem ser descobertas e, também, ajudar na solução destas questões.

Tabela 7 - Determinação dos padrões de restrição enzimática (PRE) com base nas informações obtidas nas seqüências flanqueadas pelos oligos BIGS21 e BIGS22 (gene codificador da glicoproteína S2) dos VBIGs disponíveis no GenBank (submetidos à análise por RFLP no WebGene), no mapa contendo os sítios de restrição enzimática de Lin *et al.* (1991a) e nos resultados deste trabalho.

ER ^a	FORE (G+W) ^b	FP ^c	TAFENT ^d	PRE ^e
<i>Ddel</i>	192 ; 208 ^f	192 ; 208	200 ; 200	11
<i>Ddel</i>	201 ; 199	201 ; 199	200 ; 200	12
<i>Scal</i>	206 ; 194	- ^g	200 ; 200	13
<i>Ddel</i>	163 ; 29 ; 208	-	220 ; 180	21
<i>HincII</i>	235 ; 165	235 ; 165	220 ; 180	22
<i>HpaII</i>	168 ; 232	168 ; 232	220 ; 180	23
<i>HpaII</i>	172 ; 228	-	220 ; 180	24
<i>Ddel</i>	144 ; 19 ; 159 ; 78	-	150 ; 150 ; 100	31
<i>HinfI</i>	143 ; 154 ; 21 ; 82	-	- ^h	32
<i>Ddel</i>	136 ; 243 ; 21	-	250 ; 150	41
<i>BstYI</i>	7 ; 268 ; 125	7 ; 268 ; 125	250 ; 150	42
<i>BstYI</i>	275 ; 125	275 ; 125	250 ; 150	43
<i>Scal</i>	251 ; 149	251 ; 149	250 ; 150	44
<i>HaeIII</i>	80 ; 320	80 ; 320	320 ; 80	51
<i>MaellI</i>	87 ; 313	87 ; 313	320 ; 80	52
<i>PstI</i>	28 ; 316 ; 56	28 ; 316 ; 56	320 ; 80	53
<i>BstYI</i>	365 ; 35	-	-	61
<i>HaeIII</i>	- ⁱ	20 ; 60 ; 320	350 ; 50	62
<i>HaeIII</i>	-	>320 ; <80	350 ; 50	63
<i>HpaII</i>	343 ; 57	-	-	64
<i>PstI</i>	344 ; 56	344 ; 56	350 ; 50	65
<i>BstYI</i>	-	7 ; 268 ; 90 ; 35	-	71
<i>HinfI</i>	297 ; 103	297 ; 103	300 ; 100	72
<i>HinfI</i>	-	297 ; 21 ; 82	300 ; 100	73
<i>MaellI</i>	307 ; 93	-	-	74
<i>MaellI</i>	87 ; 123 ; 190	-	220 ; 100 ; 80	81
<i>MaellI</i>	87 ; 211 ; 102	-	220 ; 100 ; 80	82
<i>MaellI</i>	-	87 ; 220 ; 93	220 ; 100 ; 80	83

a - ER = "Enzima de Restrição".

b - FORE (G + W) = "Fragmentos de DNA (posição 5' → 3', em nº de pb) Obtidos na Restrição Enzimática" das seqüências (flanqueadas pelos oligos BIGS21 e BIGS22) dos 20 VBIGs disponíveis no "GenBank" e submetidas à análise por RFLP no programa "WebGene".

c - FP = "Fragmentos de DNA (posição 5' → 3', em nº de pb) Presuntivos" estimados a partir das informações do mapa (contendo sítios de restrição enzimática de 12 VBIGs) apresentado no trabalho de Lin *et al.* (1991a).

d - TAFENT = "Tamanho Aproximado dos Fragmentos de DNA Encontrados (oito VBIGs de referência e 15 isolados brasileiros) Neste Trabalho" após análise por RFLP. O gel de agarose (neste trabalho, a eletroforese foi realizada em gel de agarose 3,5%) apresenta baixa resolução para fragmentos de DNA (bandas) com menos de 100 pb (pares de bases).

e - PRE = "Padrão de Restrição Enzimática" encontrado. Os números foram designados visando uniformizar as informações dos três trabalhos, quando possível.

f - número de pares de bases dos fragmentos de DNA após restrição enzimática.

g - PRE não encontrado (13; 21; 24; 31; 32; 41; 61; 64; 74; 81; 82) na RFLP dos 12 VBIGs estudados por Lin *et al.* (1991a).

h - PRE não encontrado (32; 61; 64; 71; 74) na RFLP dos 23 VBIGs (oito de referência e 15 isolados) deste trabalho.

i - PRE não encontrado (62; 63; 71; 73; 83) na RFLP (WebGene) dos 20 VBIGs cujos genes S2 estão disponíveis no GenBank.

4.7. ÁRVORES FILOGENÉTICAS

Analisando as seqüências de S2 delimitadas pelos oligos BIGS21 e BIGS22 dos 20 VBIGs que estão disponíveis no GenBank, verificou-se que poucas mudanças ocorreram nesta região, quando comparadas com o VBIG M-41, caracterizadas, basicamente, por substituições de alguns nucleotídeos [apenas três (B-1648, CAV-1013 e D-1466), apresentaram maiores variações]. Esta variabilidade mínima foi o motivo da escolha desta região para estudo por Lin *et al.* (1991a), após comparação das seqüências completas dos genes S1 e S2 dos VBIGs M-41, M-42 / Beaudette, KB-8523 e UK/6-82, e, também, neste trabalho, considerando que tal fato viabilizaria a construção de árvores filogenéticas.

As árvores filogenéticas foram construídas com raiz (*rooted tree*) ou sem (*unrooted tree*) a partir das informações obtidas na RFLP comparada de todas as análises por RFLP [GenBank + WebGene (Tabela 8), Lin *et al.*, 1991a (Tabela 9) e deste trabalho (Tabela 10)], conforme metodologia específica para este fim de Link *et al.* (1995); Saitou & Nei (1987); Studier & Keppler (1988); Swofford *et al.* (1996); Van de Peer & De Wachter (1994).

Pelas razões anteriormente descritas (item 4.6), os VBIGs (JMK, SE-17 e Iowa-97) que apresentaram PREs diferentes neste estudo foram excluídos da referida análise de dados e, conseqüentemente, da construção e desenho das árvores filogenéticas (Link *et al.*, 1995; Saitou & Nei, 1987; Studier & Keppler, 1988; Swofford *et al.*, 1996; Van de Peer & De Wachter, 1994). Os que foram utilizados se referem aos dados dos VBIGs idênticos disponíveis no GenBank (JMK e SE-17) e o Iowa-97 de Lin *et al.* (1991a).

Os VBIGs com resultados idênticos em duas (Ark-99 e UK/6-82) ou três fontes de informações (M-41 e A-5968 / C-46) foram considerados como sendo de fonte única. Os dois VBIGs M-42 (Beaudette) que apresentaram uma pequena diferença entre si (item 4.6), foram incluídos mas com a

sigla da fonte de informação [M-42 (L) de Lin *et al.* (1991a) e M-42 (G) de GenBank + WebGene] para evitar confusão.

Primeiramente, árvores filogenéticas com raízes foram construídas [uma usando o M-41 (Figura 15) e outra o H-52 (Figura 16) como VBIGs raízes ou parentais ou precursores ancestrais] com os resultados (RFLP) obtidos com as nove enzimas de restrição nas três fontes de informações envolvendo todos os VBIGs (aqueles com resultados idênticos em diferentes fontes de informações foram agrupados para evitar repetições) (Figuras 15 e 16). Para isto, foram utilizados agrupados (conforme Link *et al.*, 1995) os resultados da RFLP dos 15 isolados deste trabalho (Tabelas 6 e 10), daqueles (20 VBIGs) cujos genes S2 (parte flanqueada pelos oligos BIGS21 e BIGS22) estão publicados no GenBank (Tabela 8) e dos (sete VBIGs e cinco isolados) utilizados por Lin *et al.* (1991a) (Tabela 9).

Quanto às árvores com raízes, os VBIGs M-41 e H-52 foram escolhidos como parentais, separadamente, pelas seguintes razões: o M-41 foi utilizado, informalmente e não oficialmente, no controle do VBIG na avicultura industrial brasileira (décadas de 60 e 70), como vacina viva atenuada contrabandeada dos EUA; o H-52, oficialmente autorizado para uso no controle do VBIG no Brasil a partir de 1980 (Villa, 1998), foi utilizado, emergencialmente e, também não oficialmente, desde o início da década de 70 por algumas grandes empresas do segmento avícola, inclusive no estado de Minas Gerais.

Neste estudo, também foram testadas reduções nos números das enzimas de restrição utilizadas na RFLP [por exemplo, de nove para cinco (*Bst*YI, *Dde*I, *Hpa*II, *Pst*I e *Scal* - Figuras 17 e 18), substituição de uma enzima (troca da *Bst*Y pela *Ma*eIII, mantendo cinco enzimas - Figuras 19 e 20) e redução para quatro enzimas (*Dde*I, *Hpa*II, *Pst*I e *Scal*, sem a *Bst*YI e a *Ma*eIII - Figuras 21 e 22)] quando da montagem das árvores filogenéticas visando simplificar a metodologia utilizada.

Árvores filogenéticas sem raízes e somente com os 15 isolados brasileiros, as quais pareceram estar mais próximas da nossa realidade [as árvores são “sem raiz” porque a(s) posição(ões) do(s) hipotético(s) VBIG(s) ancestral(is) é(são) desconhecida(s)], com nove (Figuras 23 e 24) e cinco (*Bst*YI, *Ddel*, *Hpa*II, *Pst*I e *Sca*I - Figuras 25 e 26) enzimas de restrição utilizadas na RFLP deste estudo, foram montadas com outra

forma de apresentação (circular) para um melhor entendimento da situação regional daquele momento. Infelizmente, nestas árvores sem raízes, não foi possível calcular as percentagens das distâncias filogenéticas (análise *bootstrap* - item 3.12), mas os comprimentos das linhas (galhos) refletem perfeitamente estes distanciamentos (Zwaagstra *et al.*, 1992; Van de Peer & De Wachter, 1994).

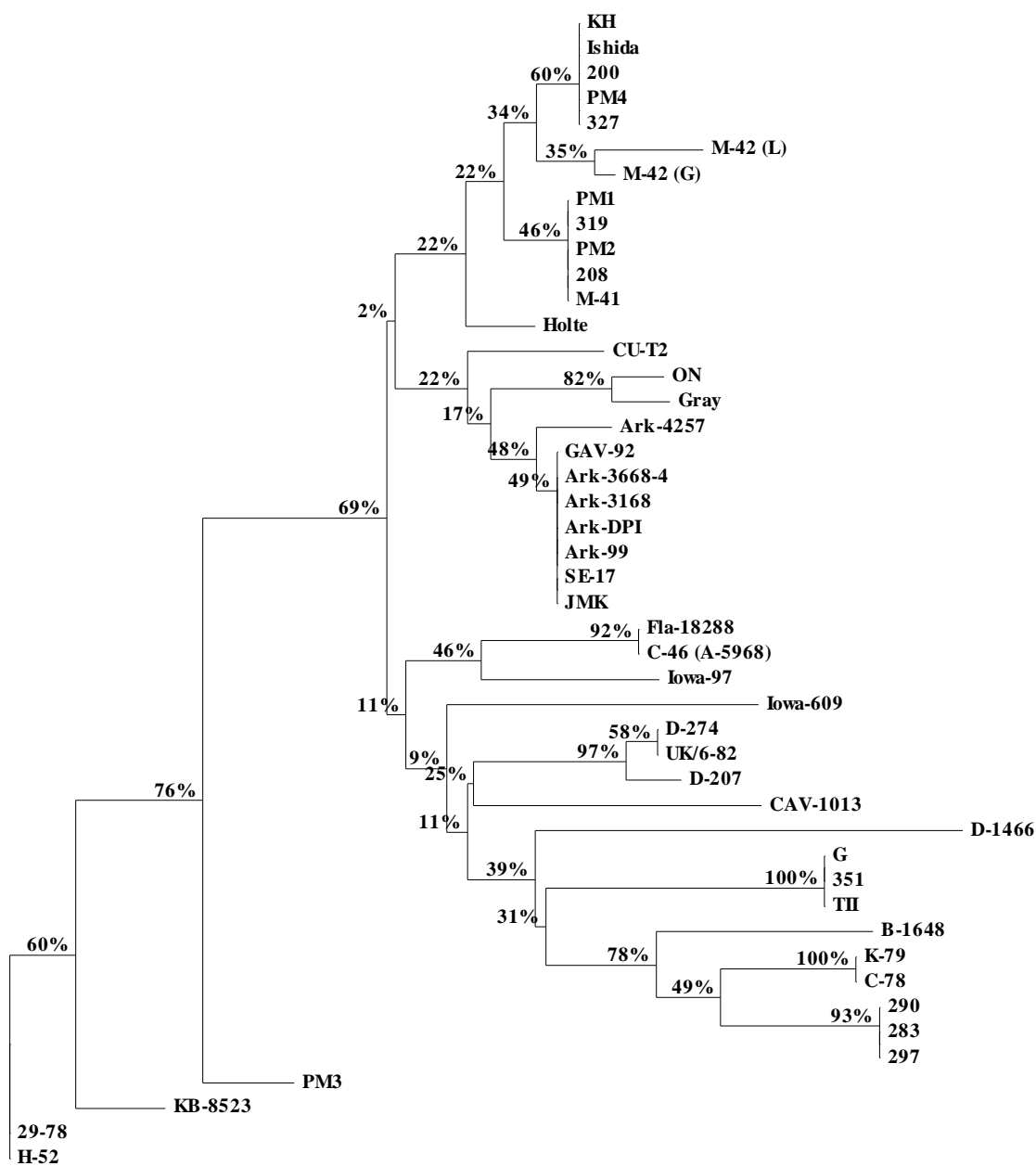


Figura 16 - Árvore filogenética de VBIGs usando o VBIG H-52 como raiz (parental) e o programa TREECON. As porcentagens (indicam alta repetibilidade no *bootstrap* e refletem os distanciamentos genéticos) foram calculadas a partir dos resultados da análise por RFLP com nove enzimas de restrição (*Bst*YI, *Dde*I, *Hae*III, *Hinc*II, *Hinf*I, *Hpa*II, *Mae*III, *Pst*I e *Sca*I) de parte do gene S2 de 46 VBIGs procedentes de três fontes de informações (GenBank + WebGene, Lin *et al.*, 1991a e deste trabalho).

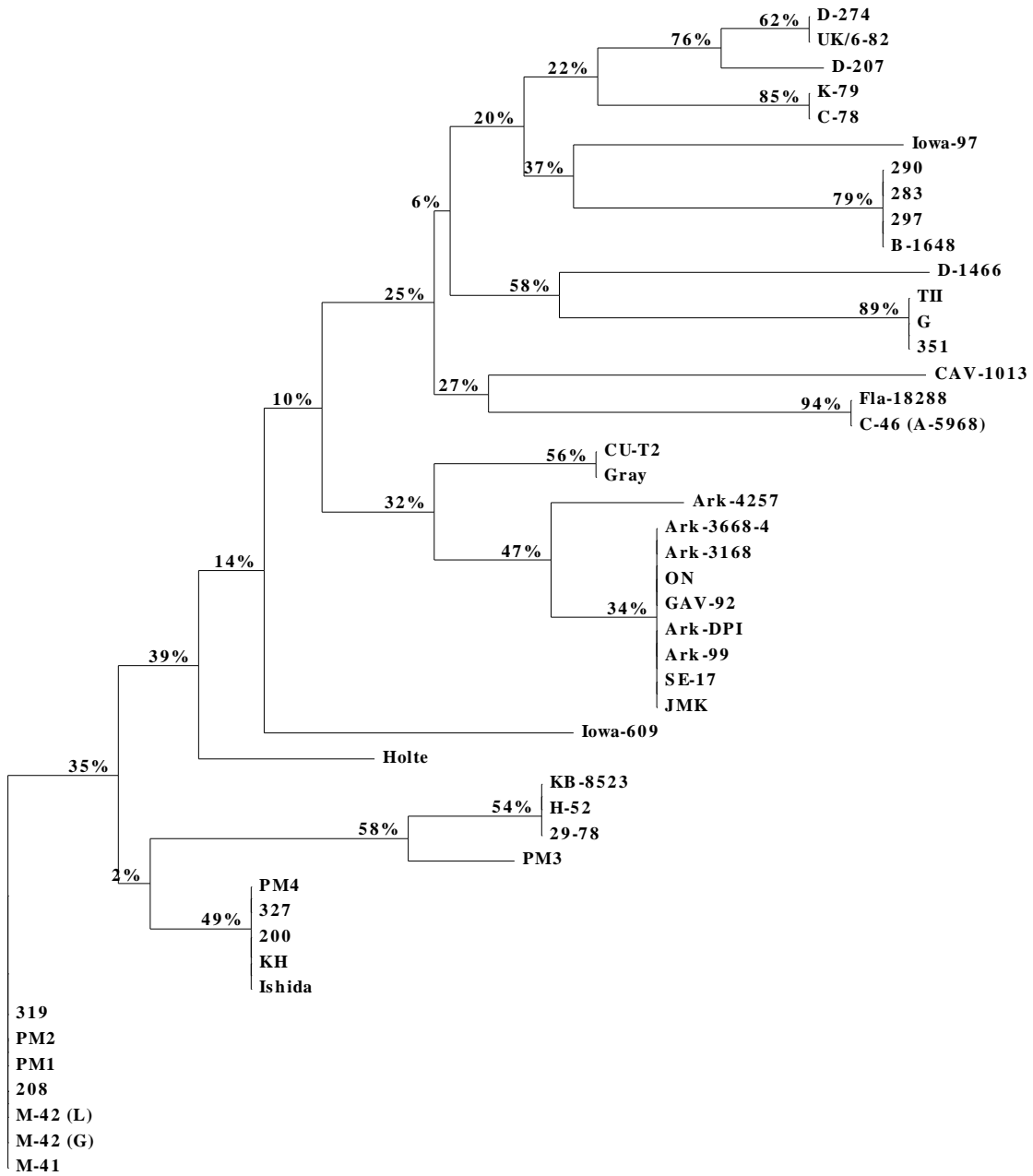


Figura 17 - Árvore filogenética de VBIGs usando o VBIG M-41 como raiz (parental) e o programa TREECON. As porcentagens (indicam alta repetibilidade no *bootstrap* e refletem os distanciamentos genéticos) foram calculadas a partir dos resultados da análise por RFLP com cinco enzimas de restrição (*Bst*YI, *Dde*I, *Hpa*II, *Pst*I e *Sca*I) de parte do gene S2 de 46 VBIGs procedentes de três fontes de informações (GenBank + WebGene, Lin *et al.*, 1991a e deste trabalho).

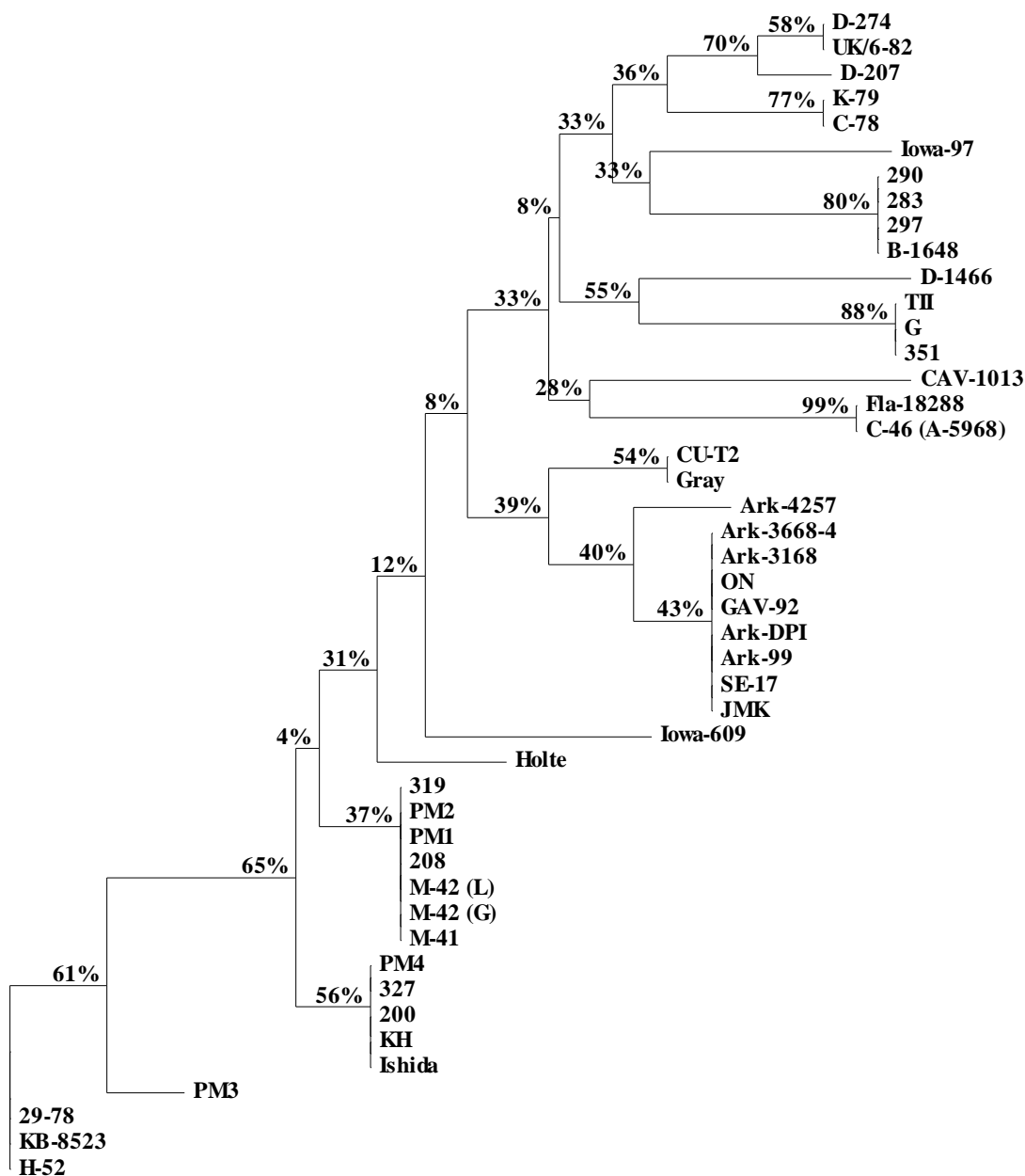


Figura 18 - Árvore filogenética de VBIGs usando o VBIG H-52 como raiz (parental) e o programa TREECON. As porcentagens (indicam alta repetibilidade no *bootstrap* e refletem os distanciamentos genéticos) foram calculadas a partir dos resultados da análise por RFLP com cinco enzimas de restrição (*Bst*YI, *Dde*I, *Hpa*II, *Pst*I e *Sca*I) de parte do gene S2 de 46 VBIGs procedentes de três fontes de informações (GenBank + WebGene, Lin *et al.*, 1991a e deste trabalho).

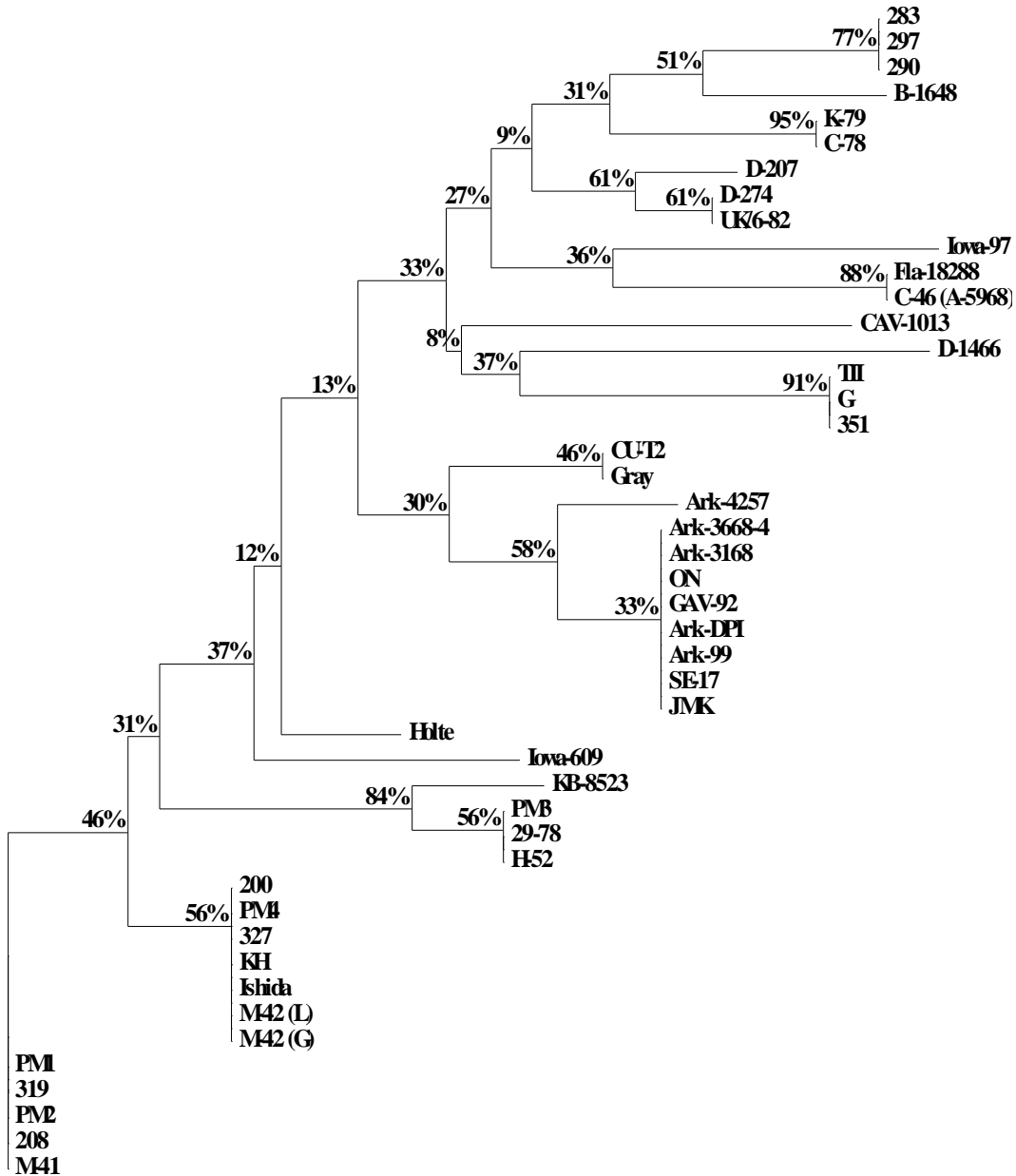


Figura 19 - Árvore filogenética de VBIGs usando o VBIG M-41 como raiz (parental) e o programa TREECON. As porcentagens (indicam alta repetibilidade no *bootstrap* e refletem os distanciamentos genéticos) foram calculadas a partir dos resultados da análise por RFLP com cinco enzimas de restrição (*DdeI*, *HpaI*, *MaeIII*, *PstI* e *ScaI* - sem a *BstYI*) de parte do gene S2 de 46 VBIGs procedentes de três fontes de informações (GenBank + WebGene, Lin *et al.*, 1991a e deste trabalho).

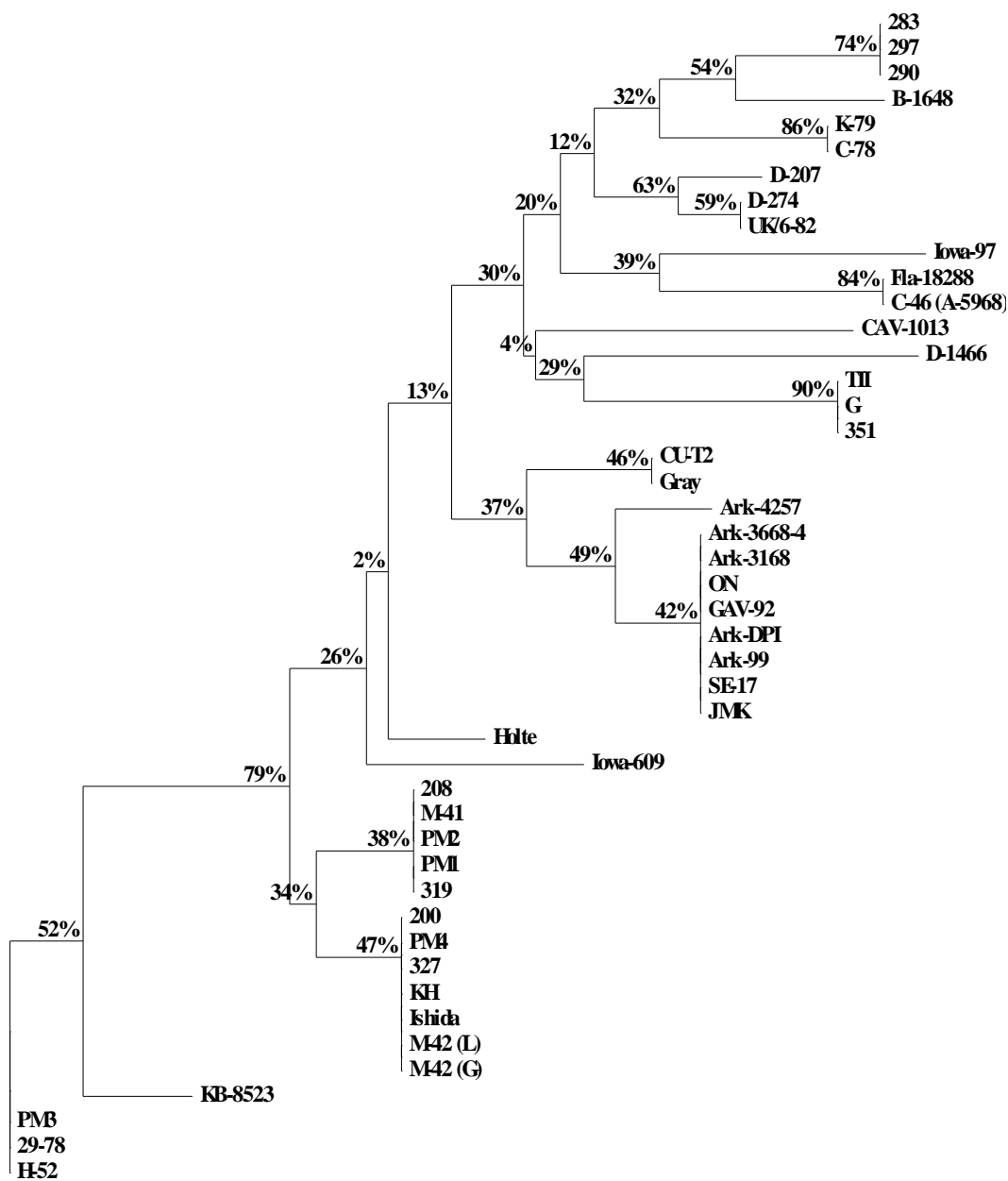


Figura 20 - Árvore filogenética de VBIGs usando o VBIG H-52 como raiz (parental) e o programa TREECON. As porcentagens (indicam alta repetibilidade no *bootstrap* e refletem os distanciamentos genéticos) foram calculadas a partir dos resultados da análise por RFLP com cinco enzimas de restrição (*DdeI*, *HpaII*, *MaeIII*, *PstI* e *ScaI* - sem a *BstYI*) de parte do gene S2 de 46 VBIGs procedentes de três fontes de informações (GenBank + WebGene, Lin *et al.*, 1991a e deste trabalho).

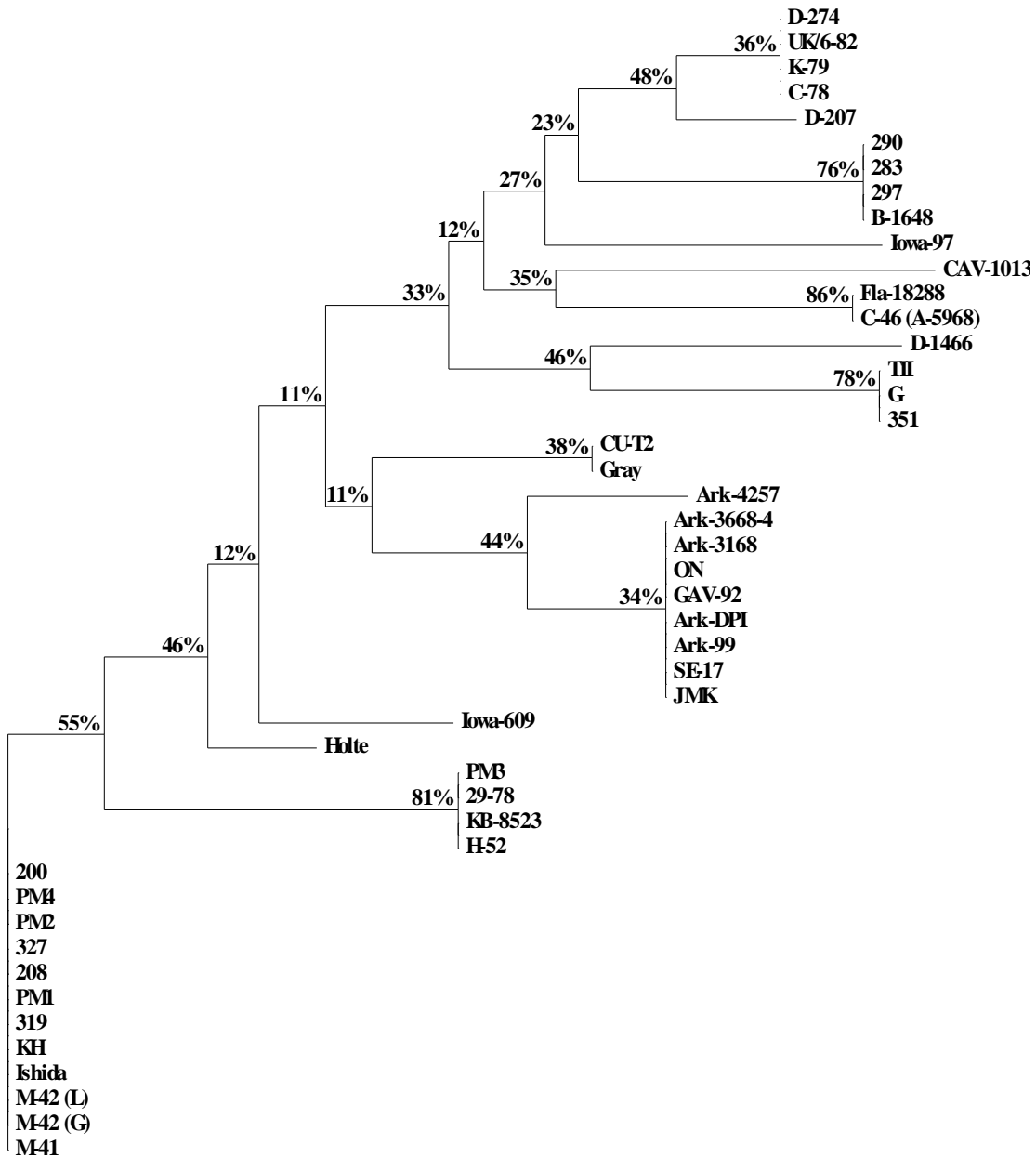


Figura 21 - Árvore filogenética de VBIGs usando o VBIG M-41 como raiz (parental) e o programa TREECON. As porcentagens (indicam alta repetibilidade no *bootstrap* e refletem os distanciamentos genéticos) foram calculadas a partir dos resultados da análise por RFLP com quatro enzimas de restrição (*Ddel*, *HpaII*, *PstI* e *ScaI* - sem a *BstYI*) de parte do gene S2 de 46 VBIGs procedentes de três fontes de informações (GenBank + WebGene, Lin *et al.*, 1991a e deste trabalho).

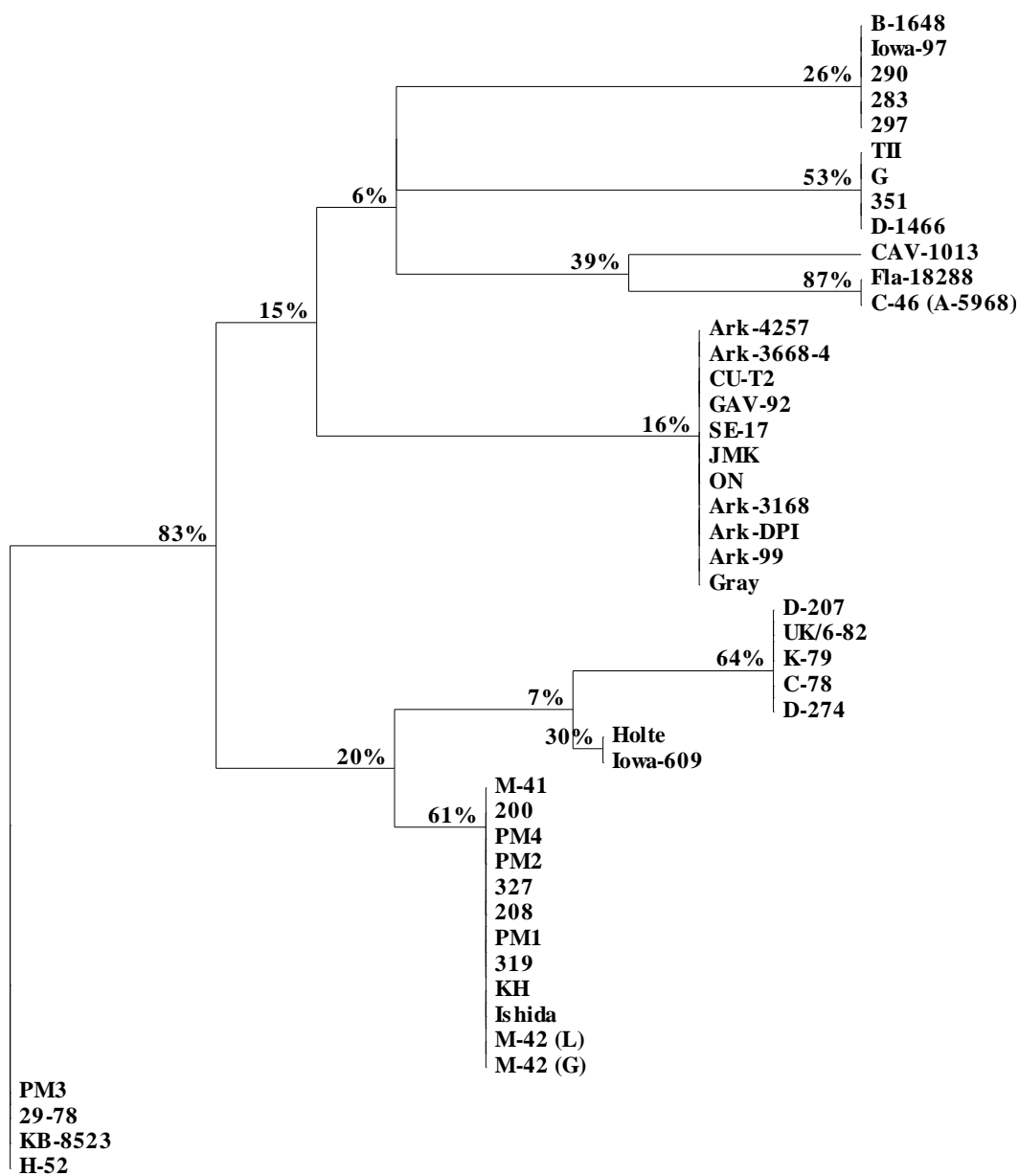


Figura 22 - Árvore filogenética de VBIGs usando o VBIG H-52 como raiz (parental) e o programa TREECON. As porcentagens (indicam alta repetibilidade no *bootstrap* e refletem os distanciamentos genéticos) foram calculadas a partir dos resultados da análise por RFLP com quatro enzimas de restrição (*DdeI*, *HpaII*, *PstI* e *Scal* - sem a *BstYI*) de parte do gene S2 de 46 VBIGs procedentes de três fontes de informações (GenBank + WebGene, Lin *et al.*, 1991a e deste trabalho).

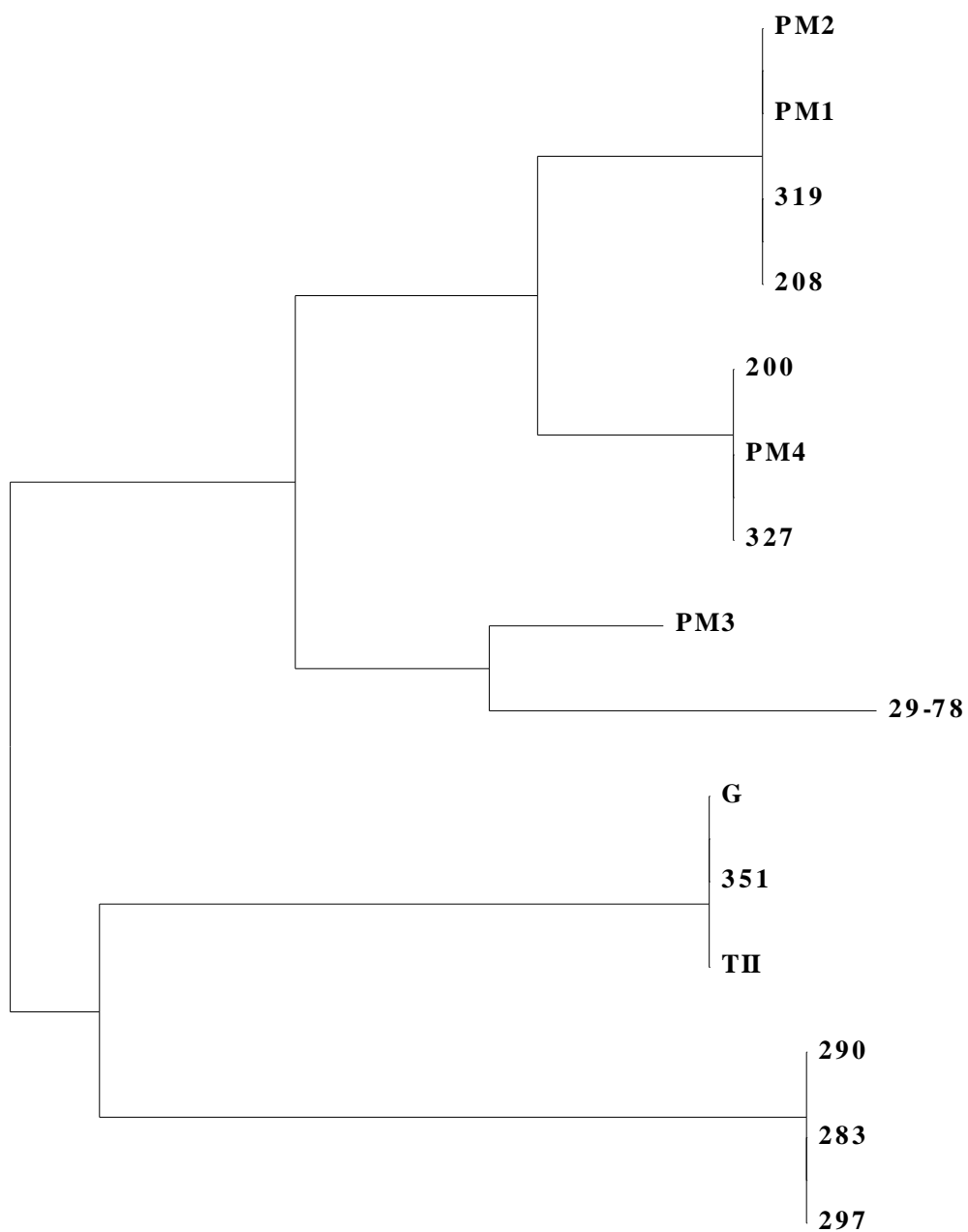


Figura 23 - Árvore filogenética de quinze isolados brasileiros do VBIG. A árvore é sem raiz, isto é, a posição do(s) hipotético(s) VBIG(s) ancestral(is) é desconhecida. Usando o programa TREECON, os comprimentos dos “galhos” da árvore foram calculados a partir dos resultados da análise por RFLP com nove enzimas de restrição (*Bst*YI, *Dde*I, *Hae*III, *Hinc*II, *Hinf*I, *Hpa*II, *Mae*III, *Pst*I e *Sca*I) de parte do gene S2.

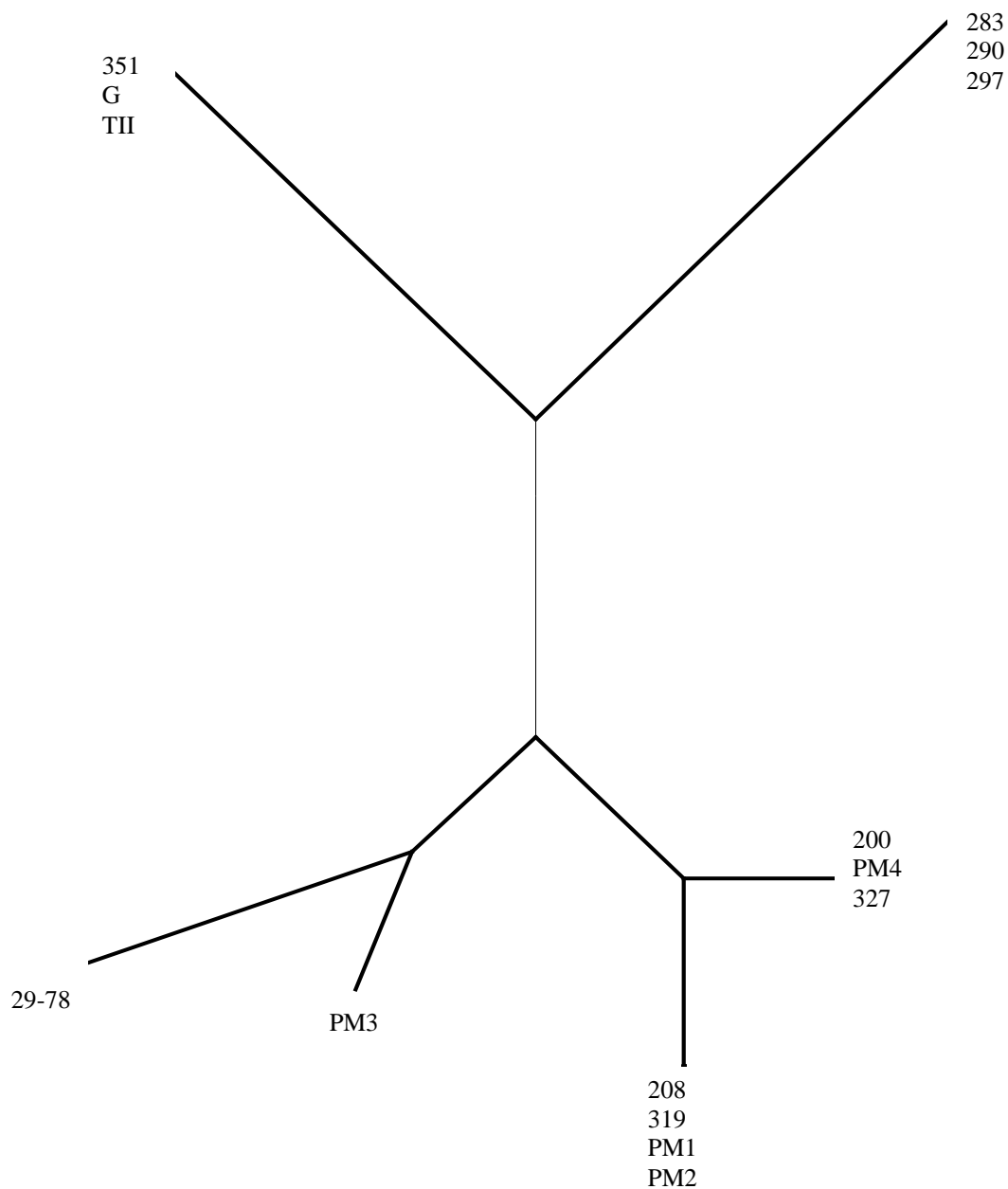


Figura 24 - Árvore filogenética no formato circular de quinze isolados brasileiros do VBIG. A árvore é sem raiz, isto é, a posição do(s) hipotético(s) VBIG(s) ancestral(is) é desconhecida. Usando o programa TREECON, os comprimentos dos “galhos” da árvore foram calculados a partir dos resultados da análise por RFLP com nove enzimas de restrição (*Bst*YI, *Dde*I, *Hae*III, *Hin*clI, *Hin*flI, *Hpa*ll, *Mae*llI, *Pst*I e *Sca*I) de parte do gene S2.

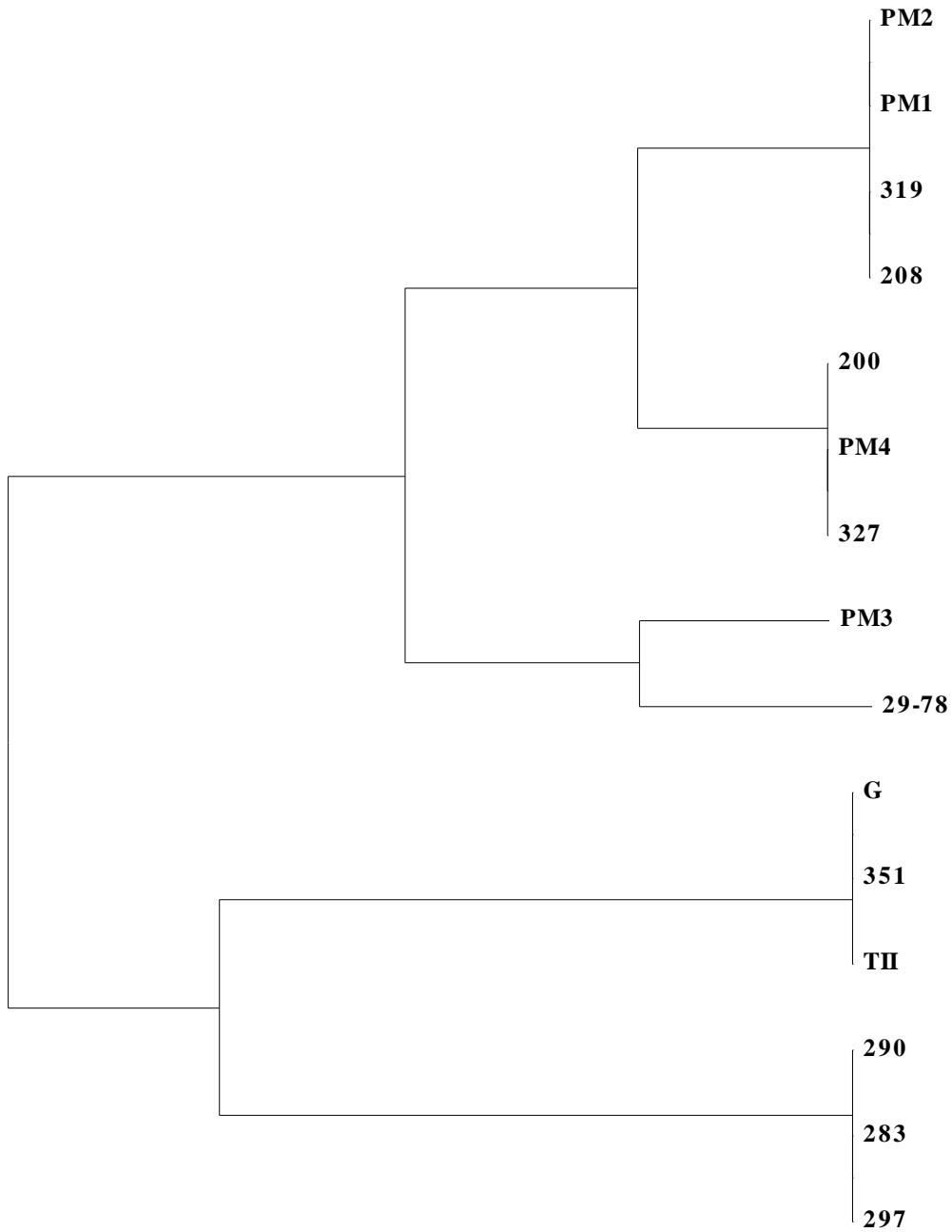


Figura 25 - Árvore filogenética de quinze isolados brasileiros do VBIG. A árvore é sem raiz, isto é, a posição do(s) hipotético(s) VBIG(s) ancestral(is) é desconhecida. Usando o programa TREECON, os comprimentos dos “galhos” da árvore foram calculados a partir dos resultados da análise por RFLP com cinco enzimas de restrição (*Bst*YI, *Dde*I, *Hpa*II, *Pst*I e *Sca*I) de parte do gene S2.

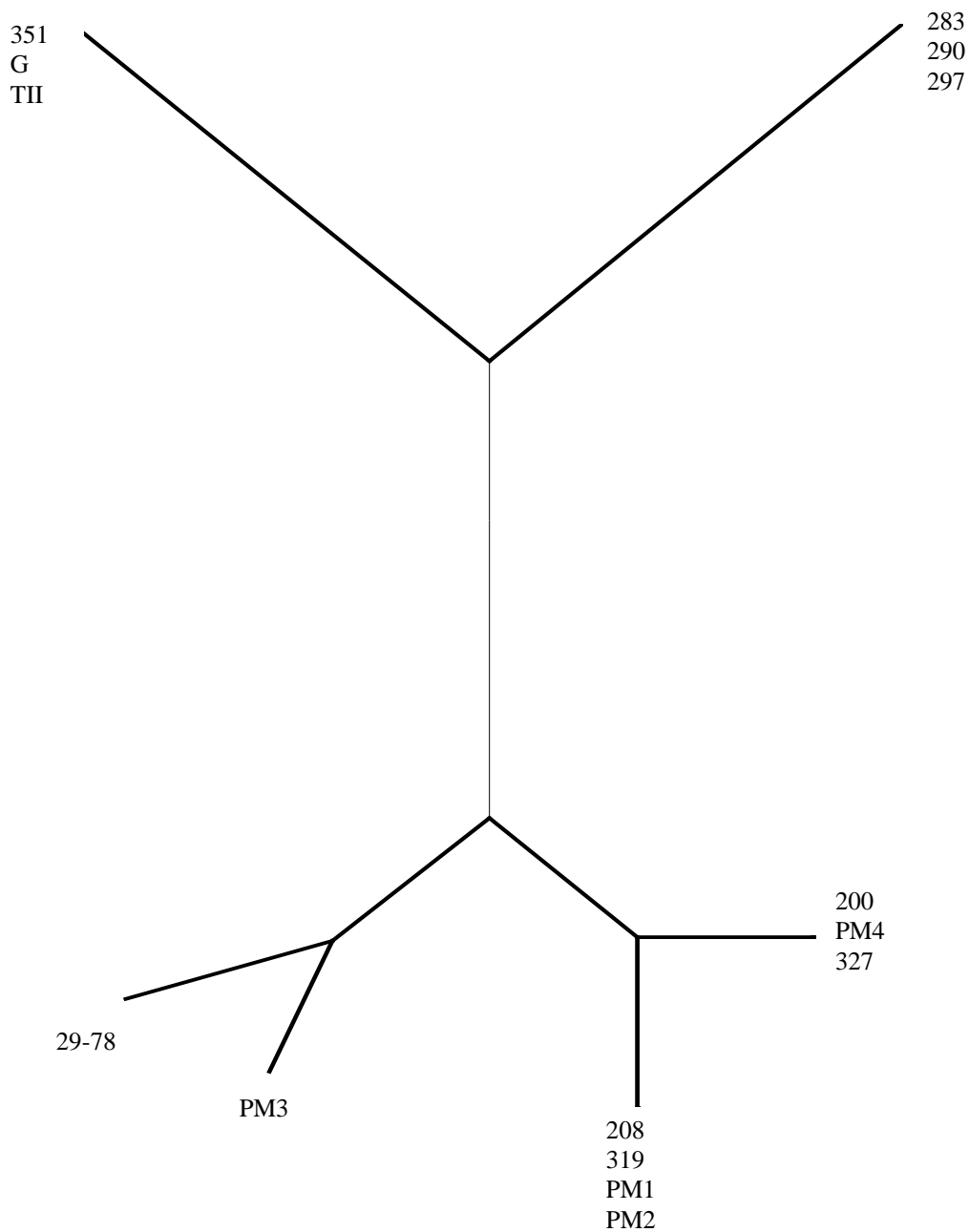


Figura 26 - Árvore filogenética no formato circular de quinze isolados brasileiros do VBIG. A árvore é sem raiz, isto é, a posição do(s) hipotético(s) VBIG(s) ancestral(is) é desconhecida. Usando o programa TREECON, os comprimentos dos “galhos” da árvore foram calculados a partir dos resultados da análise por RFLP com cinco enzimas de restrição (*Bst*YI, *Dde*I, *Hpa*II, *Pst*I e *Sca*I) de parte do gene S2.

As árvores filogenéticas contendo os 46 VBIGs (incluindo os 15 isolados brasileiros) foram construídas (programa TREECON) a partir dos resultados obtidos na análise por RFLP com nove enzimas de restrição, independente do VBIG usado como raiz ou “parental” (M-41 ou H-52), mostraram resultados (as porcentagens indicam alta repetibilidade no *bootstrap* e refletem os distanciamentos genéticos) com topologia semelhante para os mesmos isolados e VBIGs.

Para árvores filogenéticas montadas com os mesmos 46 VBIGs, mas com os resultados obtidos com cinco (inicialmente, foram escolhidas, ao acaso, *Bst*YI, *Dde*I, *Hpa*II, *Pst*I e *Scal*I, e, posteriormente, foi usado o mesmo grupo mas substituindo a *Bst*YI pela *Ma*eIII) ou quatro enzimas de restrição (*Dde*I, *Hpa*II, *Pst*I e *Scal*I), independente do VBIG usado como “parental” (M-41 ou H-52), os resultados foram parecidos, principalmente quanto à topologia, com aqueles obtidos nas árvores com nove enzimas. Houve um desejável agrupamento daqueles VBIGs com menores distanciamentos genéticos e, conseqüentemente, maiores relacionamentos genéticos. Também, não ocorreu comprometimento real do distanciamento genético, principalmente daqueles VBIGs que realmente são diferentes e estão publicados no GenBank (Tabelas 4, 8 e 11), acompanhados dos isolados japoneses (Lin *et al.*, 1991a) e dos brasileiros (Tabelas 3, 9 e 10). Naquelas árvores com cinco enzimas de restrição onde a *Ma*eIII substituiu a *Bst*YI (Figuras 19 e 20) e nas com apenas quatro (*Dde*I, *Hpa*II, *Pst*I e *Scal*I - Figuras 21 e 22), apesar do desejável agrupamento dos VBIGs e isolados mais relacionados, o distanciamento genético aumentou exageradamente entre as “parentais” e os outros VBIGs diferentes estudados. Este problema ficou evidenciado no caso da árvore filogenética que teve o VBIG H-52 como raiz (Figura 22).

Analisando todas as árvores filogenéticas que possuem o H-52 como “parental” (Figuras 16, 18, 20 e 22), independente do

número de enzimas de restrição, ficou claro que o isolado brasileiro 29-78, provavelmente, é o próprio H-52. Em seguida, o VBIG japonês KB-8523 mostrou ter grande relacionamento genético com o H-52 (genes S1 + S2 - Kusters *et al.*, 1990; Sutou *et al.*, 1988), seguido pelo isolado brasileiro PM3. Os brasileiros 327, PM4 e 200, os quais estão persistentemente juntos com os japoneses Ishida e KH, também apresentaram um forte relacionamento genético com o H-52, seguidos pelo grupo composto pelos norte-americanos M-41, M-42 [‘G’ (fonte: GenBank) e ‘L’ (fonte: Lin *et al.*, 1991a)] e dos brasileiros 208, 319, PM1 e PM2.

As árvores filogenéticas que possuem o M-41 como “parental” (Figuras 15, 17, 19 e 21), independente do número de enzimas de restrição empregadas, mostraram que os isolados brasileiros 208, 319, PM1 e PM3, provavelmente, são o próprio M-41. O norte-americano M-42 (G e L) mostrou ter um forte relacionamento genético com a M-41, o que está correto e de acordo com a literatura (genes S1 + S2 - Adzhar *et al.*, 1996; Binns *et al.*, 1985; Kwon *et al.*, 1993a; Kusters *et al.*, 1989a,b; Kusters *et al.*, 1990; Zwaagstra *et al.*, 1992). Em seguida, os permanentemente agrupados - isolados brasileiros 327, PM4 e 200 e os japoneses Ishida e KH - foram os que apresentaram maior relacionamento genético, seguidos dos brasileiros 29-78 e PM3, do japonês KB-8523 e do holandês H-52.

As árvores filogenéticas, sem raiz, construídas apenas com os quinze isolados brasileiros, independente se os resultados da análise por RFLP foram obtidos com nove (Figuras 23 e 24) ou cinco (Figuras 25 e 26) enzimas de restrição, mostraram resultados semelhantes e comprovaram que, mesmo sem a importantíssima RFLP comparada, o agrupamento dos isolados foi preservado mantendo dois troncos básicos de relacionamento genético: um composto pelos isolados 208, 319, PM1, PM2, 200, PM4, 327, 29-78 e PM3 e, outro, composto pelos 290, 283, 297, 351, G e TII. Entretanto, do ponto de vista filogenético ou da filogenia, estes dois troncos pareceram

não ter a mesma origem ancestral, mas para comprovar esta hipótese, novos estudos precisam ser realizados.

Os VBIGs 297, 283 e 290 foram isolados de frangos de corte com doença respiratória, provenientes de três diferentes granjas que não vacinavam contra o VBIG, sendo que, em uma delas (283), concomitantemente, ocorreu síndrome nefrite - nefrose e elevada mortalidade. Estes três VBIGs podem ser um único vírus porque os surtos da BIG correspondentes aconteceram na mesma região (Alto São Francisco - alta concentração avícola) e no mesmo ano (1983), apesar dos meses de ocorrência [maio (283), julho (290) e agosto (297)] também terem sido diferentes.

Os VBIGs 351, G e TII, também, podem ser um único vírus, a despeito de terem sido isolados a partir de lotes apresentando surtos da BIG em anos diferentes (Tabela 3) mas as regiões de origem (Alto São Francisco e Metalúrgica) são vizinhas e, ambas, têm alta concentração avícola. Esta situação indica que este provável VBIG único permaneceu circulando naquela região por quase dez anos.

Os isolados 283, 290, 297, 351, G e TII, curiosamente, só tiveram seus produtos adequadamente amplificados por RT-PCR após a otimização (item 4.4.3) e esta situação pareceu refletir importantes substituições de nucleotídeos localizados nas seqüências complementares aos oligos BIGS21 e BIGS22 (Tabela 11), o que geraria um anelamento mais complicado durante a amplificação (Newton, 1995; Powell, 1995). Nas árvores filogenéticas com todos os 46 VBIGs (Figuras 15, 16, 17 e 18), independente dos resultados terem sido obtidos com nove ou cinco enzimas de restrição, esta hipótese ficou reforçada em razão do parentesco com VBIGs portadores de variações nas regiões dos oligos (B-1648, CAV-1013 e D-1466) mas a comprovação definitiva somente virá com o seqüenciamento do segmento de DNA estudado.

Caso os isolados dos grupos com mesmas características filogenéticas (por exemplo:

283, 290 e 297 e/ou 351, G e TII) sejam, por grupo, um mesmo vírus, apesar de procedentes de surtos que ocorreram em granjas, épocas e regiões distintas, esta situação de circulação e, também, de manutenção de vírus em uma região, favorece enormemente o VBIG, perpetuando-o naquela região (Cavanagh & Naqi, 1997; Cook, 1984; Doi *et al.*, 1982; Gelb *et al.*, 1981; Gelb *et al.*, 1983; Ignjatovic *et al.*, 1997; Kusters *et al.*, 1987; Lin *et al.*, 1991b; Resende, 1983). Tal situação é decorrente de uma característica típica da avicultura industrial que é a alta aglomeração de granjas (alta densidade avícola) em uma determinada área, geralmente objetivando minimizar custos de produção.

Analisando as árvores filogenéticas com raiz contendo 46 VBIGs (M-41 e H-52), independente do número de enzimas de restrição (nove, cinco ou quatro), ficou evidenciada a maior participação do M-41 como "parental" do que o H-52 nos isolados brasileiros e este fato refletiu, seguramente, a situação no universo (isolados virais presentes em uma determinada região e dentro de um período de tempo) estudado naquele momento.

Nenhum estudo de filogenia envolvendo tantos VBIGs (46) foi realizado, conforme verificado nos vários trabalhos realizados a respeito, independente das metodologias empregadas na obtenção de dados serem similares às deste trabalho. Outros estudos foram feitos empregando RT-PCR / RFLP (parte do gene S2 - Lin *et al.*, 1991a), comparação de seqüências de nucleotídeos (parte do gene N - Zwaagstra *et al.*, 1992; parte do gene S1 - Wang & Tsai, 1996) ou de seqüências de aminoácidos de proteínas a partir de seqüenciamento genômico (genes S1 e S2 completos, e, parte final do NS e inicial do M - Kusters *et al.*, 1989b; Kusters *et al.*, 1990). Entretanto, os únicos trabalhos que podem ter seus resultados filogenéticos diretamente comparados com os deste trabalho foram, obviamente, o de Lin *et al.* (1991a), com resultados idênticos, mas, agora, inserido em um universo amostral comparativo mais amplo, e o de Kusters *et al.* (1990), no qual o gene S2 foi

estudado fracionado em três partes, sequenciado e traduzido para as seqüências de aminoácidos correspondentes. O excelente estudo de Kusters *et al.* (1990) utilizou seis importantes VBIGs (M-41, M-42 / Beaudette, KB-8523, UK/6-82, D-207 e D-1466) e, na primeira parte do gene S2 (englobando a região utilizada neste estudo), os resultados da árvore filogenética sem raiz foram idênticos ao deste trabalho com os mesmos VBIGs, inclusive na árvore filogenética sem raiz construída com resultados do seqüenciamento e tradução (para proteína) do gene total S1 destes VBIGs. Noutro excelente estudo realizado anteriormente por Kusters *et al.* (1989b), com sete VBIGs (cinco idênticos aos deste trabalho: M-41, M-42 / Beaudette, UK/6-82, D-207 e D-1466) e baseado no seqüenciamento e alinhamento comparativo de seqüências de nucleotídeos do gene S1 total, uma árvore filogenética sem raiz foi construída e os resultados foram semelhantes aos deste trabalho (mesma topologia). Os resultados das árvores filogenéticas sem raízes de outros estudos com genes diferentes do utilizado neste trabalho (Wang & Tsai, 1996; Zwaagstra *et al.*, 1992) não puderam ser comparados porque VBIGs muito diferentes (exemplo: M-41, KB-8523, D-207 e D-274) ficaram agrupados com base no seqüenciamento de parte do gene N (Zwaagstra *et al.*, 1992), o que está correto porque o gene (N) é muito conservado (Abreu, 2000; Cavanagh & Naqi, 1997), e, no caso do seqüenciamento de parte do gene S1 (Wang & Tsai, 1996), a árvore foi construída apenas com 12 isolados de Taiwan, sem utilizar nenhum VBIG (estirpe de referência) como parâmetro de comparação.

4.8. GENOTIPIFICAÇÃO

Até 1998, a genotipificação somente estava relacionada com a sorotipificação tradicional quando o gene S1 (total ou parcial) era estudado por RT-PCR / RFLP e/ou seqüenciamento genômico (Cavanagh *et al.*, 1988; Cavanagh *et al.*, 1997; Cavanagh & Naqi, 1997; Jackwood *et al.*, 1997; Kwon *et al.*, 1993a,b; Song *et al.*, 1998; Wang & Tsai, 1996). Recentemente (Callison *et al.*,

1999), porém, foi comprovado que a variabilidade no gene S2 (seqüências de nucleotídeos) pode afetar, principalmente, a sorotipificação baseada exclusivamente na glicoproteína S1, apesar do fato de que a genotipificação por análise do mesmo gene (S1), em tese, não estar alterada, porque a estrutura tridimensional da glicoproteína S1 pode ficar modificada neste caso, ainda que de forma sutil mas significativa (genotipificação ≠ sorotipificação).

A genotipificação proposta por Lin *et al.* (1991a,b), baseada na análise por RFLP de parte do gene S2 amplificada por RT-PCR, idêntica à realizada neste trabalho, foi criticada por Kwon *et al.* (1993a), não porque existia discrepância no relacionamento genotipo / sorotipo, mas devido ao grande número de enzimas de restrição necessárias à RFLP (nove) e, também, ao baixo número de VBIGs de campo estudados (cinco japoneses, sendo três vacinais - Tabelas 4 e 9).

A situação de hipervariabilidade do gene S1 associada à variabilidade mínima do gene S2, mas que pode alterar significativamente a conformação da glicoproteína S1 (Callison *et al.*, 1999), corroborou, conseqüentemente, com a necessidade de um novo estudo de genotipificação com o gene S2 mais amplo como foi o deste estudo. Também, como reforço no sentido de justificar o estudo do gene S2, obviamente sem descartar os necessários estudos com os outros genes [S1 (Santiago *et al.*, 2000), N (Abreu, 2000) e outros], é importante salientar que o S2, assim como o N, devido à maior similaridade inter-VBIGs, estaria mais sujeito à recombinação homóloga entre VBIGs diferentes do que o gene S1 (Cavanagh *et al.*, 1992a; Jia *et al.*, 1995; Kusters *et al.*, 1990).

Analisando as árvores filogenéticas sem raízes, construídas com resultados da RFLP dos 46 VBIGs obtidos das três fontes de informações (GenBank + WebGene, Lin *et al.*, 1991a e dos quinze isolados deste trabalho) empregando nove (Figura 27) e cinco (Figura 28) enzimas de restrição, foi encontrada uma grande correlação entre genotipificação (13 genotipos) e a

sorotipificação tradicional (Cavanagh *et al.*, 1997; Cavanagh & Naqi, 1997; Jackwood *et al.*, 1997; Kwon *et al.*, 1993a,b; Kusters *et al.*, 1990; Song *et al.*, 1998; Wang & Tsai, 1996). A redução de nove para cinco no número de enzimas de restrição não alterou os agrupamentos em genótipos e nem as situações individuais, sendo, portanto, uma contribuição deste trabalho na simplificação da metodologia utilizada. Três genótipos distintos foram encontrados no tocante aos isolados brasileiros: um denominado “Massachusetts” (29-78, 208, 319, 327, PM1, PM2, PM3, PM4 e 200), outro denominado “351 / G / TII” com os isolados homônimos e outro “283 / 290 / 297 / B-1648”, agrupando os três isolados homônimos e o variante belga B-1648 (Meulemans *et al.*, 1987).

Os resultados encontrados na genotipificação (gene S1 inteiro) proposta por Kwon *et al.* (1993a,b) e Jackwood *et al.* (1997) para os genótipos / sorótipos “Massachusetts”, “Connecticut”, “Holte”, “Iowa-97” e “Arkansas” foram os mesmos neste trabalho. Entretanto, os VBIgs JMK e Gray, classificados como sendo do genótipo único “JMK” pelo gene S1 (Kwon *et al.* 1993a,b; Jackwood *et al.*, 1997), ficaram próximos neste estudo com parte do gene S2 mas agrupados em genótipos diferentes (o JMK no “Arkansas” e o Gray no “Gray / CU-T2”). Ocorreram, também, discrepâncias com o SE-17 e o GAV-92, pertencentes aos genótipos / sorótipos “SE-17” e “Variante”, respectivamente, nos estudos com o gene S1 (Avellaneda *et al.*, 1994; Kwon *et al.* 1993a,b; Jackwood *et al.*, 1997), os quais ficaram agrupados no genótipo “Arkansas” neste estudo.

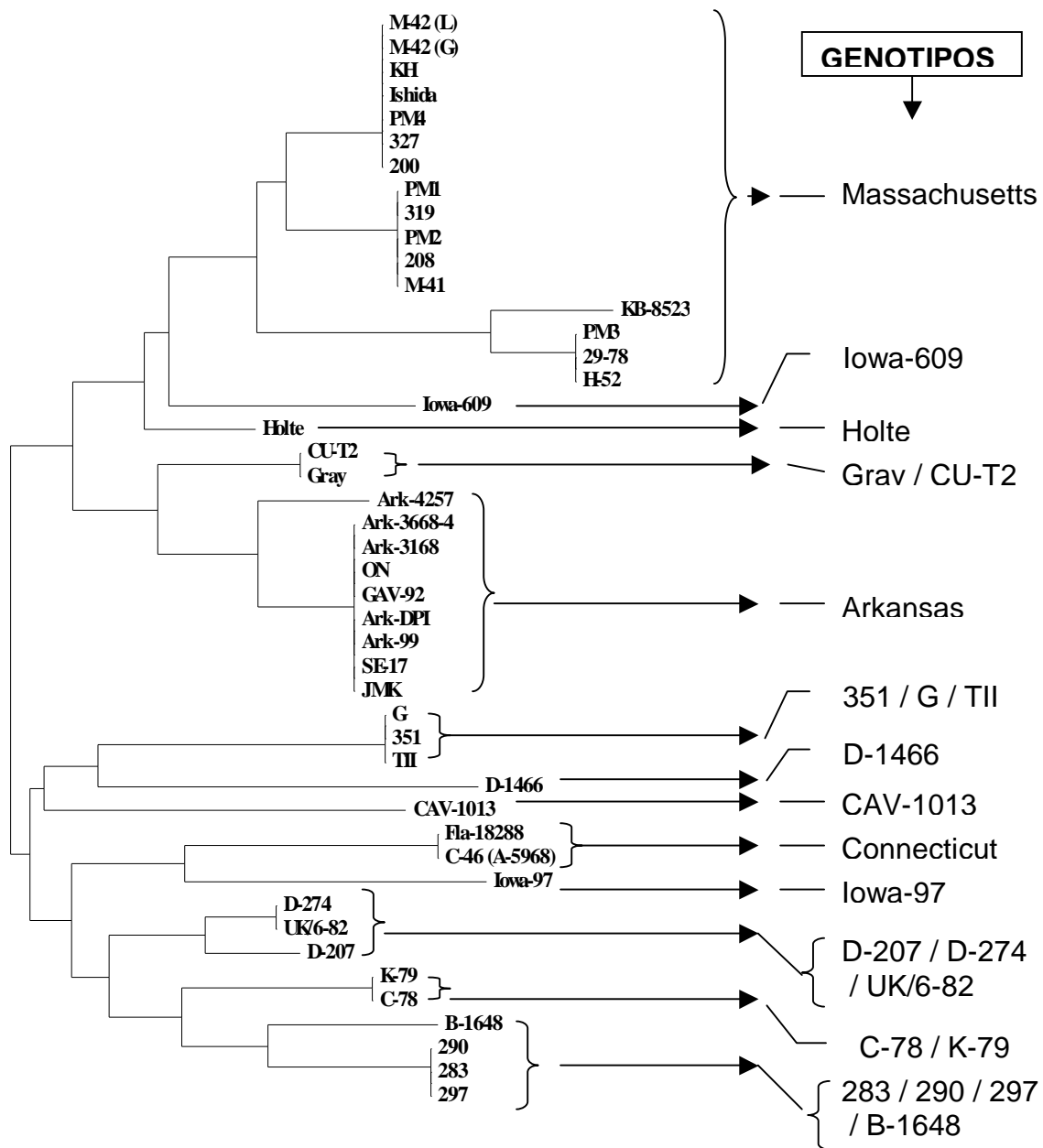


Figura 27 - Genotipificação. Árvore filogenética de VBIGs sem raiz construída com o programa TREECON a partir dos resultados da análise por RFLP com nove enzimas de restrição (*Bst*YI, *Dde*I, *Hae*III, *Hinc*II, *Hin*II, *Hpa*II, *Ma*eIII, *Pst*I e *Sca*I) de parte do gene S2 de 46 VBIGs procedentes de três fontes de informações (GenBank + WebGene, Lin *et al.*, 1991a e deste trabalho).

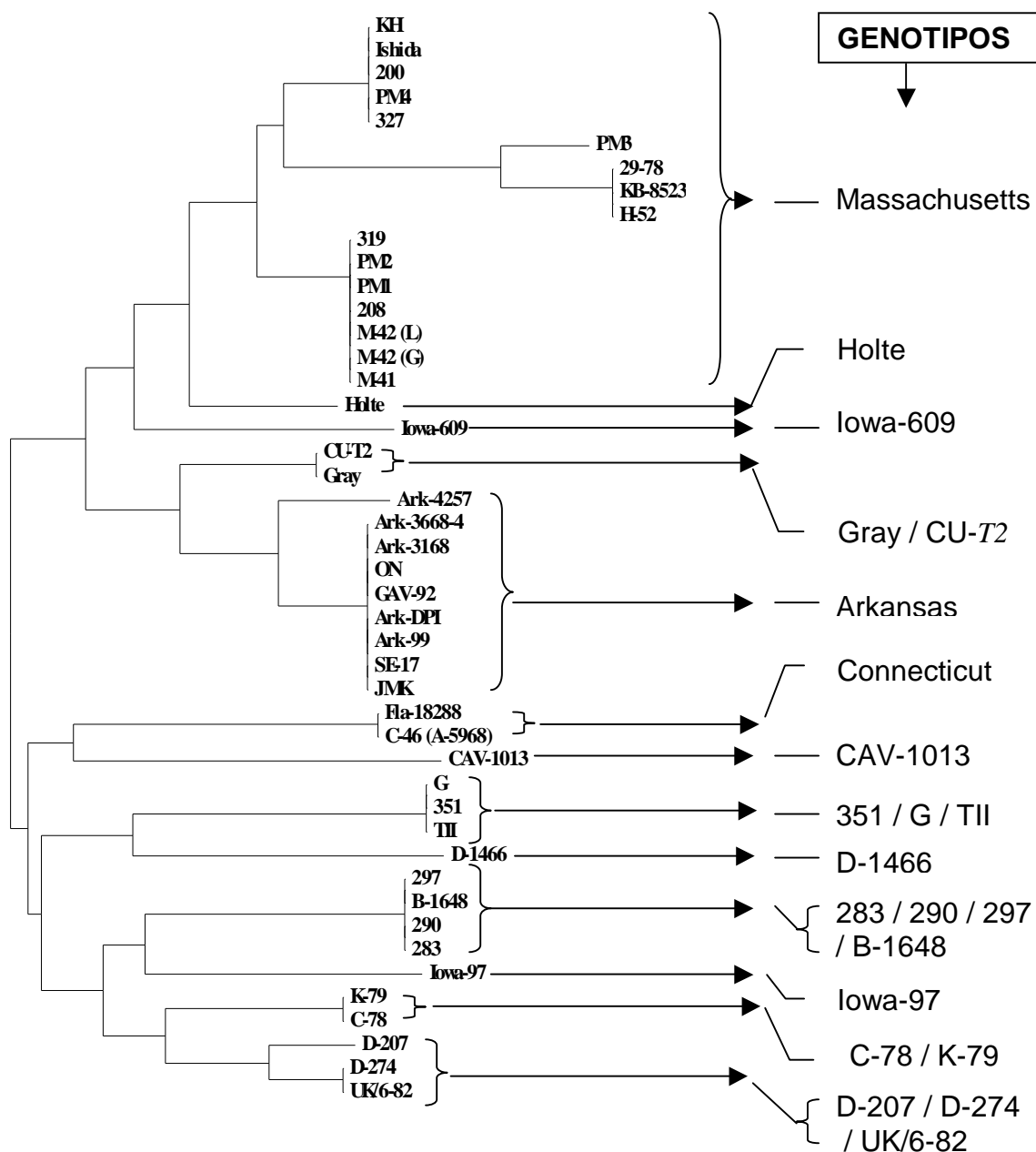


Figura 28 - Genotipificação. Árvore filogenética de VBIGs sem raiz construída com o programa TREECON a partir dos resultados da análise por RFLP com cinco enzimas de restrição (*Bst*YI, *Dde*I, *Hpa*II, *Pst*I e *Sca*I) de parte do gene S2 de 46 VBIGs procedentes de três fontes de informações (GenBank + WebGene, Lin *et al.*, 1991a e deste trabalho).

Os isolados japoneses C-78 e K-79 também permaneceram agrupados em um genótipo próprio, como foi encontrado por Lin *et al.* (1991a) ao construir uma árvore filogenética simples (não utilizou o programa TREECON) visando a genotipificação, próximos do genótipo “283 / 290 / 297 / B-1648”, contendo o VBIG belga variante B-1648 e dos isolados brasileiros 283, 290 e 297.

Um resultado curioso foi o agrupamento do VBIG norte-americano CU-T2 com o Gray, cujo gene S2 ainda não foi sequenciado, em um genótipo único “Gray / CU-T2”, sendo que o Gray não entrou no estudo (Jia *et al.*, 1995) que comprovou ser a CU-T2 um variante recombinante de três diferentes VBIGs conhecidos [gene S1 (90% das seqüências de nucleotídeos são idênticas às do Ark-99 e 10% do M-41), gene S2 (65% do Ark-99 e 35% de um desconhecido) e no gene N (40% do Ark-99 e 60% do H-52)]. Hipoteticamente, talvez o Gray seja o quarto VBIG “desconhecido”, o qual teria participação de 35% no processo natural de recombinação homóloga no gene S2 do CU-T2, conforme a parte estudada do gene S2 neste estudo demonstrou, mas a seqüência completa do gene S2 teria de estar invertida em sua posição 5' → 3'. Entretanto, pelo mapa de caracterização esquemática do genoma do CU-T2 apresentado por Jia *et al.* (1995), a região estudada neste trabalho pertence ao Ark-99, conforme, também, pode ser observado na Tabela 11 (partes A, B, C, D e E). As mutações (substituições) ocorreram em poucos nucleotídeos, porém suficientes para mantê-los próximos, mas não juntos (Figuras 27 e 28).

A genotipificação encontrada para outros VBIGs foi coerente com as fontes de informações originais e não poderia ser diferente: KH e Ishida (genótipo “Massachusetts” - Lin *et al.*, 1991a), Iowa-609 (genótipo homônimo - Lin *et al.*, 1991a), D-207, UK/6-82 e D-274 (muito parecidos quanto aos genes S1 e S2 - Cavanagh *et al.*, 1992b; Kusters *et al.*, 1990), e o CAV-1013 (genótipo homônimo ou “Variante” -

gene S1/ Kwon *et al.*, 1993a,b; Jackwood *et al.*, 1997).

Os isolados 351, G e TII ficaram agrupados separadamente em um genótipo próprio (“351 / G / TII”) numa topologia próxima ao VBIG D-1466, sabidamente variante, recombinante e pertencente a um genótipo / sorotipo isolado que tem o próprio nome, independente se a análise for do gene S1 ou S2 (Kusters *et al.*, 1989b; Kusters *et al.*, 1990).

Os seis isolados brasileiros (283, 290, 297, 351, G e TII), de acordo com as evidências (Figuras 27 e 28), seguramente são variantes. Podem ser, também, recombinantes, mas, no caso de recombinação, a suspeita de enquadramento nesta situação deve ser estendida para qualquer um dos isolados estudados, inclusive daqueles agrupados no genótipo “Massachusetts”, aliás, um grupo cujos componentes estiveram em permanente circulação, quando se analisa os isolados tomando por base o ano do surto, o período e a região de ocorrência. Por isto, com relação à recombinação, nada pode ser afirmado com base apenas nos resultados deste trabalho onde somente parte ($\cong 1/4$) do gene S2 foi estudado. Estes resultados são insuficientes para uma conclusão segura do(s) sítio(s) de recombinação(ões) e seriam necessários estudos de seqüenciamentos genômicos comparativos completos dos genes S (S1 + S2), M e N para detecção de áreas contendo seqüências homólogas. A recombinação pode ocorrer em um gene e não necessariamente em outro, podendo alterar ou não suas características relacionadas à genotipificação / sorotipificação, conforme já comprovado com outros VBIGs no mundo [entre diferentes VBIGs (um norte-americano e seis europeus) do genótipo / sorotipo “Massachusetts” (Cavanagh *et al.*, 1992a); CU-T2 (Jia *et al.*, 1995); D-207, KB-8523 e UK/6-82 (Kusters *et al.*, 1990) e outros (Wang *et al.*, 1993)].

4.9. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A participação do estado de Minas Gerais no total da parte final da cadeia produtiva (produções de carne e ovo de consumo) da avicultura industrial brasileira vem, gradativamente, decaindo nas últimas décadas [exemplos: anos (percentagens nas produções de frangos de corte / ovos de consumo do estado proporcionalmente ao total da produção brasileira nos dois tipos de produção – carne e ovo): 1980 (14,8 / 16,42) → 1990 (8,9 / 10,87) → 1999 (8,4 / 10,25)]. Entretanto, apesar destes números, tomando por base as informações sobre instalações de empresas e o número de aves alojadas, o crescimento do segmento de produção de frangos de corte foi da ordem de 250% desde o início da década de 80, embora o de produção de ovos de consumo tenha aumentado apenas 10% (Dra. Marília Martha Ferreira, AVIMIG, Minas Gerais - *Comunicação Pessoal*). Estas informações visam mostrar a importância do segmento avícola estadual no contexto nacional e pode-se afirmar que está passando por profundas reestruturações visando melhorar ainda mais sua eficiência.

No período entre 1985 e 1986, foi realizado (Setor de Doenças das Aves / DMVP / EV / UFMG + MAA + EMATER + AVIMIG) um estudo em 78 granjas de frangos de corte no qual fez-se um levantamento sorológico de vários agentes infecto-contagiosos virais e bacterianos, incluindo o VBI, nas mesmas regiões (Alto São Francisco e Metalúrgica) do estado de Minas Gerais de onde vieram os isolados utilizados neste trabalho (Jorge *et al.*, 1992). Neste estudo, ficou evidenciada soropositividade ao teste de imunodifusão para o VBI em 30 granjas, embora a vacinação contra o VBI (vacina viva atenuada H-120) tenha ocorrido em apenas 12 das 30 soropositivas, indicando a circulação do VBI nas granjas das regiões estudadas. Em decorrência desses resultados sorológicos, foi realizado um grande esforço visando o isolamento daqueles VBIs autóctones circulantes, que culminou com quatro dos isolados que foram utilizados neste trabalho (PM1, PM2, PM3 e PM4).

Na tentativa de se correlacionar patogenicidade e antigenicidade de VBIs já bem caracterizados nestas duas características biológicas individuais, alguns trabalhos foram realizados em outros países, mas os resultados foram inconclusivos devido, em parte, aos fatores extrínsecos e intrínsecos, inerentes ou não, à ocorrência do surto ou relacionados à reprodução experimental da infecção (Avellaneda *et al.*, 1994; Cook *et al.*, 1986; Dhinakar Raj & Jones, 1997). Neste trabalho, também foi impossível estabelecer um relacionamento entre as informações individuais dos isolados ligadas à patogenicidade (sinais clínicos principais no surto de origem - Tabela 3) com os resultados da genotipificação estabelecida (Figuras 27 e 28), onde os isolados envolvidos com problemas respiratórios, síndrome nefrite - nefrose ou ambas ficaram distribuídos em três genótipos distintos.

Estudos com alguns isolados utilizados neste trabalho foram realizados anteriormente. Primeiramente, Resende (1983) e Resende *et al.* (1989) estudaram os isolados 208 e 29-78, agora agrupados no genótipo "Massachusetts", usando a patogenicidade comparada em franginhos SPF e gnotobióticos, verificando que ambas lesaram intensamente o sistema respiratório daquelas aves. Curiosamente, a partir da suspeita evidenciada neste trabalho de que o 29-78 talvez seja o próprio VBI vacinal H-52, não foram encontradas lesões (macro / microscópicas) nos rins dos franginhos comprovadamente expostos e infectados pelo vírus, o que seria esperado nas infecções das aves, obviamente dentro da faixa etária estudada que foi do 21º ao 51º dia de idade, altamente susceptível, com o H-52 (Albassam *et al.*, 1986; Winterfield & Albassam, 1984). Isto, hipoteticamente, sugeriu que o 29-78, caso não seja o próprio H-52, seria um recombinante e, neste caso, pelo menos o segmento de DNA estudado do gene S2 pertenceria ao H-52, apesar do fato de que, na época do seu isolamento (1978), o H-52 ainda não estava oficialmente liberado para uso na avicultura industrial brasileira (Villa, 1998). O PM3 também seria um recombinante com grande parte do segmento estudado pertencente ao

H-52. As mesmas considerações podem ser feitas com relação ao 208, só que relacionadas ao M-41, sabidamente pneumotrópico, mas não nefrotrópico (Cavanagh & Naqi, 1997; Dhinakar Raj & Jones, 1997).

Em um estudo utilizando a técnica de SN / CAT (Cook *et al.*, 1976; Darbyshire *et al.*, 1979), Epiphany (1998) verificou que os isolados 208, 29-78 e PM2 pertencem ao sorotipo "Massachusetts" e não ao "Connecticut", resultados que corroboram com os da genotipificação deste trabalho. Porém, observou que o PM4 é um sorotipo diferente, resultado que difere deste trabalho, mas que pode ser explicado, talvez, pelo fenômeno de variabilidade genotípica e, por consequência, fenotípica "S1 / S2 dependente" descoberto por Callison *et al.* (1999).

Em outro estudo, utilizando a técnica de ELISA com anticorpos monoclonais (AcMs) A13 e A38, especificamente dirigidos contra a glicoproteína S1 do VBIG M-41 e a 13 dos 15 isolados deste trabalho, Souza (1999) verificou que os isolados 208, PM1 e PM2 foram identificados como pertencentes ao sorotipo "Massachusetts" e os isolados 283, 290, 297, 351, G e TII não. Os resultados estão de acordo com este trabalho de genotipificação e, curiosamente, os isolados 319, 327, PM3, PM4 e o vacinal H-52, detectados como sendo do genotipo "Massachusetts", não foram detectados pelos AcMs específicos da S1 do M-41, o que indicou variabilidade antigênica na glicoproteína S1 para a qual a especificidade dos AcMs é direcionada e, também nesse caso, talvez, tenha sido a situação descrita por Callison *et al.* (1999).

Dentro da linha de pesquisa empregando metodologias de biologia molecular no diagnóstico e controle de viroses causadoras de doenças das aves, outro estudo de RT-PCR (parte do gene N - técnica original de Zwaagstra *et al.*, 1992) com análise por RFLP (enzima de restrição Avall) foi realizado com os mesmos isolados deste trabalho (Abreu, 2000) e os isolados 283, 290 e 297 apresentaram um padrão de restrição enzimática totalmente diferente

dos demais, corroborando os deste trabalho, apesar do gene ser diferente. Os demais foram agrupados em três genogrupos (genotipos), sendo que os 29-78, PM1 e PM2 ficaram juntos com o vacinal H-52, o que está coerente com os resultados deste trabalho. Os demais ficaram participando, ao mesmo tempo (não houve possibilidade técnica de separação individual) entre os genotipos "Massachusetts" e "Arkansas", em decorrência do uso de uma única enzima de restrição.

Quatorze dos 15 isolados brasileiros utilizados neste estudo já foram estudados por RT-PCR com análise por RFLP (gene total S1 - técnica original de Kwon *et al.*, 1993a) por Santiago *et al.* (2000) e os isolados 283, 290 e 297, como neste trabalho, apresentaram resultados que também os classificam como variantes.

O VBIG é considerado o pior patógeno para galinha, em grande parte devido às variabilidades genômica e, conseqüentemente, antigênica, situação que torna difícil o seu controle com vacinas (Cavanagh *et al.*, 1992a,b; Cavanagh & Naqi, 1997). Como nenhum dos quinze isolados brasileiros mostraram relacionamento genético com os genotipos "Connecticut" e "Arkansas", situação resultante, provavelmente, da política correta do Ministério da Agricultura no que concerne à liberação de VBIGs vacinais vivos importados (apenas alguns do sorotipo "Massachusetts" foram autorizados para comercialização como vírus vivo - a partir de 2001, outros sorotipos podem ser comercializados inativados) para o controle do VBIG no Brasil (Resende, 1983; Villa, 1998). Isto ficou evidenciado com a polarização de nove dos 15 isolados brasileiros dentro do genotipo "Massachusetts" mas, infelizmente, esta situação, mesmo naquele momento (período entre 1972 e 1989), não poderia ser extrapolada para outras regiões do país naquela época, o mesmo valendo para a avicultura industrial brasileira atual, inclusive a instalada no estado de Minas Gerais. Embora não tenha sido o caso dos isolados utilizados neste trabalho, os quais foram

obtidos a partir de surtos da BIG em plantéis não vacinados contra o VBIG (Tabela 3), se outros VBIGs vacinais tivessem sido liberados para uso na avicultura industrial brasileira, a exemplo do ocorrido em alguns países (Tabela 4), VBIGs com outras características genóticas poderiam ter sido isolados.

Mesmo diante da situação aparentemente favorável, descrita anteriormente, os isolados diferentes ou variantes, os quais não têm relacionamento genotípico com os genótipos / sorotipos tradicionais ("Massachusetts", "Connecticut", "Arkansas", etc.), ocorreram naturalmente (283, 290, 297, 351, G e TII), além de outros descritos por Lunge *et al.* (1998) na região sul do Brasil. Embora a história dos isolados do sul não tenha sido descrita por Lunge *et al.* (1998) e, portanto, não se pode afirmar nada sobre eles, os isolados estudados neste trabalho poderiam, hipoteticamente, infectar frangos de corte / galinhas adequadamente vacinados com VBIGs vacinais (vivos / inativados) do genótipo / sorotipo "Massachusetts" e, até mesmo, de outros genótipos / sorotipos (Kwon *et al.*, 1993a), como por exemplo, "Connecticut", "Arkansas", "Gray / JMK", "Holte", "Iowa-97" e "SE-17", caso tivessem sido liberados. Estes isolados variantes poderão compor, individualmente ou em grupo, vacinas inativadas, preferencialmente, ou vacinas vivas atenuadas, para uso regional, após estudos gênicos (genes S1, N, etc.) e imunogênicos complementares, a exemplo de situações homólogas ocorridas em outros países [Tabela 4 - Bélgica (B-1648 - vacina inativada oleosa), Holanda (D-207 e D-274 - vacinas vivas atenuadas e/ou inativadas oleosas; D-1466 - vacina inativada oleosa), Inglaterra (UK/6-82 - vacina inativada oleosa) e Japão (C-78 - vacina viva atenuada)]. Obviamente, novos isolados oriundos de granjas com problemas

sugestivos da BIG tecnicamente terão preferência na composição das novas vacinas, caso os aqui estudados não estejam mais circulando nas regiões de origem ou em outras, devido à permanente variabilidade do VBIG na natureza sendo, portanto, necessária à atualização dos isolados prevalentes autóctones.

Paralelamente aos estudos gênicos e imunogênicos, estudos sobre a patogenicidade dos isolados antigos e novos, principalmente daqueles candidatos a se tornarem vacinas vivas atenuadas, devem ser realizados para uma melhor avaliação de suas potencialidades e limitações de uso, por exemplo, na questão fascinante da patogenicidade nas infecções sinérgicas e que são a realidade no ambiente (dinâmico e altamente estressante) da avicultura industrial (Albassam *et al.*, 1986; Animas *et al.*, 1994; Avellaneda *et al.*, 1994; Bhattacharjee & Jones, 1997; Butcher *et al.*, 1990; Cavanagh & Naqi, 1997; Collisson *et al.*, 1992; Cook & Huggins, 1986; Cook *et al.*, 1986; Crinion & Hofstad, 1972; Cumming & Chubb, 1988; Darbyshire *et al.*, 1976; De Wit *et al.*, 1998; Dhinakar Raj & Jones, 1997; Gough *et al.*, 1992; Ignjatovic, 1988; Lai & Cavanagh, 1997; Nakamura *et al.*, 1996; Ratanasethakul & Cumming, 1983; Resende, 1983; Resende *et al.*, 1989; Rosenberger & Gelb, 1987; Sander *et al.*, 1997; Sevoian & Levine, 1957; Smith *et al.*, 1985; Zanella, 1988; Winterfield & Albassam, 1984).

Finalmente, como acontecido em outros países (Cavanagh *et al.*, 1992a,b; Cook, 1984; Cubillos *et al.*, 1991; Davelaar *et al.*, 1984; Gelb *et al.*, 1991; Ignjatovic *et al.*, 1997; King, 1988; Kusters *et al.*, 1987; Kusters *et al.*, 1989a,b; Lin *et al.*, 1991a,b), em se tratando do VBIG, é importante

5. CONCLUSÕES

- A RT-PCR utilizada neste trabalho mostrou ser uma importante ferramenta na confirmação diagnóstica de isolados suspeitos de serem VBIGs e seu caráter universal foi confirmado para todos quinze VBIGs estudados, isolados no período entre 1972 e 1989, a partir de granjas com surtos da BIG na avicultura industrial das Regiões do Alto São Francisco e Metalúrgica do estado de Minas Gerais.
- A confirmação da presença de VBIGs variantes entre os isolados estudados foi preocupante mas previsível em função do fato deste problema ser inerente ao VBIG e à avicultura industrial, não sendo, portanto, só local, mas mundial. Esforços no sentido de verificar se estes variantes ainda permanecem nas regiões de origem e, também, visando isolar novos VBIGs, variantes ou não, devem ser implementados nas mesmas regiões e em outras contendo alta concentração avícola no estado de Minas Gerais.
- As informações da filogenia e da genotipificação, realizadas a partir de árvores filogenéticas sem raízes, sugeriram que os quinze isolados brasileiros divididos em dois troncos básicos (um envolvendo o genótipo “Massachusetts” e, outro, os genótipos que agrupam os variantes “283 / 290 / 297 / B-1648” e “351 / G / TII”) têm, provavelmente, uma “origem ancestral não comum”. A natureza evolucionária dos isolados brasileiros pertencentes aos dois genótipos que agrupam os variantes é totalmente desconhecida e necessita ser estudada mais profundamente.
- A constatação mais importante da genotipificação neste trabalho foi o não relacionamento genético dos 15 isolados brasileiros com os genótipos / sorótipos “Connecticut” e “Arkansas”, dentro do universo amostral / temporal / regional estudado, refletindo, talvez, a política correta de liberação oficial controlada de alguns VBIGs vacinais importados e apenas do genótipo / sorótipo “Massachusetts”.
- A utilização da análise por RFLP comparada da parte estudada do gene S2 de VBIGs disponibilizados em diferentes fontes de informação (GenBank + EMBL + DDBJ) permitiu uma maior amplitude analítica dos resultados obtidos com os VBIGs brasileiros e, conseqüentemente, sua inclusão em um estudo macro de relacionamento genético global inter-VBIGs, o que propiciou a montagem de árvores filogenéticas e o estabelecimento de uma classificação genotípica, ambas coerentes e respaldadas pela literatura científica.

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**. 2000. 51 f. Tese (Mestrado). Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- 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.
- ALTSCHUL, S. F.; GISH, W.; MILLER, W. et al. Basic local alignment search tool. **J. Mol. Biol.**, v. 215, n. 3, p. 403-410, 1990.
- ANDRADE, I. F.; VILLEGAS, P.; FLETCHER, O. J. Vaccination of day-old broilers against infectious bronchitis: Effect of vaccine strain and route of administration. **Avian Dis.**, v. 27, n. 1, p. 178-187, 1983.
- 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.
- ANIMAS, S. B.; OTSUKI, K.; TSUBOKURA, M. et al. Comparison of the susceptibility of chicks of different ages to infection with nephrosis-nephritis causing strain of infectious bronchitis virus. **J. Vet. Med. Sci.**, v. 56, n. 5, p. 449-453, 1994.
- AVELLANEDA, G. E. Estructura del virus de bronquite infecciosa. **Avic. Profes.**, v. 10, n.1, p. 38-40, 1992.
- AVELLANEDA, G. E.; VILLEGAS, P.; JACKWOOD, M. W. et al. *In vivo* evaluation of the pathogenicity of fields isolates of infectious bronchitis virus. **Avian Dis.**, v. 38, n. 4, p. 589-597, 1994.
- AUSUBEL, F. M.; BRENT, R.; KINGSTON, R. E. et al. **Short protocols in molecular biology**, 2 ed. New York: Harvard Medical School, 1992. p. 4.2-4.3.
- BELÁK, S.; BALLAGI-PORDÁNY, A. Application of the polymerase chain reaction (PCR) in veterinary diagnostic virology. **Vet. Res. Commun.**, v. 17, n. 1, p. 55-72, 1993.
- BEISEL, C. E. Recent advances in PCR for diagnostic applications. In: SYMPOSIUM OF IMPROVED DIAGNOSIS OF AVIAN DISEASES USING MOLECULAR BIOLOGY. AMERICAN ASSOCIATION VETERINARY MEDICAL ASSOCIATION MEETING, 129., 1992, Boston. **Proceedings...** Boston: American Association of Avian Pathologists, 1992. p. 39-44.
- BHATTACHARJEE, P. S.; JONES, R. C. Susceptibility of organ cultures from chicken tissues for strains of infectious bronchitis virus isolated from the intestine. **Avian Pathol.**, v. 26, n. 5, p. 553-563, 1997.
- BIJLENGA, G. Het infectieuze bronchitis virus bij kuikens in Nederland aangetoond met behulp van ei-enting, dierexperimenteel onderzoek en serumneutralisatieproeven. **Tijdschr. Dierg.**, v. 81, n. 1, p. 43-54, 1956.
- BINNS, M. M. The application of molecular biology to the study of veterinary infectious diseases. **Br. Vet. J.**, v. 149, n. 1, p. 21-30, 1993.
- 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. 3, p. 719-726, 1985.

- BINNS, M. M.; BOURSNEILL, M. E. G., TOMLEY, F. M. et al. Comparison of the spike precursor sequences of coronavirus IBV strains M41 and 6/82 with that of IBV Beaudette. **J. Gen. Virol.**, v. 67, n 11, p. 2825-2831, 1986.
- BOURSNEILL, M. E. G.; BROWN, T. D. K.; FOULDS, P. F. et al. Completion of the sequence of the genome of the coronavirus avian infectious bronchitis virus. **J. Gen. Virol.**, v. 68, n. 1, p. 57-77, 1987.
- BRL, Instruction manual GIBCO BRL - SuperScript preamplification system for first strand cDNA synthesis.** Bethesda: Life Technologies, 1993a. 33 p. (Cat. N° 18089-011).
- BRL, Instruction manual GIBCO BRL - TRIZOL LS reagent (Total RNA isolation reagent for liquid samples).** Bethesda: Life Technologies, 1993b. 12 p. (Cat. N° 10296-028).
- BROWN, T. D. K.; CAVANAGH, D.; BOURSNEILL, M. E. G. Confirmation of the presence of avian infectious bronchitis virus (IBV) using cloned DNA complementary to the 3' terminus of the IBV gene. **Avian Pathol.**, v. 13, n. 1, p. 109-117, 1984.
- BROWN, T. D. K.; BOURSNEILL, M. E. G. Avian infectious bronchitis virus genomic RNA contains sequences homologous at the intergenic boundaries. **Virus Res.**, v.1, n. 1, p. 15-24, 1984.
- BUMSTEAD, N.; HUGGINS, M. B.; COOK, J. K. A. Genetic differences in susceptibility to a mixture of avian infectious bronchitis virus and *Escherichia coli*. **Br. Poult. Sci.**, v. 30, n. 1, p. 39-48, 1989.
- BUTCHER, G. D.; WINTERFIELD, R. W.; SHAPIRO, D. P. Pathogenesis of H13 nephropathogenic infectious bronchitis virus. **Avian Dis.**, v. 34, p. 916-921, 1990.
- CALLISON, 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.
- CAVANAGH, D. Coronaviruses. In: ZUCKERMAN, A. Z.; BANATVALA, J. E.; PATTISON, J. R., eds. **Principles and practice of clinical virology**, 3 ed. Chichester: John Wiley and Sons, 1995. p. 325-336.
- CAVANAGH, D.; DAVIS, P. J.; DARBYSHIRE, J. H. et al. Coronavirus IBV: virus retaining spike glycoprotein 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. A. Amino acids within hypervariable region 1 of avian coronavirus IBV (Massachusetts serotype) spike glycoprotein are associated with neutralization epitopes. **Virus Res.**, v. 11, n. 1, p. 141-150, 1988.
- CAVANAGH, D.; DAVIS, P. J.; COOK, J. K. A. Infectious bronchitis virus: evidence for recombination within the Massachusetts serotype. **Avian Pathol.**, v. 21, n. 2, p. 401-408, 1992a.
- 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, 1992b.
- CAVANAGH, D.; BRIAN, D. A.; BRINTON, M. A. et al. Revision of the taxonomy of the Coronavirus, Torovirus e Arterivirus genera. **Arch. Virol.**, v. 135, n. 1, p. 227-237, 1994.
- CAVANAGH, D.; BRIAN, D. A.; BRINTON, M. A. et al. Coronaviridae. In: MURPHY, F. A. et al., (Eds). **Virus Taxonomy** (Sixth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses). Vienna; NY: Springer-Verlag, 1995. p. 407-411.
- CAVANAGH, D.; ELLIS, M. M.; COOK, J. K. A. Relationship between sequence variation in the 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.; DAVIS, P. J. Sequence analysis of strains of avian infectious bronchitis coronavirus isolated during the 1960's in the U.K. **Arch. Virol.**, v. 130, n. 2, p. 471-476, 1992.
- CAVANAGH, D.; NAQI, S. A. Infectious bronchitis. In: CALNEK, B. W. et al., eds. **Diseases of poultry**. 10. ed. Ames: Iowa State University, 1997. p. 511-526.
- 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.
- CHONG, K. T.; APOSTOLOV, K. The pathogenesis of nephritis in chickens induced by infectious bronchitis virus. **J. Comp. Pathol.**, v. 92, n. 1, p. 199-211, 1982.
- CHUBB, R. C. The detection of antibody to avian infectious bronchitis virus by the use of immunofluorescence with tissue sections of nephritic kidneys. **Aust. Vet. J.**, v. 63, n. 1, p. 131-132, 1986.
- COLLISSON, E. W.; PARR, R. L.; LI, W. et al. An overview of the molecular characteristics of avian infectious bronchitis virus. **Poult. Sci. Rev.**, v. 4, n. 1, p. 41-55, 1992.
- COOK, J. K. A. The classification of new serotypes of infectious bronchitis virus isolated from poultry flocks in Britain between 1981 and 1983. **Avian Pathol.**, v. 13, n. 4, p. 733-741, 1984.
- COOK, J. K. A.; 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.; 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. A.; SMITH, H. W.; HUGGINS, M. B. Infectious bronchitis immunity: Its study in chickens experimentally infected with mixtures of infectious bronchitis virus and *Escherichia coli*. **J. Gen. Virol.**, v. 67, n. 7, p. 1427-1434, 1986.
- COOK, J. K. A.; OTSUKI, K.; MARTINS, N. R. S. et al. The secretory antibody response of inbred lines of chickens to avian infectious bronchitis virus infection. **Avian Pathol.**, v. 21, n. 3, p. 681-692, 1992.
- COWEN, B. S.; WIDEMAN, R. F.; ROTHENBACHER, H. et al. A outbreak of avian urolithiasis on a large commercial egg farm. **Avian Dis.**, v. 31, n. 2, p. 392-397, 1987.
- 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.
- CSERMELYI, M.; THIJSSSEN, R.; ORTHEL, F. et al. Serological classification of recent infectious virus isolates by the neutralization of immunofluorescent foci. **Avian Pathol.**, v. 17, p. 139-148, 1988.
- CUBILLOS, A.; ULLOA, J.; CUBILLOS, V. et al. Characterisation of strains of infectious bronchitis virus isolated in Chile. **Avian Pathol.**, v. 20, n. 1, p. 85-99, 1991.
- CUMMING, R. B. Infectious avian nephrosis (uraemia) in Australia. **Aust. Vet. J.**, v. 39, n. 1, p. 145-147, 1963.
- CUMMING, R. B. The control of avian infectious bronchitis / nephrosis in Australia. **Aust. Vet. J.**, v. 45, n. 1, p. 200-203, 1969.
- CUMMING, R. B. & CHUBB, R. C. The pathogenesis of nephritis evoked by Australian IB viruses. In: FIRST INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON INFECTIOUS BRONCHITIS, 1988, Rauschholzhausen. **Proceedings...** Rauschholzhausen, Germany, 1988. p. 129-132.

- CUNNINGHAM, C. H. **A laboratory guide in virology**, 7 ed. Minneapolis: Burgess, 1973. 103 p.
- DALTON, K.; PÉNZES, Z.; WROE, C. et al. Sequence elements involved in the rescue of IBV defective RNA CD-91. **Adv. Exp. Med. Biol.**, v. 440, n. 1, p. 253-257, 1998.
- DARBYSHIRE, J. H.; COOK, J. K. A.; PETERS, R. W. Organ culture studies on efficiency of infection of chicken tissues with avian infectious bronchitis virus. **Brit. J. Experim. Pathol.**, v. 57, p. 443-454, 1976.
- DARBYSHIRE, J. H.; 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. 2, p. 227-238, 1979.
- DAVELAAR, F. G.; KOUWENHOVEN, 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. 1, p. 114-120, 1984.
- DEACON, N. J. & LAH, M. The potential of the polymerase chain reaction in veterinary research and diagnosis. **Aust. Vet. J.**, v. 66, n. 3, p. 442-444, 1989.
- DE WIT, J. J. Technical Review: Detection of infectious bronchitis virus. **Avian Pathol.**, v. 29, n. 1, p. 71-93, 2000.
- DE WIT, J. J.; MEKKES, D. R.; KOUWENHOVEN, B. et al. Sensivity and specificity of serological tests for infectious bronchitis virus antibodies in broilers. **Avian Pathol.**, v. 26, n. 1, p. 105-118, 1997.
- DE WIT, J. J.; JONG, M. C. M.; PIJPERS, A. et al. Transmission of infectious bronchitis virus within vaccinated and unvaccinated groups of chickens. **Avian Pathol.**, v. 27, n. 2, p. 464-471, 1998.
- DI FÁBIO, J. Bronquite infecciosa das galinhas: aspectos clínicos e controle da BIG no Brasil. In: CONFERÊNCIA APINCO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLAS, 1993, Santos. **Anais...** Santos: FACTA, 1993. p. 1-8.
- DHINAKAR-RAJ, G.; JONES, R. C. Infectious bronchitis virus: immunopathogenesis of infection in the chicken. **Avian Pathol.**, v. 26, n. 3, p. 677-706, 1997.
- DOI, M.; YAMAKAMI, T.; KOIMARU, H. et al. Serotypes of avian infectious bronchitis virus isolates from field cases in Japan. **Avian Dis.**, v. 26, n. 4, p. 946-956, 1982.
- EPIPHANIO, E. O. B. **Cultivos de anéis de traquéia para ensaios com o vírus da bronquite infecciosa das galinhas**. 1998. 73 f. Tese (Mestrado). Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- FIELDS, D. B. Arkansas 99, a new infectious bronchitis serotype. **Avian Dis.**, v. 17, n. 3, p. 659-661, 1973.
- GELB, J. Infectious bronchitis. In: PURCHASE, H. G. et al (Eds). **A laboratory manual for the isolation and identification of avian pathogens**, 3 ed. PA: American Association of Avian Pathologists, 1989. p. 124-127.
- GELB, J.; PERKINS, B.E.; ROSENBERGER, J.K. et al. Serologic and cross-protection studies with several infectious bronchitis virus isolates from Delmarva-reared broiler chickens. **Avian Dis.**, v. 25, n. 3, p. 655-666, 1981.
- GELB, J.; LEARY, J. H.; ROSENBERGER, J. K. Prevalence of Arkansas-type infectious bronchitis virus in Delmarva Peninsula chickens. **Avian Dis.**, v. 27, n. 3, p. 667-678, 1983.
- GELB, J.; FRIES, P. A.; CRARY, C. K. et al. Sentinel bird approach to isolating infectious bronchitis virus. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, v. 190, p. 16-28, 1987.

- GELB, J.; WOLFF, J. F.; MORAN, C. A. Variant serotypes of infectious bronchitis virus isolated from commercial layer and broiler chickens. **Avian Dis.**, v. 35, p. 82-87, 1991.
- GLAHN, R. P.; WIDEMAN, R. F.; COWEN, B. S. Order of exposure to high dietary calcium and Gray strain infectious bronchitis virus alters renal function and the incidence of urolithiasis. **Poult. Sci.**, v. 68, n. 6, p. 1193-1204, 1989.
- 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. Microbiol.**, v. 2, n. 1, p. 289-301, 1978.
- 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. 3, p. 493-494, 1992.
- GRAVITT, P. E.; MANOS, M. M. Nucleic acid hybridization methods to detect microorganisms. **Lab. Anim. Sci.**, v. 43, n. 1, p. 5-10, 1993.
- HAWKES, R. A.; DARBYSHIRE, J. H.; PETERS, R. W. et al. Presence of viral antigens and antibody in the trachea of chickens infected with avian infectious bronchitis virus. **Avian Pathol.**, v. 12, n. 2, p. 331-340, 1983.
- HERRING, A. J.; INGLIS, N. F.; OJEH, C. K. et al. Rapid diagnosis of rotavirus infection by direct detection of viral nucleic acid in silver-stained polyacrylamide gels. **J. Clin. Microbiol.**, v. 16, n. 2, p. 473-477, 1982.
- HIPÓLITO, O. Isolamento e identificação do vírus da bronquite infecciosa das galinhas no Brasil. **Arq. Esc. Superior Vet. UREMG**, v. 10, n. 1, p. 131-150, 1957.
- HIPÓLITO, O.; BOTTINO, J. A.; PINTO, A. A. Estudo de duas amostras de vírus isoladas de casos de aves com a "Síndrome nefrite-nefrose". **Ciênc. Cult.**, v. 25, n. 3, p. 609, 1973.
- HIPÓLITO, O.; SILVA, J. M. L.; HSIUNG, H. M. et al. **Bronquite infecciosa das galinhas - A doença no Brasil**. São Paulo, 1979. 72 p.
- HOEKSTRA, J.; RISPENS, B. Infectieuze bronchitis bij pluimvee. **Tijdschr. Dierg.**, v. 85, n. 2, p. 398-403, 1960.
- HOFSTAD, M. S. Antigenic differences among isolates of avian infectious bronchitis virus. **Am. J. Vet. Res.**, v. 19, n. 4, p. 740-743, 1958.
- HOFSTAD, M. S. Antigenic and immunological studies on several isolates of avian infectious bronchitis virus. **Avian Dis.**, v. 5, n. 1, p. 102-107, 1961.
- HOFSTAD, M. S. Avian infectious bronchitis. In: Hofstad, M. S. et al (Eds). **Diseases of poultry**. 6. ed. Ames: Iowa State University Press, 1972. p. 586-606.
- HOFSTAD, M. S.; YODER, H. W. Avian infectious bronchitis virus distribution in tissues of chicks. **Avian Dis.**, v. 10, p. 230-239, 1966.
- HOLMES, K. V. Coronaviridae and their replication. In: FIELDS, B. N. & KNIPE, D. M. (Eds). **Virology**. New York: Raven, 1990. p. 841-856.
- 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.
- HOPKINS, S. R. Serological comparisons of strains of infectious bronchitis virus using plaque-purified isolants. **Avian Dis.**, v. 18, n. 1, 231-239, 1974.
- IGNJATOVIC, J. Epidemiology of infectious bronchitis in Australia. In: FIRST INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON INFECTIOUS BRONCHITIS, 1988, Rauschholzhausen. **Proceedings...** Rauschholzhausen, Germany, 1988. p. 84-88.

- IGNJATOVIC, J.; SAPATS, S. I.; ASHTON, F. A long-term study of Australian infectious bronchitis viruses indicates a major antigenic change in recently isolated strains. **Avian Pathol.**, v. 26, n. 3, p. 535-552, 1997.
- 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, p. 117-134, 1994.
- IKUTA, N. Diagnóstico de doenças em aves através da biologia molecular. In: CONFERÊNCIA APINCO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLAS, 1999, Campinas. **Anais...** Campinas: FACTA, 1999. p. 103-114.
- JACKWOOD, M. W. Diagnosis of infectious bronchitis virus using the polymerase chain reaction. In: SYMPOSIUM OF IMPROVED DIAGNOSIS OF AVIAN DISEASES USING MOLECULAR BIOLOGY. AMERICAN ASSOCIATION VETERINARY MEDICAL ASSOCIATION MEETING, 129., 1992, Boston. **Proceedings...** Boston: American Association of Avian Pathologists, 1992. p. 33-34.
- JACKWOOD, M. W.; YOUSEF, N. M. H.; 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.
- JEONG, Y. S.; MAKINO, S. Mechanism of coronavirus transcription: Duration of primary transcription initiation activity and effects of subgenomic RNA transcription on RNA replication. **J. Virol.**, v. 66, p. 3339-3346, 1992.
- 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.
- JOHNSON, R. B.; MARQUARDT, W. M., 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.
- JOHNSON, R. B. & MARQUARDT, W. W. The neutralizing characteristics of strains of infectious bronchitis virus as measured by the constant virus variable serum method in chicken tracheal cultures. **Avian Dis.**, v. 19, n. 1, p. 82-90, 1975.
- JORGE, M. A.; RESENDE, J. S.; OLIVEIRA, R. L. Levantamento sorológico em frangos de Minas Gerais: Doença de Gumboro, bronquite infecciosa e doença de Newcastle. **Arq. Bras. Med. Vet. Zoot.**, v. 44, n. 3, p. 545-547, 1992.
- KANT, A.; KOCH, G.; ROOZELAAR, D. J. et al. Location of antigenic sites defined by neutralizing monoclonal antibodies on the S1 avian infectious bronchitis virus glycopolypeptide. **J. Gen. Virol.**, v. 73, p. 591-596, 1992.
- KARACA, K.; NAQI, S.; GELB, J. Production and characterization of monoclonal antibodies to three infectious bronchitis virus serotypes. **Avian Dis.**, v. 36, n. 4, p. 903-915, 1992.
- KARACA, K.; NAQI, S. A monoclonal antibody-based ELISA to detect serotype-specific infectious bronchitis virus antibodies. **Vet. Microbiol.**, v.34, n. 1, p. 249-257, 1993.
- KIM, K. H.; NARAYANAN, K.; MAKINO, S. Characterization of coronavirus DI RNA packaging. **Adv. Exp. Med. Biol.**, v. 440, n. 3, p. 347-353, 1998.
- KING, D. J. A comparison of infectious bronchitis virus hemagglutination-inhibition test procedures. **Avian Dis.**, v. 32, n. 2, p. 335-341, 1988.

- KOCH, G.; HARTOG, L.; KANT, A. et al. Antigenic domains on the peplomer protein of avian infectious bronchitis virus: correlation with biological functions. **J. Gen. Virol.**, v. 71, p. 1929-1935, 1990.
- KOTIER, S. A.; CAVANAGH, D.; BRITTON, P. Experimental evidence of recombination in coronavirus infectious bronchitis virus. **Virology**, v. 213, p. 569-580, 1995.
- KUSTERS, J. G.; NIESTERS, H. 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.; JAGER, E. J.; LENSTRA, J. A. et al. Analysis of an immunodominant region of infectious bronchitis virus. **J. Immunol.**, v. 143, n. 9, p. 2692-2698, 1989a.
- 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, 1989b.
- 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.
- KWON, H. M.; JACKWOOD, M. W.; GELB, J. Differentiation of infectious bronchitis virus serotypes using polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism analysis. **Avian Dis.**, v. 37, n. 1, p. 194-202, 1993a.
- KWON, H. M.; JACKWOOD, M.; BROWN, T. P. et al. Polymerase chain reaction and a biotin-labeled DNA probe for detection of infectious bronchitis virus in chickens. **Avian Dis.**, v. 37, n. 1, p. 149-156, 1993b.
- LAI, M. M. C. RNA recombination in Animal and plant viruses. **Microbiol. Rev.**, v. 56, p. 61-79, 1992.
- LAI, M. M.; LIAO, C. L.; LIN, Y. J. et al. Coronavirus: How a large RNA viral genome is replicated and transcribed. **Infect. Agents Dis.**, v. 3, n. 1, p. 98-105, 1994.
- LAI, M. M. C.; CAVANAGH, D. The molecular biology of coronaviruses. **Adv. Virus Res.**, v. 48, n. 1, p. 1-100, 1997.
- LI, D.; CAVANAGH, D. Coronavirus IBV-induced membrane fusion occurs at near-neutral pH. **Arch. Virol.**, v. 122, n. 2, p. 307-316, 1992.
- 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, 1991a.
- LIN, Z.; KATO, A.; KUDOU, Y. et al. Typing of recent infectious bronchitis virus isolates causing nephritis in chickens. **Arch. Virol.**, v. 120, n. 1, p. 145-149, 1991b.
- LINK, W.; DIXENS, C.; SINGH, M. et al. Genetic diversity in European and Mediterranean faba bean germ plasm revealed by RAPD markers. **Theor. Appl. Genet.**, v. 90, n. 1, p. 27-32, 1995.
- LIU, D.; INGLIS, S. C. Association of the infectious bronchitis virus 3c protein within the virion envelope. **Virology**, v. 185, n. 4, p. 911-917, 1991.
- LOMNICZI, B. Biological properties of avian coronavirus RNA. **J. Gen. Virol.**, v. 36, n. 3, p. 531-533, 1977.
- LUCIO, B.; FABRICANT, J. Tissue tropism of three cloacal isolates and Massachusetts strain of infectious bronchitis virus. **Avian Dis.**, v. 26, n. 2, p. 508-519, 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**. Ames: American Association of Avian Pathologists, 1975. p. 182-188.

- LUNGE, V. R.; IKUTA, N.; FONSECA, A. S. K. et al. Caracterização de variantes do vírus da bronquite infecciosa (IBV). In: CONFERÊNCIA APINCO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLAS, 1998, Campinas. **Anais...** Campinas: FACTA, 1998. p. 50.
- MARQUARDT, W. W.; SNYDER, D. B.; SCHLOTTHOBER, B. A. Detection and quantification of antibodies to infectious bronchitis virus by enzyme-linked immunosorbent assay. **Avian Dis.**, v. 25, n. 3, p. 713-722, 1981.
- MARTINS, N. R. S. **Studies of the immunoglobulin responses to viral infections of chickens.** 1990. 255 f. Tese (Doutorado) - University of Surrey, Inglaterra.
- MARTINS, N. R. S.; RESENDE, J. S.; SOUZA, M. B. et al. Avaliação rápida parcial de isolados do vírus da bronquite infecciosa das galinhas. In: CONFERÊNCIA APINCO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLAS, 1996, Campinas. **Anais...** Campinas: FACTA, 1996. p. 98.
- MACNAUGHTON, M. R.; DAVIES, H. A.; NERMUT, M. V. Ribonucleoprotein-like structures from coronavirus particles. **J. Gen. Virol.**, v. 39, n. 2, p. 545-549, 1978.
- McDOUGALL, J. S. Infectious bronchitis in laying fowls - Its effect upon egg production and subsequent egg quality. **Vet. Rec.**, v. 83, n. 1, p. 84-86, 1968.
- McMARTIN, D. A. Preliminary investigation of methods for evaluating inactivated vaccines for infectious bronchitis virus. **Brit. Vet. J.**, v. 124, n. 1, p. 36-42, 1968.
- 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.
- MEULEMANS, G.; CARLIER, M. C.; GONZE, M. et al. Incidence, characterisation and prophylaxis of nephropathogenic avian infectious bronchitis viruses. **Vet. Rec.**, v. 120, n. 1, p. 205-206, 1987.
- MOCKETT, A. P. A.; DARBYSHIRE, J. H. Comparative of the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), haemagglutination inhibition test and agar gel precipitation test for detection of antibodies to avian infectious bronchitis virus. **Avian Pathol.**, v. 10, n. 1, p. 1-10, 1981.
- MOCKETT, A. P. A.; COOK, J. K. A.; HUGGINS, M. B. Maternally-derived antibody to infectious bronchitis virus: Its detection in chick trachea and serum and its role in protection. **Avian Pathol.**, v. 16, n. 2, p. 407-416, 1987.
- MURRAY, P. R.; DREW, W. L.; KOBAYASHI, G. S. et al. Coronavírus. **Microbiologia médica.** RJ: Guanabara Koogan, 1992. p. 440-442.
- NAKAMURA, K.; IMAI, K.; TANIMURA, N. Comparison of the effects of infectious bronchitis and infectious laryngotracheitis on the chicken respiratory tract. **J. Comp. Pathol.**, v. 114, n. 1, p. 11-21, 1996.
- NAQI, S. A. A monoclonal antibody-based immunoperoxidase procedure for rapid detection of infectious bronchitis virus in infected tissues. **Avian Dis.**, v. 34, n. 3, p. 893-898, 1990.
- NAQI, S. A.; KARACA, K.; BAUMAN, B. A monoclonal antibody-based antigen capture enzyme-linked immunosorbent assay for identification of infectious bronchitis virus serotypes. **Avian Pathol.**, v. 22, n. 3, p. 555-564, 1993.
- NEWTON, C. R. Background to PCR and its application areas, Cap. 1; Setting up a PCR laboratory, Cap. 2; Contamination avoidance, Cap. 9. In: NEWTON, C. R. (Ed). **PCR - essential data.** Chichester/UK: John Wiley & Sons, 1995. Cap.1, p. 1-6; Cap. 2, p. 7-11; Cap. 9, p. 87-92.

- OSHIRO, L. S. Coronaviruses. In: DALTON, A.; HAGUENAU, F. (Eds). **Ultrastructure of animal viruses and bacteriophages: an atlas**. New York: Academic, 1973. Cap. 18, p. 331-343.
- OTSUKI, K.; HUGGINS, M. B.; COOK, J. K. A. Comparison of the susceptibility to infectious bronchitis virus infection of two inbred lines of White Leghorn chickens. **Avian Pathol.**, v. 19, n. 2, p. 467-475, 1990.
- PANIAGO, M. T. **Atividade hemaglutinante de amostras do vírus da bronquite infecciosa das galinhas isoladas no Estado de Minas Gerais**. 1994. 44 f. Tese (Mestrado). Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- PARR, R. L. & COLLISSON, E. W. Epitopes on the spike protein of a nephropathogenic strain of infectious bronchitis virus. **Arch. Virol.**, v. 133, n. 2, 369-383, 1993.
- PFEFFER, M.; WIEDMANN, M.; BATT, C. A. Applications of DNA amplification techniques in veterinary diagnostics. **Vet. Res. Communic.**, v. 19, n. 2, p. 375-407, 1995.
- PÉNZES, Z.; TIBBLES, K.; SHAW, K. et al. Characterization of a replicating and packaged defective RNA of avian coronavirus infectious bronchitis virus. **Virology**, v. 203, n. 1, p.286-293, 1994.
- PÉNZES, Z.; WROE, C.; BROWN, T. D. K. et al. Replication and packing of coronavirus infectious bronchitis virus defective RNAs lacking a long open reading frame. **J. Virol.**, v. 70, n. 12, p. 8660-8668, 1996.
- POWELL, S. J. Protocol optimization and reaction specificity In: NEWTON, C. R. (Ed). **PCR - Essential Data**. Chichester/UK: John Wiley & Sons, 1995. p. 72-86.
- PROMEGA, **Promega life science catalog 1999**. Enzymes for molecular biology – cap. 5. Amplification – cap. 10. Madison: PROMEGA (cat. CA010-1), 1998. Cap. 5, p. 5.1-5.66; Cap. 10, p. 10.1-10.24.
- RATANASETHAKUL, C. & CUMMING, R. B. The effect of route of infection and strain of virus on the pathology of Australian infectious bronchitis. **Aust. Vet. J.**, v. 60, n. 1, p. 209-213, 1983.
- 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)**. 1983. 74 f. Tese (Mestrado). Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte:
- RESENDE, J. S.; VIEIRA, E. C.; RESENDE, M. Comparative pathogenesis of infection of gnotobiotic and specific-pathogen-free chickens with two strains of infectious bronchitis virus. **Arq. Bras. Med. Vet. Zoot.**, v. 41, n. 1, p. 17-27, 1989.
- RESENDE, J. S.; FLATSCHART, A. V. F.; FLATSCHART, R. B. et al. Detecção do vírus da bronquite infecciosa das galinhas por RT-PCR. In: Encontro de Pesquisa da Escola de Veterinária da UFMG, XVI, 1998, Belo Horizonte. **Anais...** Belo Horizonte: UFMG, 1998. p. 58.
- RODRIGUEZ, M. & SCHUDEL, A. A. Nucleic acid hybridization and polymerase chain reaction in the diagnosis of infectious animal diseases. **Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.**, v. 12, n. 3, p. 405-423, 1993.
- ROSENBERGER, J. K. & GELB, J. Response of several avian respiratory viruses as affected by infectious bursal disease virus. **Avian Dis.**, v. 22, n. 1, p. 95-105, 1987.
- SAITOU, N.; NEI, M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. **Mol. Biol. Evol.**, v. 4, n. 2, p. 406-425, 1987.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 2. ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1989. v. 2, p. 1-47.

- SANDER, J. E.; JACKWOOD, M. W.; ROWLAND, G. N. Protection by a commercial Arkansas-type infectious bronchitis virus vaccine against a field isolate of the same serotype. **Avian Dis.**, v. 41, n. 4, p. 964-967, 1997.
- SANTIAGO, S. L. T.; RESENDE, J. S.; ABREU, J. T. et al. Vírus da bronquite infecciosa das galinhas - Caracterização molecular de isolados da avicultura industrial no Estado de Minas Gerais. **Rev. Bras. Ciênc. Avíc.**, v. 1, sup. 2, p. 100, 2000.
- SCHAFFER, H.E.; SEDEROFF, R.R. "Least squares fit of DNA fragment length to gel mobility" algorithm. **Analytical Biochem.**, v. 115, n. 1, p. 113 - 122, 1981.
- SCHOCHETMAN, G.; STEVENS, R. H.; SIMPSON, R. W. Presence of infectious polyadenylated RNA in the coronavirus avian infectious bronchitis virus. **Virology**, v. 77, n. 2, p. 772-782, 1977.
- SCHULTZE, B.; CAVANAGH, D.; HERRLER, G. Neuraminidase treatment of avian infectious bronchitis coronavirus reveals a hemagglutinating activity that is dependent on sialic acid-containing receptors on erythrocytes. **Virology**, v.189, n. 2, p. 792-794, 1992.
- SEVOIAN, M.; LEVINE, P. P. Effects of infectious bronchitis on the reproductive tracts, egg production and egg quality of laying chickens. **Avian Dis.**, v.1, n. 1, p. 136-164, 1957.
- SIDDELL, S. G. Coronavirus JHM: Coding assignments of subgenomic mRNAs. **J. Gen. Virol.**, v. 64, n. 1, p. 113-125, 1983.
- SIDDELL, S. G. The coronaviridae: An introduction. In: SIDDELL, S. G. (Ed). **The coronaviridae**. New York: Plenum, 1995. p. 1-10.
- SIDDELL, S. G.; WEGE, H.; MEULEN, V. The structure and replication of coronaviruses. **Curr. Top. Microbiol. Immunol.**, v. 99, n. 1, p. 131-163, 1982.
- SIDDELL, S. G.; WEGE, H.; MEULEN, V. The biology of coronaviruses. **J. Gen. Virol.**, v. 64, n. 2, p. 761-776, 1983.
- SILLER, W. G. Renal pathology of the fowl: a review. **Avian Pathol.**, v. 10, n. 1, p. 187-262, 1981.
- SILVA, J. M. L. Bronquite infecciosa das galinhas: como e quando introduzir novas vacinas. In: CONFERÊNCIA APINCO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLAS, 1989, Campinas. **Anais...** Campinas: FACTA, 1989. p. 75-79.
- SILVEIRA, R. M. & MARQUES, E. K. Otimização da detecção do vírus da bronquite infecciosa por RT-PCR. In: CONFERÊNCIA APINCO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLAS, 1995, Campinas. **Anais...** Campinas: FACTA, 1995. p. 177. (1995a)
- SILVEIRA, R. M. & MARQUES, E. K. Caracterização de isolados brasileiros de vírus da bronquite infecciosa. In: CONFERÊNCIA APINCO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLAS, 1995, Campinas. **Anais...** Campinas: FACTA, 1995. p. 179. (1995b)
- SMITH, H. W.; COOK, J. K. A.; PARSELI, Z. E. The experimental infection of chickens with mixtures of infectious bronchitis virus and *Escherichia coli*. **J. Gen. Virol.**, v. 66, n. 2, p. 777-786, 1985.
- 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. 2, 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**. 1999, 75 f. Tese, (Mestrado). Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

- SOUZA, C. M. **Produção de Anticorpos monoclonais contra os componentes conservados do vírus da bronquite infecciosa das galinhas.** 2000, 40 f. Tese, (Mestrado). Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- STERN, D. F.; SEFTON, B. M. Coronavirus multiplication: locations of genes of virion proteins on the avian infectious bronchitis virus genome. **J. Virol.**, v. 50, n. 1, p. 22-29, 1984.
- STIRRUPS, K.; SHAW, K.; EVANS, S. et al. Rescue of IBV D-RNA by heterologous helper virus strains. **Adv. Exp. Med. Biol.**, v. 440, p. 259-264, 1998.
- STRAUSS, E. G. & STRAUSS, J. H. Replication strategies of the single stranded RNA viruses of eukaryotes. **Curr. Top. Microbiol. Immunol.**, v. 105, n. 1, p. 1-98, 1983.
- STUDIER, J. A.; KEPPLER, K. J. A note on the neighbor-joining algorithm of Saitou and Nei. **Mol. Biol. Evol.**, v.5, n. 3, p. 729-731, 1988.
- STURMAN, L. S.; HOLMES, K. V. The molecular biology of coronaviruses. **Adv. Virus Res.**, v. 28, n. 1, p. 35-112, 1983.
- SUTOU, S.; SATO, S.; OKABE, T. et al. Cloning and sequencing of genes encoding structural proteins of avian infectious bronchitis virus. **Virology**, v. 165, n. 2, p. 589-595, 1988.
- SWOFFORD, D. L.; OLSEN, J. L.; WADDELL, P. J. et al. Phylogenetic inference. In: HILLIS, D. M. et al. (Eds). **Molecular systematics.** Sunderland: Sinauer Associates, 1996. p. 407-514.
- TOMLEY, F. M.; MOCKETT, A. P. A.; BOURSNEILL, M. E. G. et al. Expression of the infectious bronchitis virus spike protein by recombinant vaccinia virus and induction of neutralizing antibodies in vaccinated mice. **J. Gen. Virol.**, v. 68, n. 11, p. 2291-2298, 1987.
- 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, L.; JUNKER, D.; COLLISON, E. W. Evidence of natural recombination within the S1 gene of the infectious bronchitis virus. **Virology**, v. 192, n. 3, p. 710-716, 1993.
- WANG, L.; JUNKER, D.; HOCK, D. et al. Evolutionary implications of genetic variations in the S1 gene of infectious bronchitis virus. **Virus Res.**, v.34, n. 2, p. 327-338, 1994.
- WENTZ, I. Paineis: Bronquite Infecciosa das Galinhas - Que cepa vacinal usar? In: CONFERÊNCIA APINCO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLAS, 1992, Santos. **Anais...** Santos: FACTA, 1992. p. 165-167.
- WILLIAMS, A.; WANG, L.; SNEED, L. W. et al. Comparative analysis of the nucleocapsid genes of several strains of infectious bronchitis virus and other coronaviruses. **Virus Res.**, v. 25, n. 2, p. 213-222, 1992.
- WINTERFIELD, R. W.; ALBASSAM, M. A. Nephropathogenicity of infectious bronchitis virus. **Poultry Sci.**, v. 63, n. 6, p. 2358-2363, 1984.
- WINTERFIELD, R. W.; HITCHNER, S. B. Etiology of an infectious nephritis-nephrosis syndrome of chickens. **Am. J. Vet. Res.**, v. 23, n. 5, 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.
- WINTERFIELD, R. W.; FADLY, A. M.; HANLEY, J. E. Characteristics of an isolate of infectious bronchitis virus from chickens in Florida. **Avian Dis.**, v. 15, n. 2, p. 305-311, 1971.

WU, Z. Q.; YANG, Q. W.; FU, C. et al. Antigenic and immunogenic characterization of infectious bronchitis strains isolated in China between 1986 and 1995. **Avian Pathol.**, v. 27, p. 578-585, 1998.

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, n. 3, p. 569-570, 1994.

VILLA, M. F. G. "Programa Nacional de Sanidade Avícola: de 1994 a 1998". In: CONFERÊNCIA APINCO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLAS – SÍMPOSIUM INTERNACIONAL SOBRE SANIDADE AVÍCOLA, 1998, Campinas. **Anais...** Campinas: FACTA, 1998. p. 33-45.

VILLEGAS, P. **Laboratory manual of avian virus diseases**. Georgia/USA: College of Veterinary Medicine, 1985. 56 p.

ZANELLA, A. Avian infectious bronchitis: properties and application of attenuated vaccine prepared with nephropathogenic strain AZ-23/74. In: FIRST INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON INFECTIOUS BRONCHITIS, 1988, Rauschholzhausen. **Proceedings...** Rauschholzhausen, Germany, 1988. p. 335-342.

ZANOTTO, P. M. A.; GOULD, E. A.; HOLMES, E. C. The limits of molecular phylogeny: the case of the genus *Flavivirus* and the family *Flaviviridae*. **Virus Reviews & Res.**, v. 01, p. 29-38, 1996.

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

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.

José Sérgio de Resende

**GENOTIPIFICAÇÃO DE ISOLADOS DE VÍRUS DA BRONquite
INFECCIOSA DAS GALINHAS EM SURTOS OCORRIDOS NA AVICULTURA
INDUSTRIAL DE MINAS GERAIS, BRASIL, DE 1972 A 1989.**

Tese apresentada à Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Ciência Animal.

Área: Medicina Veterinária Preventiva e Epidemiologia.

Orientador: Prof. Nelson Rodrigo da Silva Martins

Belo Horizonte
UFMG - Escola de Veterinária
2003

R433g Resende, José Sérgio de, 1953-
Genotipificação de isolados de vírus da bronquite infecciosa das galinhas em surtos ocorridos na avicultura industrial de minas gerais, brasil, de 1972 a 1989 / José Sérgio de Resende. –2003.
111 p.: il.

Orientador: Nelson Rodrigo da Silva Martins
Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária
Bibliografia: p.

1. Galinha – Doenças – Teses. 2. Bronquite infecciosa em aves domésticas – Teses. 3. Filogenia – Teses. I. Martins, Nelson Rodrigo da Silva. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária. III. Título.

CDD – 636.508 962 3

AGRADECIMENTOS PESSOAIS

Ao professor Maurício Resende, pela orientação no curso de doutorado em ciência animal no período de 1991 a 1993 (quando, por exigência da UFMG, foi substituído devido ao fato de ser irmão do orientado) e, também, pela idéia original do projeto e posterior trabalho que foi executado.

Ao professor Nelson Rodrigo da Silva Martins, que gentilmente e sem nenhuma exigência, substituiu na orientação de curso o professor Maurício Resende, tendo participado (1994-1996), de forma excepcional e irretocável, em todas as fases e momentos em que foi solicitado, inclusive durante o novo e segundo curso de doutorado em ciência animal (2001-2003).

Aos pesquisadores Áurea Valadares Folgueras-Flatschart e Roberto Becht Flatschart pela brilhante orientação incondicional (nos dois cursos de doutorado) e espontânea durante todas as etapas experimentais, além da colaboração direta nos experimentos, na análise dos resultados e elaboração final, sempre com sugestões vitais, deste trabalho.

Aos técnicos de laboratório Ismael Faustino de Souza e Cláudio Rocha Públio, pelo apoio incondicional e fiel durante as fases experimentais.

À professora Vera Lúcia Viegas de Abreu, pela participação nas bancas de qualificação (duas) e de defesa e, também, pelo apoio e incentivo durante toda a dupla jornada de doutorado.

À professora Clarice Weis Arns, por ter deixado seus afazeres (científicos, pedagógicos e pessoais) em Campinas-SP e aceitado participar da banca de defesa de tese.

À minha mãe Gessy Pereira de Resende e aos meus irmãos Luciano Resende e Cláudio Resende, pelo apoio emocional e financeiro durante esse longo período do curso.

Às professoras Josiane Tavares de Abreu e Salette Lobão Torres Santiago, pelo apoio direto na última fase experimental.

Aos colegas professores e funcionários do departamento, pelo incentivo e apoio durante o curso.

À Nádia por realizar os últimos retoques na confecção final deste trabalho.

Finalmente, agradeço àqueles que estiveram comigo o tempo todo, tolerando os meus bons e maus momentos, em especial à minha esposa Waldira Fernanda Carvalho de Resende, ao meu filho Henrique Carvalho de Resende (salvou-me inúmeras vezes nas questões relacionadas a computador) e à minha filha Sylvia Carvalho de Resende pelo agradável convívio.

AGRADECIMENTOS INSTITUCIONAIS

À FAPEMIG (Processo CAG n° CAG 1153/95) pelo financiamento deste trabalho e sem o qual seria impossível sua realização.

Ao CNPq por conceder uma bolsa de pesquisador (Processo n° 300 196/87-3), direta e pessoal, no período de tanto a tanto e que foi muito importante nas etapas iniciais de implementação dos experimentos.

À FEPMVZ – Coordenação Preventiva, que nos socorreu nas eventualidades emergenciais descortinadas durante as diversas fases deste trabalho (experimental e final).

Ao Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e, por extensão, à Escola de Veterinária da UFMG, por permitirem a execução deste trabalho em suas dependências.

SUMÁRIO

RESUMO	
ABSTRACT	
1. INTRODUÇÃO	
2. REVISÃO DE LITERATURA	
2.1. O VÍRUS.....	
2.1.1. CLASSIFICAÇÃO / TAXONOMIA.....	
2.1.2. MORFOLOGIA.....	
2.1.3. COMPOSIÇÃO QUÍMICA.....	
2.1.3.1. ESTRUTURA VIRAL.....	
A - <i>PROTEÍNAS ESTRUTURAIS (ENVELOPE /</i>	
<i>MEMBRANA & NUCLEOCAPSÍDEO</i>	
B - <i>PROTEÍNAS NÃO ESTRUTURAIS (ns)</i>	
2.1.3.2. GENOMA.....	
2.1.4. REPLICAÇÃO VIRAL.....	
2.1.4.1. ADSORÇÃO E PENETRAÇÃO.....	
2.1.4.2. TRADUÇÃO PRIMÁRIA.....	
2.1.4.3. TRANSCRIÇÃO DA FITA NEGATIVA DE RNA.....	
2.1.4.4. TRANSCRIÇÃO DA FITA POSITIVA DE RNA.....	
2.1.4.5. SÍNTESE DE PROTEÍNAS ESTRUTURAIS E NÃO	
ESTRUTURAIS.....	
2.1.4.6. MONTAGEM DA PARTÍCULA VIRAL.....	
2.2. GENÉTICA DO VBIG.....	
2.2.1. VARIANTES.....	
2.2.1.1. MUTAÇÃO DO RNA.....	
2.2.1.2. RECOMBINAÇÃO DO RNA.....	
2.2.2. RNAs INTERFERENTES DEFECTIVOS (DI - RNAs) E RNAmg.....	
2.3. A DOENÇA.....	
2.4. DIAGNÓSTICO.....	
2.4.1. SOROLOGIA.....	
2.4.2. ISOLAMENTO, IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO VBIG ...	
2.4.2.1. ISOLAMENTO.....	
2.4.2.2. IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO.....	
A - <i>MÉTODOS QUE UTILIZAM ANTICORPOS</i>	
B - <i>MÉTODOS QUE UTILIZAM ÁCIDO NUCLÉICO</i>	
2.5. ESTUDOS DE RELACIONAMENTOS GENÉTICOS ENTRE VBIGs.....	
2.6. CONTROLE.....	
3. MATERIAL E MÉTODOS	
3.1. VBIGs (ESTIRPES DE REFERÊNCIA E ISOLADOS BRASILEIROS).....	
3.2. ISOLAMENTO DOS VBIGs BRASILEIROS.....	
3.3. REPLICAÇÃO VIRAL.....	
3.4. CONCENTRAÇÃO DA MISTURA DE LÍQUIDOS ALANTÓIDEOS (LAs).....	
3.5. CONTROLES NEGATIVOS (ESPECIFICIDADE E SISTEMA DE	
PRODUÇÃO).....	
3.6. PROCEDIMENTOS DE BIOSSEGURANÇA LABORATORIAL.....	
3.6.1. CONSUMO.....	
3.6.2. VIDRARIA.....	
3.6.3. BIOSSEGURANÇA LABORATORIAL.....	
3.7. EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DO RNA TOTAL (INCLUINDO O VIRAL)	
3.8. SÍNTESE DO cDNA (DNA COMPLEMENTAR) / TRANSCRIÇÃO	
REVERSA E REAÇÃO EM CADEIA PELA POLIMERASE (RT - PCR).....	

3.8.1.	OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES (OLIGOS)
3.8.2.	SÍNTESE DE cDNA (DNA COMPLEMENTAR) - TRANSCRIÇÃO REVERSA (RT).....
3.8.3.	AMPLIFICAÇÃO DO cDNA OU REAÇÃO EM CADEIA PELA POLIMERASE (PCR)
3.9.	ANÁLISE DOS PRODUTOS DA RT - PCR E POR RESTRIÇÃO ENZIMÁTICA (RFLP).....
3.9.1.	ELETROFORESE
3.9.2.	RESTRIÇÃO ENZIMÁTICA E ANÁLISE POR RFLP
3.10.	RFLP COMPARADA COM DADOS OBTIDOS NA ANÁLISE DAS SEQUÊNCIAS DO GENE S2 DISPONÍVEIS NO GENBANK E DOS RESULTADOS DE Lin <i>et al.</i> (1991a)
3.11.	CONSTRUÇÃO DAS ÁRVORES FILOGENÉTICAS.....
3.12.	GENOTIPIFICAÇÃO.....
3.13.	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO
4.1.	VBIGs DE REFERÊNCIA (IMPORTADOS) E OS ISOLADOS BRASILEIROS)
4.2.	REPLICAÇÃO E CONCENTRAÇÃO VIRAL.....
4.3.	EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DO RNA TOTAL (INCLUINDO O VIRAL)....
4.4.	SÍNTESE DE cDNA (DNA COMPLEMENTAR) / TRANSCRIÇÃO REVERSA E REAÇÃO EM CADEIA PELA POLIMERASE (RT-PCR).....
4.4.1.	OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES (OLIGOS)
4.4.2.	SÍNTESE DE cDNA (DNA COMPLEMENTAR) - TRANSCRIÇÃO REVERSA (RT).....
4.4.3.	AMPLIFICAÇÃO DO cDNA OU REAÇÃO EM CADEIA PELA POLIMERASE (PCR)
4.5.	RESTRIÇÃO ENZIMÁTICA E ANÁLISE POR RFLP
4.6.	RFLP COMPARADA COM DADOS OBTIDOS NA ANÁLISE DAS SEQUÊNCIAS DO GENE S2 DISPONÍVEIS NO GENBANK E DOS RESULTADOS DE Lin <i>et al.</i> (1991a).....
4.7.	ÁRVORES FILOGENÉTICAS
4.8.	GENOTIPIFICAÇÃO
4.9.	CONSIDERAÇÕES FINAIS
5.	CONCLUSÕES
6.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Principais eventos relacionados com a BIG e o VBIG no mundo.....
Tabela 2 -	VBIGs (estirpes) de referência usados como controles positivos.....
Tabela 3 -	Isolados do VBIG a partir de surtos clínicos da BIG na avicultura industrial do estado de Minas Gerais (Regiões Alto São Francisco e Metalúrgica) no período entre 1972 e 1989
Tabela 4 -	Informações complementares adicionais dos VBIGs de outros países utilizados na RFLP comparada e na construção de árvores filogenéticas.....
Tabela 5 -	Esquema visual dos padrões de cortes obtidos nas RFLPs deste trabalho (análise inicial) X Padrões de restrições enzimáticas (RFLP comparada - análise final) a partir do segmento amplificado por RT-PCR de 23 VBIGs (oito VBIGs de referência e 15 isolados brasileiros)

- Tabela 6 - Padrões de corte encontrados na RFLP (análise inicial) do segmento amplificado de S2 obtido por RT-PCR de 23 VBIGs (oito de referência e 15 isolados brasileiros)
- Tabela 7 - Determinação dos padrões de restrição enzimática (PRE) com base nas informações obtidas nas seqüências flanqueadas pelos oligos BIGS21 e BIGS22 (gene codificador da glicoproteína S2) dos VBIGs disponíveis no GenBank (submetidos à análise por RFLP no WebGene), no mapa contendo os sítios de restrição enzimática de Lin *et al.* (1991a) e nos resultados deste trabalho
- Tabela 8 - RFLP de parte do gene S2 (região flanqueada pelos oligos BIGS21 e BIGS22) de 20 VBIGs depositados no GenBank e submetidos à análise por RFLP simulada no programa WebGene.....
- Tabela 9 - RFLP de parte do gene S2* obtida por RT-PCR de 12 VBIGs no trabalho de Lin *et al.* (1991a)
- Tabela 10 - RFLP (análise final, após RFLP comparada) de parte do gene S2 obtida por RT-PCR de 23 VBIGs (15 isolados brasileiros) neste trabalho

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Microscopia eletrônica do VBIG
- Figura 2 - Morfologia esquemática do coronavírus VBIG
- Figura 3 - Glicoproteína peplomérica S (S1 + S2) do VBIG.....
- Figura 4 - Genoma do VBIG e representação do esquema e replicação viral.....
- Figura 5 - Eletroforese dos produtos da RT-PCR. Visualização, sob luz UV, dos géis de agarose 3,5% corados com EtBr após eletroforese dos produtos amplificados (parte do gene S2) obtidos de 23 VBIGs (PPM 100: padrão molecular de fragmentos de DNA fita dupla de diferentes tamanhos - 100 *bp* DNA *Ladder*; pb: pares de bases). Gel A - Oito VBIGs de referência e dois controles (negativos) de especificidade (VDN - LaSota) e de sistema (*pool* de LAs de OEG/SPF). Gel B - Quinze isolados brasileiros
- Figura 6 - Visualização dos produtos da restrição enzimática com *Bst*YI. RFLPs dos produtos amplificados (parte do gene S2) por RT-PCR de 23 VBIGs [oito de referência (M-41 → Iowa-97) e quinze isolados brasileiros (208 → 200)] sobre luz UV após eletroforese em gel de agarose 3,5% corado com EtBr (PPM 100: 100 *bp* DNA *Ladder*; pb: pares de bases)
- Figura 7 - Visualização dos produtos restrição enzimática com *Dde*I. RFLPs dos produtos amplificados (parte do gene S2) por RT-PCR de 23 VBIGs sobre luz UV após eletroforese em géis de agarose 3,5% corados com EtBr (PPM 100: 100 *bp* DNA *Ladder*; pb: pares de bases). Gel A - Oito VBIGs de referência. Gel B - Quinze isolados brasileiros

- Figura 8 - Visualização dos produtos restrição enzimática com *HaeIII*. RFLPs dos produtos amplificados (parte do gene S2) por RT-PCR de 23 VBIGs sobre luz UV após eletroforese em géis de agarose 3,5% corados com EtBr (PPM 100: 100 *bp* DNA *Ladder*; pb: pares de bases). Gel A - Oito VBIGs de referência. Gel B - Quinze isolados brasileiros.....
- Figura 9 - Visualização dos produtos restrição enzimática com *HinII*. RFLPs dos produtos amplificados (parte do gene S2) por RT-PCR de 23 VBIGs sobre luz UV após eletroforese em géis de agarose 3,5% corados com EtBr (PPM 100: 100 *bp* DNA *Ladder*; pb: pares de bases). Gel A - Oito VBIGs de referência. Gel B - Quinze isolados brasileiros.....
- Figura 10 - Visualização dos produtos restrição enzimática com *HinfI*. RFLPs dos produtos amplificados (parte do gene S2) por RT-PCR de 23 VBIGs sobre luz UV após eletroforese em géis de agarose 3,5% corados com EtBr (PPM 100: 100 *bp* DNA *Ladder*; pb: pares de bases). Gel A - Oito VBIGs de referência. Gel B - Quinze isolados brasileiros.....
- Figura 11 - Visualização dos produtos restrição enzimática com *HpaI*. RFLPs dos produtos amplificados (parte do gene S2) por RT-PCR de 23 VBIGs sobre luz UV após eletroforese em géis de agarose 3,5% corados com EtBr (PPM 100: 100 *bp* DNA *Ladder*; pb: pares de bases). Gel A - Oito VBIGs de referência. Gel B - Quinze isolados brasileiros.....
- Figura 12 - Visualização dos produtos restrição enzimática com *MaeIII*. RFLPs dos produtos amplificados (parte do gene S2) por RT-PCR de 23 VBIGs sobre luz UV após eletroforese em géis de agarose 3,5% corados com EtBr (PPM 100: 100 *bp* DNA *Ladder*; pb: pares de bases). Gel A - Oito VBIGs de referência. Gel B - Quinze isolados brasileiros.....
- Figura 13 - Visualização dos produtos restrição enzimática com *PstI*. RFLPs dos produtos amplificados (parte do gene S2) por RT-PCR de 23 VBIGs sobre luz UV após eletroforese em géis de agarose 3,5% corados com EtBr (PPM 100: 100 *bp* DNA *Ladder*; pb: pares de bases). Gel A - Oito VBIGs de referência. Gel B - Quinze isolados brasileiros.....
- Figura 14 - Visualização dos produtos restrição enzimática com *ScaI*. RFLPs dos produtos amplificados (parte do gene S2) por RT-PCR de 23 VBIGs sobre luz UV após eletroforese em géis de agarose 3,5% corados com EtBr (PPM 100: 100 *bp* DNA *Ladder*; pb: pares de bases). Gel A - Oito VBIGs de referência. Gel B - Quinze isolados brasileiros.....
- Figura 15 - Árvore filogenética de VBIGs usando o VBIG M-41 como raiz (parental) e o programa TREECON. As porcentagens (indicam alta repetibilidade no *bootstrap* e refletem os distanciamentos genéticos) foram calculadas a partir dos resultados da análise por RFLP com nove enzimas de restrição (*BstYI*, *DdeI*, *HaeIII*, *HinII*, *HinfI*, *HpaI*, *MaeIII*, *PstI* e *ScaI*) de parte do gene S2 de 46 VBIGs procedentes de três fontes de informações (GenBank + WebGene, Lin *et al.*, 1991a e deste trabalho).....

- Figura 16 - Árvore filogenética de VBIGs usando o VBIG H-52 como raiz (parental) e o programa TREECON. As porcentagens (indicam alta repetibilidade no *bootstrap* e refletem os distanciamentos genéticos) foram calculadas a partir dos resultados da análise por RFLP com nove enzimas de restrição (*Bst*YI, *Ddel*, *Hae*III, *Hin*clI, *Hin*fI, *Hpa*II, *Ma*eIII, *Pst*I e *Sc*aI) de parte do gene S2 de 46 VBIGs procedentes de três fontes de informações (GenBank + WebGene, Lin *et al.*, 1991a e deste trabalho).....
- Figura 17 - Árvore filogenética de VBIGs usando o VBIG M-41 como raiz (parental) e o programa TREECON. As porcentagens (indicam alta repetibilidade no *bootstrap* e refletem os distanciamentos genéticos) foram calculadas a partir dos resultados da análise por RFLP com cinco enzimas de restrição (*Bst*YI, *Ddel*, *Hpa*II, *Pst*I e *Sc*aI) de parte do gene S2 de 46 VBIGs procedentes de três fontes de informações (GenBank + WebGene, Lin *et al.*, 1991a e deste trabalho).....
- Figura 18 - Árvore filogenética de VBIGs usando o VBIG H-52 como raiz (parental) e o programa TREECON. As porcentagens (indicam alta repetibilidade no *bootstrap* e refletem os distanciamentos genéticos) foram calculadas a partir dos resultados da análise por RFLP com cinco enzimas de restrição (*Bst*YI, *Ddel*, *Hpa*II, *Pst*I e *Sc*aI) de parte do gene S2 de 46 VBIGs procedentes de três fontes de informações (GenBank + WebGene, Lin *et al.*, 1991a e deste trabalho).....
- Figura 19 - Árvore filogenética de VBIGs usando o VBIG M-41 como raiz (parental) e o programa TREECON. As porcentagens (indicam alta repetibilidade no *bootstrap* e refletem os distanciamentos genéticos) foram calculadas a partir dos resultados da análise por RFLP com cinco enzimas de restrição (*Ddel*, *Hpa*II, *Ma*eIII, *Pst*I e *Sc*aI - sem a *Bst*YI) de parte do gene S2 de 46 VBIGs procedentes de três fontes de informações (GenBank + WebGene, Lin *et al.*, 1991a e deste trabalho)
- Figura 20 - Árvore filogenética de VBIGs usando o VBIG H-52 como raiz (parental) e o programa TREECON. As porcentagens (indicam alta repetibilidade no *bootstrap* e refletem os distanciamentos genéticos) foram calculadas a partir dos resultados da análise por RFLP com cinco enzimas de restrição (*Ddel*, *Hpa*II, *Ma*eIII, *Pst*I e *Sc*aI - sem a *Bst*YI) de parte do gene S2 de 46 VBIGs procedentes de três fontes de informações (GenBank + WebGene, Lin *et al.*, 1991a e deste trabalho)
- Figura 21 - Árvore filogenética de VBIGs usando o VBIG M-41 como raiz (parental) e o programa TREECON. As porcentagens (indicam alta repetibilidade no *bootstrap* e refletem os distanciamentos genéticos) foram calculadas a partir dos resultados da análise por RFLP com quatro enzimas de restrição (*Ddel*, *Hpa*II, *Pst*I e *Sc*aI – sem a *Bst*YI) de parte do gene S2 de 46 VBIGs procedentes de três fontes de informações (GenBank + WebGene, Lin *et al.*, 1991a e deste trabalho).....

- Figura 22 - Árvore filogenética de VBIGs usando o VBIG H-52 como raiz (parental) e o programa TREECON. As porcentagens (indicam alta repetibilidade no *bootstrap* e refletem os distanciamentos genéticos) foram calculadas a partir dos resultados da análise por RFLP com quatro enzimas de restrição (*Ddel*, *HpaII*, *PstI* e *Scal* - sem a *BstYI*) de parte do gene S2 de 46 VBIGs procedentes de três fontes de informações (GenBank + WebGene, Lin *et al.*, 1991a e deste trabalho).....
- Figura 23 - Árvore filogenética de quinze isolados brasileiros do VBIG. A árvore é sem raiz, isto é, a posição do(s) hipotético(s) VBIG(s) ancestral(is) é desconhecida. Usando o programa TREECON, os comprimentos dos “galhos” da árvore foram calculados a partir dos resultados da análise por RFLP com nove enzimas de restrição (*BstYI*, *Ddel*, *HaeIII*, *HinCI*, *HinfI*, *HpaII*, *MaellI*, *PstI* e *Scal*) de parte do gene S2
- Figura 24 - Árvore filogenética no formato circular de quinze isolados brasileiros do VBIG. A árvore é sem raiz, isto é, a posição do(s) hipotético(s) VBIG(s) ancestral(is) é desconhecida. Usando o programa TREECON, os comprimentos dos “galhos” da árvore foram calculados a partir dos resultados da análise por RFLP com nove enzimas de restrição (*BstYI*, *Ddel*, *HaeIII*, *HinCI*, *HinfI*, *HpaII*, *MaellI*, *PstI* e *Scal*) de parte do gene S2....
- Figura 25 - Árvore filogenética de quinze isolados brasileiros do VBIG. A árvore é sem raiz, isto é, a posição do(s) hipotético(s) VBIG(s) ancestral(is) é desconhecida. Usando o programa TREECON, os comprimentos dos “galhos” da árvore foram calculados a partir dos resultados da análise por RFLP com cinco enzimas de restrição (*BstYI*, *Ddel*, *HpaII*, *PstI* e *Scal*) de parte do gene S2
- Figura 26 - Árvore filogenética no formato circular de quinze isolados brasileiros do VBIG. A árvore é sem raiz, isto é, a posição do(s) hipotético(s) VBIG(s) ancestral(is) é desconhecida. Usando o programa TREECON, os comprimentos dos “galhos” da árvore foram calculados a partir dos resultados da análise por RFLP com cinco enzimas de restrição (*BstYI*, *Ddel*, *HpaII*, *PstI* e *Scal*) de parte do gene S2.....
- Figura 27 - Genotipificação. Árvore filogenética de VBIGs sem raiz construída com o programa TREECON a partir dos resultados da análise por RFLP com nove enzimas de restrição (*BstYI*, *Ddel*, *HaeIII*, *HinCI*, *HinfI*, *HpaII*, *MaellI*, *PstI* e *Scal*) de parte do gene S2 de 46 VBIGs procedentes de três fontes de informações (GenBank + WebGene; Lin *et al.*, 1991a e deste trabalho)...
- Figura 28 - Genotipificação. Árvore filogenética de VBIGs sem raiz construída com o programa TREECON a partir dos resultados da análise por RFLP com cinco enzimas de restrição (*BstYI*, *Ddel*, *HpaII*, *PstI* e *Scal*) de parte do gene S2 de 46 VBIGs procedentes de três fontes de informações (GenBank + WebGene; Lin *et al.*, 1991a e deste trabalho).....

RESUMO

Um segmento de DNA (400 pb) situado na extremidade codificante da região N-terminal do gene S2 de quinze isolados brasileiros e oito estirpes do vírus da bronquite infecciosa das galinhas (VBIG) foi amplificado pela técnica de RT-PCR (transcrição reversa - reação em cadeia pela polimerase) e analisado por RFLP (polimorfismo nos comprimentos dos fragmentos de DNA obtidos na restrição enzimática). Os isolados foram obtidos de plantéis comerciais (14 isolados de frangos de corte e um de poedeira comercial) com surtos da bronquite infecciosa das galinhas na avicultura industrial do estado de Minas Gerais, de 1972 a 1989. Padrões de restrição enzimática foram obtidos na análise por RFLP com nove enzimas de restrição (*Bst*YI, *Dde*I, *Hae*III, *Hin*clI, *Hin*fI, *Hpa*II, *Mae*III, *Pst*I e *Sca*I) e comparados com resultados obtidos de 20 VBIGs cujos genes S2 estão disponíveis no GenBank e submetidos à simulação de RFLP pelo WebGene, assim como em um trabalho japonês com 12 VBIGs (seis isolados japoneses) publicado em 1991. Dos 55 VBIGs examinados nas três fontes de informação, descontados os idênticos, foram utilizados 46 diferentes para o estudo de genotipificação. Árvores filogenéticas, com ou sem raiz, foram construídas com o programa TREECON utilizando os resultados da análise por RFLP obtidos para os 46 VBIGs. Quinze isolados brasileiros foram classificados em três genótipos distintos dentro do universo amostral estudado (46 VBIGs). Um dos genótipos, denominado "Massachusetts" por abrigar VBIGs de referência sabidamente pertencentes a este genótipo, agrupou nove isolados brasileiros. Os outros dois genótipos distintos agruparam seis isolados brasileiros considerados "variantes" por este estudo: "283, 290, 297" e "351, G e TII". A maior ocorrência de isolados brasileiros (nove) agrupados no genótipo "Massachusetts" foi atribuída ao uso exclusivo de vacinas vivas atenuadas deste genótipo na avicultura industrial brasileira.

Palavras-chave: vírus da bronquite infecciosa das galinhas; galinha; glicoproteína S2; gene S2; filogenia; genotipificação; RT-PCR; RFLP.

ABSTRACT

One segment of DNA (400 bp) situated at the coding end of the n-terminal region of the gene S2 of fifteen brazilian isolates and eight reference strains of infectious bronchitis virus (IBV) was amplified by RT-PCR (reverse transcriptase - polymerase chain reaction) and analysed by RFLP (restriction fragment length polymorphism). The isolates were obtained from industrial flocks (14 isolated from broilers and one from layers) of the poultry industry (Minas Gerais state) undergoing respiratory disease, nephritis and / or reduced / defective laying, during the period from 1972 to 1989. The profiles of restriction by RFLP analysis of amplicons (400 bp) obtained with nine (*Bst*YI, *Dde*I, *Hae*III, *Hin*clI, *Hin*fI, *Hpa*II, *Mae*III, *Pst*I e *Sca*I) or five (*Bst*YI, *Dde*I, *Hpa*II, *Pst*I e *Sca*I) restriction enzymes, were compared to results obtained for S2 gene sequences (20 IBV) in the GenBank and submitted to RFLP in the WebGene, in addition to 12 IBV (six japanese isolates) in a similar study in Japan. Out of the 55 IBV examined, using the the three sources of information , e. g., RFLP of local, reference and GenBank IBV, the homologous IBV were excluded and 46 were employed for genotyping. Phylogenetic trees with or without root were built using TREECON software and the fifteen brazilian isolates were grouped each into one of three genotypes. The "Massachusetts" genotype included the reference strains of that serotype and most (nine) of brazilian isolates. The other two genotypes included six isolates considered "variants" by this study: "283, 290, 297" e "351, G e TII". A greatest occurrence for genotype "Massachusetts" might be attributed to the use of this serotype for live vaccines in brazilian poultry industry.

Keywords: chicken; infectious bronchitis virus; RT-PCR; RFLP; S2 gene; genotype; phylogeny; genotyping.

1. INTRODUÇÃO

A avicultura industrial mundial emprega um complexo pacote tecnológico (genética e manejo geral) que permite a transformação de alimentos de baixo valor nutricional (milho ou soja) em produtos nobres (carne e ovo), com qualidade sanitária razoavelmente controlada, o que a coloca em posição destacada na pecuária em termos de eficiência. Esta produtividade privilegiada tem sido desafiada por fatores debilitantes à saúde dos plantéis, entre os quais os agentes infecto-contagiosos, destacando-se o vírus da bronquite infecciosa das galinhas (VBIG) que é o causador da bronquite infecciosa das galinhas (BIG). Como o VBIG tem em seus antígenos regiões hipervariáveis, freqüentemente dribla a imunidade estabelecida com o manejo sanitário baseado em vacinações sistemáticas (vacinas vivas e inativadas). Conseqüentemente, leva a grandes perdas econômicas decorrentes da diminuição da eficiência alimentar na produção de ovos e no ganho de peso, condenação em abatedouros e mortalidade por complicações respiratórias e renais.

A detecção (identificação) laboratorial do VBIG tem de ser rápida e, se possível, acompanhada da tipificação (caracterização) do(s) isolado(s) envolvido(s) no(s) surto(s) da BIG, requerendo metodologia de diagnóstico muito precisa, condição que os métodos virológicos e sorológicos convencionais infelizmente não conseguem atender.

A técnica da “reação em cadeia pela polimerase”, cuja abreviação é mundialmente conhecida por PCR (sigla, em inglês, de *Polymerase Chain Reaction*), vem sendo adotada na pesquisa de microrganismos em todo o mundo, devido à alta especificidade, sensibilidade, reprodutibilidade, eficiência e rapidez de seus resultados que podem ser obtidos em até 24 horas. Desde a última década, foram realizadas muitas pesquisas visando o desenvolvimento de técnicas de PCR rápidas e sensíveis para detecção do VBIG,

tanto visando a identificação do agente etiológico, como a genotipificação de isolados obtidos em sistemas ideais (ovos embrionados de galinha ou cultivo de anéis de traquéia de embriões de galinha) ou, diretamente, a partir de tecidos obtidos em aves durante os surtos clínicos da BIG (traquéia, pulmões, sacos aéreos, rins, oviduto, tonsilas cecais, etc.).

O VBIG possui genoma RNA (sigla, em inglês, de ARN: ácido ribonucléico) e, portanto, na fase inicial da técnica de PCR, sua extração e purificação sem degradá-lo, é imprescindível. Os vários protocolos descritos incluem procedimentos bastante trabalhosos para extração do RNA viral, o que pode inviabilizar sua adoção na rotina laboratorial. Antes de se realizar a PCR, é necessária a transcrição do RNA para DNA (sigla, em inglês, de ADN: ácido desoxirribonucléico) utilizando a enzima transcriptase reversa de retrovírus para este fim, cuja sigla que dá nome a esta fase prévia é RT, devido ao nome da enzima em inglês (*R*everse *T*ranscriptase). Daí, quando se trata de vírus RNA, a técnica é chamada de RT-PCR. No caso deste trabalho, após a realização da RT-PCR, foi feita a digestão do segmento de DNA amplificado com enzimas de restrição (tecnicamente chamada de restrição enzimática) de cada um dos VBIG estudados para análise do polimorfismo nos comprimentos dos fragmentos de DNA obtidos na restrição enzimática, cuja sigla em inglês é RFLP (*R*estriction *F*ragment *L*ength *P*oly*m*orphism). A técnica passou, então, a se chamar RT-PCR com análise por RFLP (RT-PCR / RFLP).

Este trabalho objetivou utilizar uma metodologia de diagnóstico molecular para confirmar a identidade de isolados brasileiros do VBIG com uma RT-PCR / RFLP anteriormente publicada (Lin *et al.*, 1991a) de uma parte pertencente à região N-terminal do gene codificador da glicoproteína S2 (gpS2) deste vírus, cujas extremidades flanqueadoras (5' e 3') são razoavelmente bem conservadas e que, posteriormente, foi considerada de uso universal (Adzhar *et al.*, 1996). Permitted,

ainda, um estudo filogenético comparativo mais profundo e detalhado com outros VBIGs disponíveis (GenBank + WebGene e Lin *et al.*, 1991a), ancorado na restrição enzimática da parte amplificada do gene alvo, além de uma genotipificação ampla, envolvendo oito VBIGs de referência importados e quinze isolados de surtos da BIG em lotes não vacinados contra VBIG da avicultura industrial do estado de Minas Gerais (Regiões Alto São Francisco e Metalúrgica) de 1972 a 1989.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. O VÍRUS

2.1.1. CLASSIFICAÇÃO / TAXONOMIA

O VBIG é o membro protótipo da Família *Coronaviridae* e está classificado no Gênero *Coronavirus*. Dentro do gênero, pertence ao grupo antigênico III, conforme classificação refinada utilizando uma combinação de análise com anticorpos monoclonais e seqüenciamento de nucleotídeos do genoma, formalizada em 1993 pelo ICTV (International Committee for the Taxonomy of Viruses) (Cavanagh *et al.*, 1994; Cavanagh *et al.*, 1995). No que diz respeito às seqüências de aminoácidos das proteínas e à antigenicidade, o VBIG é completamente distinto de outros coronavírus que infectam aves (perus) e mamíferos (Cavanagh & Naqi, 1997).

2.1.2. MORFOLOGIA

O VBIG é pleomórfico mas geralmente arredondado (Figura 1). Possui um envelope com aproximadamente 120 nm de diâmetro contendo projeções superficiais (espículas) com formato que lembra um sorvete comum em casquinha ou pétala de flor, possuindo cerca de 20 nm de comprimento (Cavanagh & Naqi, 1997; Collisson *et al.*, 1992). O nome corona (coroa) advém do aspecto observado à microscopia eletrônica do vírion completo (Figura 1). É um dos maiores vírus RNA positivos conhecidos (Schochetman *et al.*, 1977).

2.1.3. COMPOSIÇÃO QUÍMICA

Existem duas grandes revisões sobre a composição química dos coronavírus (Cavanagh *et al.*, 1994; Siddell, 1995).

2.1.3.1. ESTRUTURA VIRAL

A - PROTEÍNAS ESTRUTURAIS (ENVELOPE / MEMBRANA & NUCLEOCAPSÍDEO)

O vírion do VBIG possui três grandes proteínas estruturais vírus-específicas: as glicoproteínas da espícula (S) e da membrana (M), e, a proteína fosforilada do nucleocapsídeo interno, também chamada de nucleoproteína (N). O nucleocapsídeo é constituído por várias moléculas básicas de proteína N que envolvem o genoma (RNA) viral e é longo, flexível e com simetria helicoidal (Macnaughton *et al.*, 1978; Schochetman *et al.*, 1977) (Figura 2). Mutações na N podem afetar a estabilidade e a viabilidade viral. O papel da fosforilação da N ainda não foi determinado. O VBIG não possui a glicoproteína HE (hemaglutinina-esterase) presente em alguns outros coronavírus (Lai & Cavanagh, 1997). O envelope é constituído por uma camada dupla lipoprotéica derivada do retículo endoplasmático rugoso (RER) ou do complexo de Golgi das células infectadas que replicaram o VBIG, e nele estão instaladas as glicoproteínas virais (S e M). Uma quarta e pequena glicoproteína de membrana (sM) é encontrada associada ao envelope e parece ser muito importante na montagem da partícula viral (Lai & Cavanagh, 1997). As proteínas M e sM estão mais profundamente inseridas no envelope e a M interage com o nucleocapsídeo interno da partícula viral. A M possui cerca de 225 aminoácidos (\cong 23 a 36 kDa) e somente 10% estão exteriorizados fora do envelope. A glicoproteína peplomérica S, contendo 1.160 aminoácidos (\cong 174 kDa), possui duas ou três cópias de cada um dos glicopolipeptídeos em que ela pode ser clivada: S1 e S2 [apesar da discrepância numérica entre as publicações consultadas (devido à maior glicosilação da S1), contêm cerca de 535 (\cong 90 kDa) e 625 (\cong 84 kDa) aminoácidos, respectivamente] (Figura 3)

(Binns *et al.*, 1986; Collisson *et al.*, 1992; Sutou *et al.*, 1988). A clivagem ocorre em uma região rica em aminoácidos arginina (Cavanagh *et al.*, 1986). A estrutura espacial (tridimensional) do glicopolipeptídeo ou proteína S2 tem o formato de clava e penetra no envoltório lipídico da membrana, atravessando-a (Figura 3). Mais externamente e aderida à S2, está o glicopolipeptídeo ou proteína S1 em forma globular (Cavanagh, 1983; Collisson *et al.*, 1992; Holmes, 1990). O tratamento do VBIg com uréia remove apenas a proteína S1 devido ao fato de não estar ligada covalentemente à S2 (Cavanagh *et al.*, 1986; Koch *et al.*, 1990). Existe uma revisão extensa sobre a estrutura e as propriedades biológicas da espícula S (Cavanagh, 1995). Embora existam regiões imunodominantes nas três principais proteínas do VBIg, anticorpos envolvidos nos testes de neutralização viral e inibição da hemaglutinação são induzidos pela S1 (Cavanagh *et al.*, 1988; Kant *et al.*, 1992; Karaca *et al.*, 1992; Koch *et al.*, 1990; Parr & Collisson, 1993). Conseqüentemente, a S1 é responsável pela infectividade viral e expressa a hipervariabilidade intensa refletida na geração cada vez maior de sorotipos e variantes deste vírus, em contraste com a S2, que apresenta uma menor variação (três a sete vezes menos). Entretanto, a S2 possui uma importante função na manutenção da estrutura espacial da S1 (Avellaneda, 1992; Cavanagh *et al.*, 1992b; Jia *et al.*, 1995; Kusters *et al.*, 1990; McMartin, 1993) e qualquer variabilidade na S2 pode afetar a configuração estrutural da

S1, o que dificulta o reconhecimento da mesma por anticorpos específicos (Callison *et al.*, 1999). Apesar das variações nos epítomos imunogênicos da S1, existem epítomos comuns que são responsáveis pela também variável imunidade cruzada entre os diferentes isolados e sorotipos (Cavanagh *et al.*, 1997). Com relação à diferença comparativa entre as seqüências de aminoácidos das proteínas principais do VBIg, só para exemplificar, a S2 do VBIg inglês UK/6-82 difere do norte-americano M-41 em apenas 7,6% quando comparado com os 20% da S1 (Kusters *et al.*, 1990) e em 9% quanto à M (Binns *et al.*, 1986). Por sua vez, o VBIg holandês D-1466, no tocante a S2, possui diferença com outros VBIGs ingleses e norte-americanos entre 25 e 27% (Kusters *et al.*, 1990). Comparando a N de 20 isolados (norte-americanos e europeus), Williams *et al.* (1992) e Zwaagstra *et al.* (1992) encontraram apenas 5% de diferença entre eles. As diferenças na antigenicidade não necessariamente significam diferenças na patogenicidade dos isolados de VBIg. A presença da proteína S na superfície na membrana citoplasmática pode tornar as células infectadas pelo VBIg susceptíveis à citotoxicidade mediada por células T (Cavanagh *et al.*, 1997; Ignjatovic *et al.*, 1997). Existem variações nas proporções entre as concentrações de proteínas estruturais (S : N : M : sM) de diferentes VBIGs (por exemplo, no M-42 / Beaudette a relação é 1 : 11 : 10 : 2) mas ainda não existem boas explicações para estas diferenças (Lai & Cavanagh, 1997).



Figura 1 - Microscopia eletrônica do VBIG (corado negativamente com ácido fosfotúngstico - 300.000 x). Fonte: Foto original de Berry & Almeida (1968) (Hofstad, 1972).

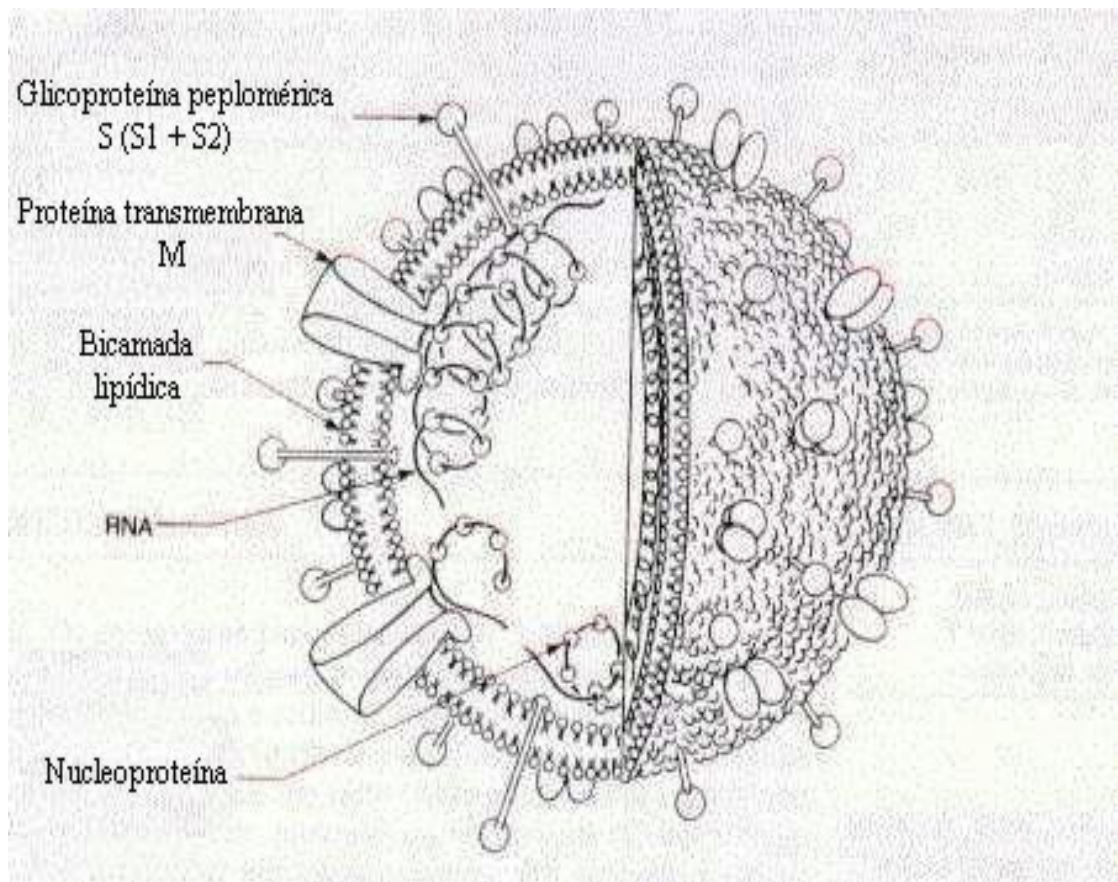


Figura 2 - Morfologia esquemática do coronavírus VBIG.
Fonte: Esquema original de Murray et al. (1992) e modificado por Abreu (2000).

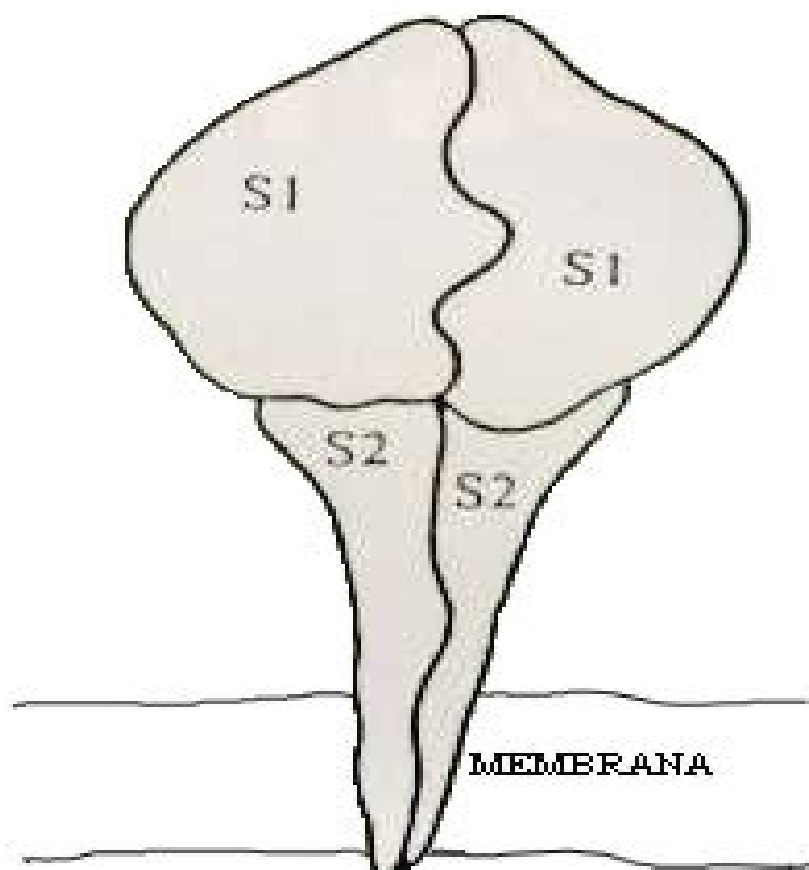


Figura 3 - Glicoproteína peplomérica S (S1 + S2) do VBIG.
Fonte: desenho original de Avellaneda (1992) e modificado para uso neste trabalho.

B - PROTEÍNAS NÃO ESTRUTURAIS (ns)

Normalmente, elas não são encontradas dentro da partícula viral e estão presentes dentro do citoplasma da célula infectada durante a replicação viral. Os genes que as codificam, excetuando o gene 1, não são essenciais para a replicação viral. A maior e mais importante é a RNA polimerase, codificada pelo gene 1. As outras são mais conhecidas pelos genes (3a, 3b, 5a e 5b) que as codificam do que pelas suas funções reais. Elas são encontradas em pequenas quantidades nas células infectadas. A capacidade natural de síntese dessas proteínas “*ns*” pode ter um papel importante no tropismo do VBIg por determinadas células e sistemas e, conseqüentemente, na patogenicidade viral (Lai & Cavanagh, 1997).

2.1.3.2. GENOMA

O VBIg possui genoma formado por RNA fita simples poliadenilado, não segmentado, de polaridade positiva (o genoma é um grande RNA mensageiro), com aproximadamente 27.600 nucleotídeos (\cong 27,6 kb), e foi o primeiro coronavírus a ter o RNA completamente seqüenciado (Cavanagh & Naqi, 1997; Collisson *et al.*, 1992; Schochetman *et al.*, 1977). O RNA genômico tem a função de RNA mensageiro (RNAm) e isto significa que é infectante quando introduzido em células eucarióticas susceptíveis (Lomniczi, 1977; Schochetman *et al.*, 1977; Siddell *et al.*, 1982). A organização dos RNAs [genômico ou mensageiro (RNAm) e subgenômicos (RNAm_{sg})] de vários VBIGs já foi estudada detalhadamente (Binns *et al.*, 1985; Brown & Bournnell, 1984; Brown *et al.*, 1984; Lai & Cavanagh, 1997; Stern & Sefton, 1984). Como o RNA é muito grande, na evolução do VBIg, desenvolveram-se mecanismos

especiais para corrigir possíveis erros que acontecem durante a síntese do RNA genômico. Ele contém seis genes (RNAm_{sg}) funcionais (quatro codificam proteínas estruturais), os quais ficam arranjados na seguinte ordem: 5' - polimerase (RNAm_{sg}1) - S (RNAm_{sg}2) - a, b, sM (RNAm_{sg}3) - M (RNAm_{sg}4) - a, b (RNAm_{sg}5) - N (RNAm_{sg}6) - 3' (Figura 4), com alguns genes das pequenas proteínas *ns* (não estruturais) localizadas entre o S, sM, M e N. O terminal 5' do RNA é capeado e inicia com uma seqüência líder (*leader*) de 65 - 98 nucleotídeos, a qual está presente, também, no terminal 5' dos RNAm_{sg}, seguida por uma região não traduzível e não codificadora (UTR5' - *untranslated region*) com 200 - 400 nucleotídeos. No terminal 3' do RNA está uma UTR de 200 - 500 nucleotídeos, denominada UTR3', seguida de uma cauda poliadenilada. O gene da RNA polimerase ocupa 2/3 do genoma total, possuindo aproximadamente 20.000 nucleotídeos ou bases (\cong 20 kb) e dois ORFs (*open reading frame* - janela aberta de leitura - denominados 1a e 1b) que se sobrepõem (Lai & Cavanagh, 1997). Os outros genes (RNAm_{sg}) possuem a seguinte quantidade aproximada de nucleotídeos: S [total \cong de 3.488 bases (b), sendo a S1 (\cong 1.720 b) e a S2 (\cong 1.768 b)], sM (\cong 216 b), M (\cong 677 b) e N (\cong 1230 b) (Lai & Cavanagh, 1997).

2.1.4. REPLICACÃO VIRAL

O VBIg liga-se aos receptores da superfície da célula susceptível através da glicoproteína S. O ciclo de replicação deste vírus ocorre inteiramente no citoplasma da célula hospedeira infectada e as funções nucleares são, até onde se sabe, desnecessárias (Lai & Cavanagh, 1997).

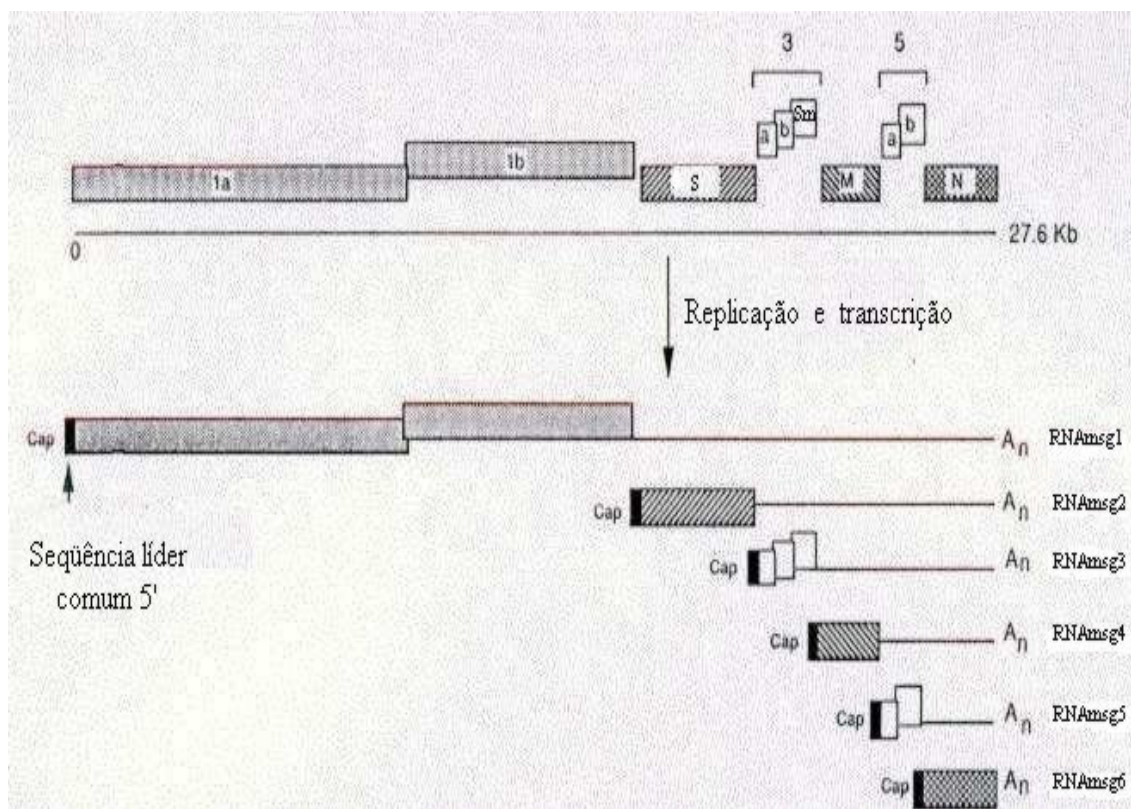


Figura 4 - Genoma do VBIg e representação do esquema de replicação viral.
 Fonte: Esquema original de Liu & Inglis (1991), modificado por Abreu (2000) e para apresentação neste trabalho.

2.1.4.1. ADSORÇÃO E PENETRAÇÃO

As partículas virais se ligam através das pontas das espículas (S) aos receptores específicos da membrana citoplasmática presentes nas células alvo, entretanto esta ligação não é suficiente para a infecção viral. Não está claro se o VBIg penetra por fusão do envelope viral com a membrana citoplasmática ou por endocitose seguida de fusão do envelope viral com a parte interna da membrana da vesícula endocítica. A infecção por este vírus pode ser inibida por droga lisossomotrópica sugerindo que a mais provável porta de entrada seja a endocitose (Li & Cavanagh, 1992).

Alguns VBIgs causam hemaglutinação ou hemadsorção, apesar de não possuírem a glicoproteína HE (hemaglutinina-esterase) presente em outros coronavírus, mas a

atividade hemaglutinante só é detectada após tratamento enzimático (neuraminidase, fosfolipase c, etc.) sugerindo que a glicoproteína S é coberta com ácido siálico (ácido A2,3-N-acetilneuramínico) (Paniago, 1994). Embora a hemaglutinação seja um bom modelo para estudo da interação vírus-célula de outros vírus, ela não reflete, necessariamente, o mecanismo de adsorção do VBIg às células alvo (Schultze *et al.*, 1992).

2.1.4.2. TRADUÇÃO PRIMÁRIA

Para todos os vírus RNA positivos, após a penetração intracitoplasmática, o primeiro evento é a ligação do RNA genômico aos ribossomos para sintetizar a enzima RNA polimerase - RNA dependente. Para o VBIg e outros coronavírus, pouco se sabe sobre este estágio de replicação. Há,

paralelamente à síntese da enzima, a codificação de um polipeptídeo não estrutural que, parece, participa da atividade biológica da enzima (Strauss & Strauss, 1983).

2.1.4.3. TRANSCRIÇÃO DA FITA NEGATIVA DE RNA

A atividade da RNA polimerase viral pode ser detectada junto à membrana citoplasmática das células infectadas em menos de uma hora após adsorção. O RNA genômico é transcrito por esta enzima para formar uma fita negativa de RNA complementar, de tamanho igual ao do RNA genômico com seqüência poli(U) no final 5'. A síntese desta fita negativa de RNA parece estar completa em uma hora após a adsorção, mas o tempo varia de acordo com o VBIG (Jeong & Makino, 1992).

2.1.4.4. TRANSCRIÇÃO DA FITA POSITIVA DE RNA

A fita de RNA negativa serve como molde para síntese de um novo RNA genômico e dos RNAs mensageiros subgenômicos (RNAm_{sg}) capeados e poliadenilados (Siddell *et al.*, 1983), sendo estes RNAm_{sg} produzidos por um mecanismo de transcrição descontínuo (*leader - priming*), os quais passam a funcionar como *replicons* e podem gerar recombinantes (Lai & Cavanagh, 1997; Lai *et al.*, 1994). O mapeamento dos RNAm_{sg} e do RNA genômico mostra que estes RNAs formam um agrupamento de moléculas com o final 3' em comum. Cada RNAm_{sg} possui todas as seqüências nucleotídicas do próximo RNAm_{sg} menor mais um gene adicional no final 5'. Apenas a seqüência 5' proximal de cada RNAm_{sg} é traduzida (Siddell *et al.*, 1982).

2.1.4.5. SÍNTESE DE PROTEÍNAS ESTRUTURAIS E NÃO ESTRUTURAIS

A tradução de cada RNAm vírus específico produz apenas um polipeptídeo que é codificado no final 5' do RNAm. A proteína do nucleocapsídeo (N) e as proteínas não estruturais são aparentemente sintetizadas

em polissomos na matriz citoplasmática (Siddell, 1983).

A síntese das glicoproteínas S e M ocorre em polissomos ligados ao retículo endoplasmático rugoso (RER) e há diferenças importantes no processamento e tradução destas glicoproteínas. A glicoproteína S é inserida cotraducionalmente na membrana do RER e ocorre glicosilação na cadeia crescente de polipeptídeos. A S é transportada do complexo de Golgi para a membrana citoplasmática e cerca de dois ou três glicopolipeptídeos da S formam a espícula mas o sítio de montagem dos glicopolipeptídeos da S para formar a espícula não é conhecido. A M também é sintetizada em polissomos ligados à membrana. Nas células infectadas, a M é transportada para o complexo de Golgi, onde se acumula e não para a membrana citoplasmática (Tomley *et al.*, 1987).

2.1.4.6. MONTAGEM DA PARTÍCULA VIRAL

O nucleocapsídeo helicoidal do VBIG é formado no citoplasma das células infectadas através da interação dos RNAs genômicos recém-formados e a fosfoproteína N. O nucleocapsídeo é flexível, fracamente espiralado e suas dimensões são, provavelmente, determinadas pelas propriedades de ligação da N. O brotamento das partículas virais ocorre nas membranas do complexo de Golgi e do RER. No sítio de brotamento, as fitas de nucleocapsídeos se alinham em arranjos ordenados na superfície citoplasmática destas membranas, provavelmente em áreas que possuem glicoproteínas virais. A interação do nucleocapsídeo com as membranas do RER e do complexo de Golgi provavelmente ocorre através do domínio citoplasmático da glicoproteína M. O brotamento ocorre nestas membranas intracelulares, onde a M está localizada (Sturman & Holmes, 1983). A glicoproteína S pode ser acumulada em grande quantidade na membrana citoplasmática, porém, não ocorre brotamento das partículas virais nestes sítios, provavelmente porque a M está

ausente. Partículas virais com nucleocapsídeo são liberadas no lúmen do RER e do complexo de Golgi. Após a passagem da partícula viral pelo complexo de Golgi, estas são transportadas em vesículas que migram para a periferia da célula. Estas vesículas fundem com a membrana citoplasmática e liberam numerosas partículas virais. Os mecanismos de interação entre as proteínas estruturais virais e as outras que integram as diversas organelas intracelulares para a formação da partícula viral completa continuam desconhecidos. Após serem liberadas das células infectadas, o que pode iniciar 3-4 horas após infecção, muitas partículas virais adsorvem à membrana citoplasmática e, nesta localização, podem estimular o sistema imune. Esta característica dos coronavírus de serem liberados das células sem causarem lise celular é um fator que permitiria a infecção persistente (Oshiro, 1973), porém, para o VBIg, esta situação só está comprovada com alguns isolados nefrotrópicos (Chong & Apostolov, 1982) e enterotrópicos (Dhinakar Raj & Jones, 1997). Por célula e com uma pequena variação inter-VBIgs, o pico máximo de produção de novas partículas víricas infectantes geralmente é atingido cerca de 12 horas após infecção (Cavanagh & Naqi, 1997).

2.2. GENÉTICA DO VBIg

Provavelmente devido ao grande genoma, o VBIg desenvolveu uma grande variedade de mecanismos genéticos, dentre os quais estão a recombinação do RNA, a geração de RNA interferente defectivo e as mutações, visando manter sua estabilidade genética e gerando produtos com grande diversidade antigênica superficial, o que permite contornar as defesas do hospedeiro (Lai & Cavanagh, 1997). Por tais situações, já comprovadas, pode-se afirmar que cada isolado de surtos clínicos de campo possui uma natureza genética própria, apesar de haver muita similaridade em alguns genes entre as diversas estirpes (Jia *et al.*, 1995).

2.2.1. VARIANTES

2.2.1.1. MUTAÇÃO DO RNA

Os VBIgs que se enquadram nesta categoria de variantes têm sido detectados com um teste de neutralização que utiliza anticorpos monoclonais dirigidos contra epítomos da estrutura espacial (glicopolipeptídeo) da S1 (Cavanagh *et al.*, 1995) ou a técnica de RT-PCR com análise por RFLP do gene codificador da S1 (Kwon *et al.*, 1993a,b). Estes mutantes mantêm algumas propriedades dos VBIgs originais mas podem ter patogenicidades diferenciadas devido aos tropismos celulares alterados. O VBIg norte-americano CU-T2, originalmente classificado como pertencente ao sorotipo Arkansas, sofreu mutações de ponto no gene S1, passando a exibir, também, epítomos do sorotipo Massachusetts na S1 (Jia *et al.*, 1995). Deleções e substituições (inserções) ocorrem com frequência quando passagens seriadas do VBIg são feitas em ovos embrionados de galinha, cultivos celulares e de tecido, onde as pressões negativas de seleção estão ausentes (Wang *et al.*, 1993). As deleções e/ou inserções ocorrem, mais frequentemente, dentro da região hipervariável genômica codificadora do S1 (Kusters *et al.*, 1990). Conseqüentemente, naqueles VBIgs que sofreram deleções e inserções, antigenicidade (Kusters *et al.*, 1990) e patogenicidade poderão ficar alteradas (Lai & Cavanagh, 1997).

2.2.1.2. RECOMBINAÇÃO DO RNA

Existem dois tipos de recombinação do RNA viral: homóloga, considerada a mais freqüente, a qual ocorre entre diferentes estirpes do mesmo vírus, por exemplo, o VBIg, e a heteróloga, entre diferentes gêneros e até famílias de vírus contendo RNA, como, comprovadamente, ocorreu com o gene HE, codificador da glicoproteína de superfície (hemaglutinina - esterase), cuja seqüência de nucleotídeos é idêntica entre o vírus da influenza C e os coronavírus da hepatite murina e dos bovinos (Lai & Cavanagh, 1997). O VBIg possui a habilidade de sofrer

recombinações no RNA com alta frequência, tanto em infecções naturais (Lai, 1992) como experimentais em ovos embrionados de galinha (Kotier *et al.*, 1995). Análises das seqüências gênicas de isolados de surtos da BIG geraram evidências convincentes de que alguns deles são recombinantes de VBIGs conhecidos diferentes. Os sítios de recombinação têm sido detectados na metade 5' do gene S e no terminal 3' do RNA viral (Cavanagh & Davis, 1992; Jia *et al.*, 1995; Wang *et al.*, 1994). Estudos moleculares com vários VBIGs europeus indicaram que a região do gene S2, quando comparada com o gene S1, possui um grande potencial para recombinação devido, em parte, à presença de seqüências de nucleotídeos altamente homólogas (conservadas), principalmente nos VBIGs pertencentes ao mesmo sorotipo e genotipo (Cavanagh *et al.*, 1992a; Gelb *et al.*, 1991; Kusters *et al.*, 1990). O VBIG variante norte-americano CU-T2 sofreu, na natureza, recombinação nos genes S1, S2 e N. É considerado, então, um variante por possuir cerca de 90% das seqüências de nucleotídeos do gene S1, 60% do gene S2 e 50% do gene N idênticos aos do VBIG Ark-99, e, 50% do gene N idêntico ao do VBIG H-52 (Jia *et al.*, 1995). Por sua vez, os 40% restantes do gene S2 pertencem a um VBIG desconhecido. Os VBIGs Ark-99 e H-52 têm sido utilizados, simultaneamente, como vacinas vivas atenuadas nos EUA, podendo, portanto, estar contribuindo para a emergência de variantes no campo, conforme comprovado em estudos visando detectar eventos de recombinações e mutações entre diferentes VBIGs (Jia *et al.*, 1995). O fenômeno da recombinação pode, potencialmente, providenciar, também, um mecanismo genético através do qual os coronavírus mantêm íntegra sua grande seqüência de nucleotídeos do RNA. Devido ao tamanho do RNA viral, é presumível que contenha uma alta frequência de mutações induzidas por erros da RNA polimerase e a recombinação pode ser um mecanismo de reparação providencial (Lai, 1992). A recombinação é, portanto, uma estratégia evolucionária natural do VBIG e de outros coronavírus (Lai & Cavanagh, 1997).

2.2.2. RNAs INTERFERENTES DEFECTIVOS (DI - RNAs) E RNAmgs

Os DI-RNAs, oriundos de uma situação típica de mutação por deleção (item 3.2.1), são aqui destacados devido à sua importância e que deve ser lembrada quando da produção de vacinas (processo de atenuação). As partículas que os contém, são produzidas quando os coronavírus são passados seriadamente e adaptados a sistemas artificiais para replicação (no caso do VBIG: ovos embrionados de galinha e, provavelmente, cultivo de células renais de embriões de galinha - Péntzes *et al.*, 1994; Péntzes *et al.*, 1996). A geração dos DI-RNAs ocorre, provavelmente, devido a um erro de leitura da RNA polimerase ou à recombinação entre RNAs não homólogos durante uma infecção e replicação maciças. Eles são estáveis e infecciosos, considerando que são incorporados ao vírion durante a montagem da partícula viral (envelopamento). Nos sistemas artificiais, as partículas contendo DI-RNAs e RNAmgs têm vantagens seletivas e replicativas imensas sobre as partículas consideradas normais. Esta situação pode ter implicações importantes na produção de vacinas convencionais e, também, no estudo de isolados em sistemas artificiais e, conseqüentemente, adaptados e modificados durante a replicação (Lai & Cavanagh, 1997). Um exemplo bem estudado é o mutante VBIG DI-RNA CD91 que ocorre naturalmente no VBIG M-42 ou Beaudette. Os RNAmgs podem contribuir para a criação de novas variantes por servirem como molde para a RNA polimerase tanto quanto o RNA genômico. Podem ser incorporados nas partículas virais na proporção de um vírion com DI-RNA para cada dez completos do M-42 / Beaudette e, no caso dos RNAmgs, seria de um para cada três para o mesmo VBIG. Com o VBIG M-41, ambas situações ocorrem, mas na proporção de 1:20 (Dalton *et al.*, 1998; Kim *et al.*, 1998; Péntzes *et al.*, 1994; Stirrups *et al.*, 1998).

2.3. A DOENÇA

A interação entre o vírus e o hospedeiro é um dos mais importantes temas da virologia moderna, a começar pelos eventos iniciais da replicação viral na célula infectada, que começam com os receptores celulares que influem diretamente no tropismo celular (Lai & Cavanagh, 1997).

Somente a galinha (*Gallus gallus domesticus*), independente da idade, sexo e linhagem, é naturalmente infectada e sofre doença induzida pelo VBI. Os pintinhos geralmente apresentam sinais de doença respiratória mais grave, seguida de mortalidade elevada induzida pela asfixia com tampões de muco nos brônquios primários na região adjacente a siringe e traquéia. Com o aumento da idade, as galinhas tornam-se mais resistentes aos efeitos provocados pela infecção (Cavanagh & Naqi, 1997).

A VBI é considerada, primariamente, uma doença do sistema respiratório, mas, conforme comprovado em um grande número de trabalhos científicos, muitos VBIs apresentam tropismos variáveis para diferentes órgãos e sistemas (Dhinakar Raj & Jones, 1997). Alguns destes deles, além de um envolvimento discreto do sistema respiratório, muitas vezes assintomático, apresentam tropismo exacerbado para os rins (Cumming, 1963; Butcher *et al.*, 1990) ou para o oviduto (Cook & Huggins, 1986; McDougall, 1968; Sevoian & Levine, 1957) com sérias conseqüências à saúde da galinha. Outros possuem tropismo para o sistema digestivo, com especial destaque para os intestinos, mas, aparentemente, sem induzir alterações patológicas significantes (Bhattacharjee & Jones, 1997; Darbyshire *et al.*, 1976; Dhinakar Raj & Jones, 1996; Lucio & Fabricant, 1990). Miopatia bilateral dos músculos peitorais (profundos e superficiais) de frango de corte, muitas vezes apresentando edema gelatinoso e hemorragias, tem sido associada a um novo VBI variante e, neste caso, a etiopatogenia ainda precisa ser melhor estudada (Gough *et al.*, 1992; Dhinakar Raj & Jones, 1997). A patogenicidade de um VBI é variável e

independente para os vários sistemas e órgãos para os quais possui tropismo (Ratanasethakul & Cumming, 1983). O nome “bronquite infecciosa”, apesar da variabilidade de tropismos, lesões e sinais clínicos induzidos por este vírus, tem sido mantido para evitar confusões (Dhinakar Raj & Jones, 1997).

Muitos fatores intrínsecos (idade e linhagem) e extrínsecos (nutrição, ambiente e infecções paralelas e sinérgicas) influenciam na patogênese da VBI, além das características inerentes ao(s) isolado(s) envolvido(s) (Dhinakar Raj & Jones, 1997). Todas as idades são susceptíveis à infecção, porém, a doença é mais grave em pintos e franginhos (Animas *et al.*, 1994). Com o aumento da idade, diminui a mortalidade induzida pelo VBI (Smith *et al.*, 1985) e aumentam as lesões renais (Albassam *et al.*, 1986) e de oviduto (Crinion & Hofstad, 1972). Todas as linhagens de galinhas também são susceptíveis à infecção, mas, por exemplo, embora as linhagens leves sejam mais susceptíveis do que as pesadas no tocante à infecção por VBIs nefrotropicos (Cumming & Chubb, 1988), a mortalidade induzida por elas é maior nas linhagens pesadas (Ignjatovic, 1988; Zanella, 1988). Os machos de linhagens pesadas têm duas vezes mais complicações renais do que as fêmeas (Cumming, 1969), mas o comprometimento direto do sistema reprodutor ainda não está comprovado. Com relação à nutrição, lotes submetidos a dietas ricas em proteínas, especialmente de origem animal, apresentam mortalidade mais elevada quando são infectados com VBIs nefrotropicos (Cumming & Chubb, 1988), o mesmo acontecendo em dietas ricas em cálcio devido ao bloqueio renal por urolitíase (Glahn *et al.*, 1989). Quando lotes sofrem infecção pelo VBI e são portadores de *Mycoplasma gallisepticum* e/ou *Escherichia coli*, exibirão sinais clínicos respiratórios mais graves (coriza, lacrimação, sinusite, ronqueira devido a traqueíte, bronquite, pneumonia e aerossaculite) e complicados (peritonite, perihepatite, pericardite e salpingite), muitas vezes crônicos, além de aumentarem a mortalidade, condenação em abatedouros,

queda de postura e alterações na qualidade interna (clara líquida) e externa (cor, formato e resistência da casca) dos ovos, decorrentes da interação sinérgica entre estes agentes (Cavanagh & Naqi, 1997; Dhinakar Raj & Jones, 1997). Usando este modelo de infecção sinérgica potenciadora, diversos trabalhos descrevem diferenças na virulência de isolados do VBIg e na susceptibilidade de linhagens genéticas de galinhas (Avellaneda *et al.*, 1994; Cubillos *et al.*, 1991; Dhinakar Raj & Jones, 1997). A interação entre o VBIg e outros vírus que infectam os diversos sistemas [respiratório (vírus da doença de Newcastle, da laringotraqueíte infecciosa, da pneumovirose aviária e adenovírus), reprodutor (ídem vírus do sistema respiratório), renal (ídem vírus do sistema respiratório, acrescido do vírus da doença de Gumboro), digestivo (ídem todos vírus já mencionados, acrescidos de enterovírus, reovírus e rotavírus) e imunitário (vírus da doença de Gumboro e vírus da anemia das galinhas)] está razoavelmente estudada em poucos casos, mesmo assim sem esclarecer se há um real sinergismo entre os diferentes vírus. Evidências experimentais demonstram que o vírus da doença de Newcastle não interfere na infecção do VBIg, embora o VBIg (mesmo vacinal) agrave a mortalidade induzida pelo vírus da laringotraqueíte infecciosa e, com relação ao vírus da doença de Gumboro (VDG), o problema está relacionado com a imunossupressão / imunodepressão induzida pelo VDG em infecção precoce ou anterior à do VBIg (Dhinakar Raj & Jones, 1997; Nakamura *et al.*, 1996; Rosenberger & Gelb, 1987).

Todos os aspectos considerados importantes e que favorecem o aparecimento da doença, a imunidade (ativa e passiva), assim como a doença em si, incluindo transmissão, período de incubação, sinais clínicos, achados (macro e microscópicos) relacionados com o VBIg, além de sua prevenção e seu controle, estão descritos, detalhadamente, em vários

trabalhos, revisões e capítulos de livros (Albassam *et al.*, 1986; Andrade *et al.*, 1983; Bumstead *et al.*, 1989; Cavanagh & Naqi, 1997; Cook *et al.*, 1986; Cook *et al.*, 1992; Cowen *et al.*, 1987; Crinion & Hofstad, 1972; Dhinakar Raj & Jones, 1997; Hofstad & Yoder, 1966; Mockett *et al.*, 1987; Otsuki *et al.*, 1990; Siller, 1981).

Desde a confirmação da presença do VBIg no Brasil (Hipólito, 1957), e tomando por base informações divulgadas em relatórios oficiais anuais das últimas duas décadas, principalmente do Ministério da Agricultura, os quais agrupam resultados virológicos de laboratórios (particulares credenciados e oficiais federais e estaduais) que realizam diagnósticos de doenças das aves, este vírus é isolado com frequência a partir de surtos da BIG nos diversos segmentos da avicultura industrial brasileira (Villa, 1998). Vários estudos contribuíram para aumentar o conhecimento a respeito de isolados no Brasil, além de comprovar a permanência e a importância do VBIg em nosso meio (Abreu, 2000; Di Fábio, 1993; Epiphanyo, 1998; Hipólito *et al.*, 1979; Ikuta, 1999; Jorge *et al.*, 1992; Lunge *et al.*, 1998; Martins *et al.*, 1996; Paniago, 1994; Resende *et al.*, 1989; Resende *et al.*, 1998; Santiago *et al.*, 2000; Silva, 1989; Silveira & Marques, 1995; Souza, 1999; Souza, 2000; Wentz, 1992).

A importância econômica decorrente do impacto da ocorrência do VBIg na avicultura industrial norte-americana e, por extensão, mundial, pode ser estimada pela análise dos relatórios anuais da Associação Americana de Patologistas Aviários (sigla, em inglês, é AAAP), nos quais, persistentemente, o VBIg tem sido o mais freqüente agente infeccioso de etiologia vírica isolado a partir de frangos e poedeiras (Cavanagh & Naqi, 1997; Collisson *et al.*, 1992).

Os principais eventos relacionados com a BIG e o VBIg no mundo (incluindo o Brasil) estão agrupados na Tabela 1.

Tabela 1 - Principais eventos relacionados com a BIG e o VBIG no mundo.*

Anos	Eventos
1930-31	- Primeira descrição clínica da BIG (EUA)
1936	- Estabelecimento da etiologia vírica (EUA)
1937	- Primeiro isolamento em ovo embrionado de galinha (VBIG Beaudette ou USA/M-42/37, EUA)
1941	- Isolamento do VBIG USA/M-41/41 (protótipo do sorotipo Massachusetts)
1946	- Estudo sobre sensibilidade química (desinfetantes e detergentes) (EUA)
1947	- Comprovação da transmissão aérea (EUA)
1948	- Primeiro isolamento na Inglaterra
1950	- Primeira descrição dos problemas reprodutivos (queda de postura & postura de ovos anormais) (EUA)
1951	- Isolamento do VBIG USA/A-5968/51 ou C-46 (protótipo do sorotipo Connecticut) (EUA)
1952-56	- Implantação de vacinas vivas atenuadas no controle (EUA)
1954	- Isolamento do primeiro VBIG nefrotrópico (USA/Holte/54 - EUA)
1952-55	- Primeiros isolamentos no Japão e na Holanda (VBIG NL/H/55, usado como vacina, após atenuação)
1956-58	- Primeira tipificação sorológica (vírusneutralização) em larga escala - EUA (detecção de dois novos VBIGs e protótipos de sorotipos: USA/Iowa-97/52 e USA/Iowa-609/53)
1957	- Primeiro isolamento no Brasil (Prof. Osmane Hipólito, Escola de Veterinária, UREM, hoje UFMG)
1957	- Primeiro uso do teste de fixação de complemento no diagnóstico sorológico (EUA)
1959	- Primeiro uso do teste de imunodifusão no diagnóstico sorológico (Alemanha)
1960-64	- Isolamento de novos VBIGs nefrotrópicos (EUA: USA/Gray/60 & Austrália: A/1-62/62 ou "T")
1963	- Confirmação do genoma RNA (EUA)
1964	- Isolamento do VBIG USA/JMK/64 (EUA)
1965	- Primeiro uso do teste de imunofluorescência para detecção direta durante infecção (EUA)
1967	- Isolamento do VBIG USA/SE-17/67 (EUA)
1968	- Utilização de vacinas comerciais inativadas no controle (Inglaterra)
1972	- Isolamento do VBIG USA/Ark-99/72 (EUA)
1973	- Isolamento do primeiro VBIG nefrotrópico brasileiro (Prof. Osmane Hipólito - USP)
1976	- Padronização do teste de neutralização em cultivo de anéis de traquéia (Inglaterra)
1978-79	- Isolamento dos variantes NL/D-1466/78, NL/D-207/79 e NL/D-274/79 (Holanda)
1980	- Autorização oficial da vacinação no Brasil (sorotipo Massachusetts - VBIG "Holland" atenuado)
1981	- Primeiro uso do teste de ELISA no diagnóstico sorológico (Inglaterra)
1982	- Isolamento do variante UK/6-82/82 (Inglaterra)
1981-85	- Isolamento de VBIGs enterotrópicos (Inglaterra / Marrocos)
1986	- Isolamento do variante nefrotrópico B/B-1648/86 (Bélgica)
1981-88	- Seqüenciamento genoma: USA/M-41/41, USA/M-42/37 (Beaudette), UK/6-82/82 e J/KB-8523/83
1989-90	- Primeiros estudos filogenéticos (Holanda)
1991	- Uso da técnica de RT-PCR / RFLP (genes: S2, M e N) no diagnóstico / genotipificação (Japão / EUA)
1992-93	- Uso da técnica de RT-PCR / RFLP (genes: N e S1) no diagnóstico / genotipificação (Holanda / EUA)
1994	- Isolamento do variante recombinante USA/CU-T2/94 (EUA)

* - Fonte: Cavanagh & Naqi, 1997; Collisson *et al.*, 1992; Hipólito, 1957; Hipólito, 1973; Hofstad, 1958; Hofstad, 1961; Hofstad, 1984; Hopkins, 1969; Jia *et al.*, 1995; Johnson *et al.*, 1973; Kusters *et al.*, 1990; McMartin, 1968; Mockett & Darbyshire, 1981; Wang & Tsai, 1996; Villa, 1998.

- Observação: Identificação individual ⇒ País de origem (USA= United States of America - EUA; UK= United Kingdom - Reino Unido; NL= The Netherlands - Holanda ou Países Baixos; B= Belgium - Bélgica; J= Japan - Japão) / sigla ou número do VBIG / ano do isolamento do VBIG e, também, na maioria dos casos, de ocorrência do surto correspondente (exceção: o USA/A-5968/51, também é denominado C-46, devido ao ano de ocorrência do surto - 1946, mas o ano de isolamento foi posterior. O mesmo parece ter ocorrido com o Iowa-609 e o Iowa-97).

2.4. DIAGNÓSTICO

Independentemente dos sistemas afetados, os sinais clínicos desencadeados e as lesões macro e microscópicas não são patognomônicos de uma infecção pelo VBIg, sendo necessárias outras providências, posteriores aos exames clínico e anatomopatológico, para confirmação de seu envolvimento (Dhinakar Raj & Jones, 1997). O diagnóstico é baseado na presença ou na elevação dos títulos de anticorpos anti-VBIG ou, preferencialmente, na detecção direta do VBIg, seja por detecção antigênica direta intracelular (baseada em vários testes que utilizam anticorpos policlonais ou monoclonais anti-VBIG marcados com uma substância reveladora), pelo isolamento viral ou pela detecção por amplificação, seguida de caracterização genômica - RT-PCR / RFLP (Cavanagh & Naqi, 1997; Dhinakar Raj & Jones, 1997).

2.4.1. SOROLOGIA

Diversos testes sorológicos são rotineiramente usados para monitorar resposta vacinal anti-VBIG e detectar o aparecimento ou aumento nos títulos de anticorpos anti-VBIG após infecções naturais ou experimentais. A possibilidade da presença de múltiplos sorotipos e a variação antigênica verificada em diversos isolados estudados coloca uma complexidade adicional séria na seleção de método sorológico apropriado e na análise dos resultados dos testes. Anticorpos produzidos contra os antígenos do VBIg presentes em todos os isolados, são chamados específicos de grupo, e, os contra o glicopolipeptídeo S1, são denominados específicos de tipo (Cavanagh & Naqi, 1997). Os testes convencionais de ELISA (sigla, em inglês, de *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*), imunofluorescência e imunodifusão detectam anticorpos tanto direcionados para os antígenos comuns (de grupo) como os específicos (de tipo) e, por causa desta característica de ligação ampla, não servem para identificação dos diferentes VBIGs. Os testes de vírusneutralização (VN) e inibição da

hemaglutinação (IH), no que diz respeito às reatividades grupo/tipo específicas, não são muito melhores do que os três testes mencionados anteriormente. A especificidade destes testes depende, no caso do hipervariável VBIg, diretamente da forma de produção e purificação dos antígenos empregados nos mesmos, mas sempre haverá alguma reatividade cruzada (Cavanagh & Naqi, 1997; Martins, 1990).

A sorologia de rotina para o VBIg é, usualmente, feita com VN, IH ou ELISA, individualmente ou associados. Os testes de VN (soro constante e vírus diluído ou soro diluído e vírus constante) podem ser conduzidos utilizando ovos embrionados de galinha SPF (OEG/SPF) [(*Specific Pathogen Free* - livres de patógenos especificados) (Cunningham, 1973; Villegas, 1985)], cultivo de anéis de traquéia (CAT) de embriões de galinha obtidos de OEG/SPF com 19 dias de incubação ou de pintos SPF (Cook *et al.*, 1976; Darbyshire *et al.*, 1979) ou cultivo primário de células de rim de embriões ou pintos SPF (Hopkins, 1974). Diferentes procedimentos para realização do teste de IH são utilizados, incluindo o tratamento químico a que o VBIg tem que ser submetido (King, 1988; Schultze *et al.*, 1992). Preferencialmente, após vacinação, a sorologia para o VBIg com os testes de VN ou IH deve ser conduzida com antígenos homólogos àqueles presentes na vacina utilizada (Cavanagh & Naqi, 1997).

O teste de ELISA é largamente utilizado na sorologia e vários *kits* comerciais estão disponíveis. A resposta de anticorpos pode ser detectada mais precocemente pelo ELISA do que pelo teste de VN (Marquardt *et al.*, 1981). Os procedimentos para a realização do teste de imunofluorescência podem ser diretos e indiretos (Chubb, 1986; Csermelyi *et al.*, 1988). Os anticorpos detectados pelo teste de imunodifusão aparecem de uma forma flutuante e inconstante, levando a resultados variáveis (Gough & Alexander, 1978). Um teste de ELISA de bloqueio empregando anticorpos monoclonais para diagnóstico sorológico específico foi desenvolvido para os sorotipos Massachusetts e Arkansas e

apresentou especificidade semelhante ao VN em teste comparativo (Karaca & Naqi, 1993). Na avicultura industrial, a alta especificidade dos testes sorológicos é mais importante do que a sensibilidade, mas deve-se considerar que a baixa sensibilidade pode ser compensada pela sorologia de grande número de soros individuais que podem facilmente ser obtidos no mesmo plantel (De Wit *et al.*, 1997; De Wit, 2000).

2.4.2. ISOLAMENTO, IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO VBIG

2.4.2.1. ISOLAMENTO

Por ser o primeiro e mais freqüente dos sistemas - alvo, o sistema respiratório é o principal sítio de coleta e fornecimento de amostras (traquéia, pulmões e sacos aéreos) para isolamento do VBIG (Dhinakar Raj & Jones, 1997). As tonsilas cecais, coletadas durante exame *postmortem*, entretanto, podem ter um grande significado quando a doença já se instalou há mais de uma semana no lote, porque o VBIG geralmente desaparece do sistema respiratório antes do sistema digestivo (Cavanagh & Naqi, 1997). Dependendo do histórico clínico da doença, amostras dos rins e oviduto deverão ser coletadas, adicionalmente. Embora seja aparentemente uma tarefa fácil, a seleção de amostras para estudo em um grande lote é dificultada, principalmente quando a doença já saiu da fase aguda e apresenta alterações mais crônicas devido ao envolvimento de outros agentes, principalmente bacterianos, os quais estendem as lesões a sistemas para os quais o VBIG normalmente não possui tropismo (Cavanagh & Naqi, 1997; Dhinakar Raj & Jones, 1997; Resende *et al.*, 1989). Nestes casos e com esta finalidade, o uso de galinhas sentinelas SPF (dentro ou ao lado do galpão), durante o período de uma semana de exposição por contato, pode levar a resultados mais satisfatórios do que a coleta de amostras (órgãos e tecidos) diretamente no lote problema (Gelb *et al.*, 1987). Os procedimentos para coleta, remessa e processamento laboratorial de amostras para isolamento do VBIG

encontram-se descritos em detalhes (Gelb, 1989).

Visando o isolamento viral, os materiais processados, geralmente trabalhados em *pool* por sistemas (respiratório, renal, reprodutor ou digestivo), são inoculados em OEG/SPF (9-10 dias de incubação – via cavidade alantóidea) ou CAT ou, também, pintos SPF instalados em um ambiente altamente controlado (isoladores). A parte fluida desses sistemas de cultivo (líquido alantóideo de OEG/SPF ou sobrenadante de CAT) deverá ser coletada 48-72 horas após inoculação para que novas passagens sejam realizadas nos sistemas homólogos e, no mínimo, cinco passagens consecutivas deverão ser realizadas antes do material ser considerado negativo. O critério inicial de positividade para o VBIG é baseado no aparecimento de alterações macroscópicas dos embriões infectados (nanismo e enrolamento do embrião e urolitíase nos mesonefros), situação que aparece a partir do sexto dia após inoculação em OEG/SPF, ou na detecção de ciliostase e/ou destruição do epitélio ciliado estratificado da mucosa traqueal no CAT ou na traquéia de pintos SPF após exposição (Cavanagh & Naqi, 1997; Dhinakar Raj & Jones, 1997; Epiphany, 1998; Paniago, 1994; Resende *et al.*, 1989). A partir dos materiais processados originais ou dos fluidos dos sistemas de cultivo primário, suspeitos de conterem o VBIG, pintos SPF susceptíveis, adequadamente alojados dentro de isoladores, podem ser inoculados (exposição nasal, ocular ou intratraqueal) para reprodução rápida do quadro respiratório, o que geralmente ocorre entre 18 e 36 horas se o VBIG estiver presente. Três a quatro semanas após inoculação, os soros destas aves podem ser estudados em estudos comparativos cruzados de neutralização viral que podem ajudar na tipificação sorológica do isolado (Cavanagh & Naqi, 1997; Resende *et al.*, 1989). Os isolados obtidos em sistemas de cultivo devem ser confirmados como sendo VBIG por microscopia eletrônica ou por um dos outros procedimentos descritos a seguir.

2.4.2.2. IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO

A – MÉTODOS QUE UTILIZAM ANTICORPOS

Cortes histológicos ou esfregaços de mucosa de traquéia e outros tecidos obtidos de galinhas infectadas com VBIg podem ser examinados por testes de imunofluorescência ou imunoperoxidase (Chubb, 1986; Gelb, 1989; Hawkes *et al.*, 1983; Naqi, 1990; Resende *et al.*, 1989; Yagyu & Ohta, 1990). Igual procedimento pode ser realizado em embriões e outras partes acessórias (membrana cório-alantóidea) de OEG/SPF e em CAT ou pintos SPF infectados com o VBIg (Cavanagh & Naqi, 1997). O VBIg, presente em líquido alantóideo ou em sobrenadante de cultivo celular (células renais de embriões de OEG/SPF ou pintos SPF) ou CAT ou em diversos órgãos/sistemas alvo de pintos SPF após exposição, também pode ser detectado e identificado, inclusive tipificado dentro de um determinado sorotipo, por teste de ELISA utilizando anticorpos monoclonais (Kant *et al.*, 1992; Karaca *et al.*, 1992; Koch *et al.*, 1990; Naqi *et al.*, 1993).

A tipificação sorológica tradicional de isolados do VBIg a partir de surtos ocorridos em lotes de galinhas, previamente vacinados contra o VBIg ou não, é baseada em testes de neutralização cruzada, os quais geralmente utilizam os mesmos sistemas de replicação viral empregados no isolamento e necessitam de uma grande quantidade de soros imunes policlonais mono-específicos anti-estirpes de referência representantes de cada sorotipo conhecido (Cavanagh & Naqi, 1997).

B – MÉTODOS QUE UTILIZAM ÁCIDO NUCLÉICO

A detecção seguida de classificação, tipificação ou agrupamento de isolados do VBIg, pode ser feita *in vitro* pela técnica de RT-PCR / RFLP, resumidamente chamada de tipificação genômica ou genotipificação, dispensando as demoradas e laboriosas técnicas tradicionais de neutralização viral em OEG/SPF com soros imunes de referência sorotipo-específicos (Adzhar *et*

al., 1996; Jackwood *et al.*, 1997; Kwon *et al.*, 1993a,b; Lin *et al.*, 1991a,b; Song *et al.*, 1998; Zwaagstra *et al.*, 1992). O RNA viral pode ser extraído de poucos microlitros do líquido alantóideo de OEG/SPF inoculado com o VBIg, convertido a cDNA (DNA complementar) e amplificado pela RT-PCR (Cavanagh & Naqi, 1997; Kwon *et al.*, 1993a,b; Lin *et al.*, 1991a,b). A análise do(s) produto(s) da RT-PCR / RFLP vem substituindo os métodos tradicionais e consagrados de classificação sorológica, principalmente, pela rapidez e confiabilidade dos resultados (altíssimas sensibilidade e especificidade), permitindo, a um só tempo, confirmar que se trata do VBIg e classificá-lo em genotipo, o que, dependendo do gene estudado, pode ter uma correlação direta de similaridade com o sorotipo obtido no teste sorológico de neutralização cruzada tradicional (Adzhar *et al.*, 1996; Kwon *et al.*, 1993a,b; Lin *et al.*, 1991a,b; Song *et al.*, 1998).

Após a transformação do RNA em DNA pela enzima transcriptase reversa (RT), pode-se realizar a técnica de PCR, durante a qual um único DNA ou, na maioria das vezes, parte dele, mesmo em concentrações muito baixas, serve como molde para vários ciclos de replicação *in vitro* (a cada ciclo, teoricamente, a quantidade de DNA duplica), desde que sejam acrescentados oligonucleotídeos iniciadores à mistura em reação nas condições otimizadas (enzima *Taq* DNA polimerase, nucleotídeos, etc.). Tais iniciadores são seqüências curtas de DNA (geralmente com 18-30 nucleotídeos) complementares às cadeias do DNA-molde, que se ligam a este, formando híbridos e limitando as extremidades 5' e 3' a serem amplificadas. Como a *Taq* DNA polimerase só replica o DNA a partir do sítio onde ocorreu a hibridização, é possível replicar muitas vezes apenas as regiões do DNA-molde delimitadas pelos oligonucleotídeos iniciadores. Isso garante a especificidade: mesmo que existam DNAs diferentes (celulares ou de outros vírus, por exemplo) na mistura em amplificação, só o DNA flanqueado pelos oligos é amplificado. Como os ciclos de replicação ou amplificação exigem etapas em altas temperaturas, a *Taq* DNA polimerase usada

é extraída de bactérias (exemplo: *Thermus aquaticus*) termorresistentes. Desta forma, pode-se obter, após 30-40 ciclos de reação, uma amplificação (da região alvo escolhida) da ordem de 10^9 vezes (Adzhar *et al.*, 1996; Belák & Ballagi-Pordány, 1993; Binns, 1993; Deacon & Lah, 1989; Gravitt & Manos, 1993; Jackwood, 1992; Pfeffer *et al.*, 1995; Rodriguez & Schudel, 1993), mesmo estando o VBIg inativado pelo calor (56°C / 15 min), ilustrando a alta sensibilidade da RT-PCR (Jackwood *et al.*, 1997).

No caso do VBIg, o qual possui algumas partes dos genes S1 e S2 sujeitas a alta variação, a técnica de RT-PCR ideal é aquela que detecta regiões inicialmente flanqueadas com seqüências de nucleotídeos bem conservadas, visando evitar a ocorrência dos falsos negativos (não amplificação da região alvo) decorrentes da baixa similaridade e conseqüente não pareamento dos oligos. Além da real possibilidade do não pareamento de um ou ambos oligos, principalmente nos estudos com isolados de surtos (daí a necessidade da inclusão em qualquer estudo desta natureza de controles positivos bem conhecidos), os falsos negativos podem ocorrer principalmente quando se pretende detectar o VBIg diretamente em tecidos presumivelmente infectados, mas que são ricos em inibidores de alguns componentes importantes da técnica de RT-PCR (por exemplo, inibição da Taq polimerase pela hemoglobina), além de outros compostos não identificados. Também, o genoma do VBIg é facilmente atacável por RNases (intra e extracelulares), quando livre do envelope viral. Para evitar os falsos positivos, os oligos escolhidos devem ser submetidos a uma análise comparativa prévia, utilizando programas adequados, com seqüências de nucleotídeos de genomas disponíveis de outros seres vivos (vírus, bactérias, fungos, protozoários, ácaros, insetos, plantas e animais), principalmente daqueles que podem estar envolvidos nos mesmos sistemas de replicação natural e artificial do vírus [Altschul *et al.*, 1990 - via INTERNET, no GenBank e consulta complementar de busca nos programas BLASTN (nucleotídeos) e, alternativamente, BLASTX

(aminoácidos)]. Neste sentido, também, procedimentos rigorosos de controle são recomendados para prevenir contaminações dentro do ambiente laboratorial, principalmente com segmentos de DNA amplificado previamente (*amplicons*) e que são altamente resistentes aos métodos de desinfecção convencionais, durante a realização da RT-PCR (Beisel, 1992; Binns, 1993; Newton, 1995; Pfeffer *et al.*, 1995).

Na análise por RFLP, devem ser utilizadas enzimas de restrição de ótima procedência e qualidade, como forma de garantir a reproducibilidade e confiabilidade desta técnica, além de ser indispensável a realização de avaliações prévias das mesmas no tocante à capacidade de clivagem de um DNA padrão conhecido. As enzimas de restrição são endonucleases extraídas de bactérias (a maioria delas), recebendo na sua denominação, as iniciais da bactéria (gênero + espécie) que a sintetiza. Elas reconhecem seqüências específicas de bases (nucleotídeos) no DNA fita dupla e cortam o DNA neste ponto. Então, a diferenciação do VBIg em genótipos ou variantes é feito com base na análise da presença ou ausência de sítios de restrição em uma porção específica amplificada do genoma (Pfeffer *et al.*, 1995; Promega, 1998).

Desde os primeiros trabalhos de RT-PCR / RFLP para o VBIg, nos quais as partes alvo estudadas foram um segmento (parte da região N - terminal) do gene S2 (responsável pela codificação do glicopolipeptídeo S2 da glicoproteína peplomérica S) (Lin *et al.*, 1991a,b) e uma região na junção dos genes M - N (Andreasen *et al.*, 1991), vários outros trabalhos, com modificações (n^o ciclos da PCR, gene ou região genômica alvo, enzimas de restrição utilizadas, diferentes VBIGs), foram realizados: gene S1 total (Adzhar *et al.*, 1996; Jackwood *et al.*, 1997; Kwon *et al.*, 1993a,b; Song *et al.*, 1998) e parcial (Wang & Tsai, 1996), parte do gene N (Zwaagstra *et al.*, 1992), parte do gene M (Adzhar *et al.*, 1996) e região parcial da 3'UTR (Adzhar *et al.*, 1996). Alternativamente ao isolamento viral, o VBIg pode ser detectado diretamente, a

partir de tecidos infectados retirados dos sistemas de eleição ou tropismo, com posteriores extração de seu RNA, amplificação de gene(s) específico(s) (ou parte de um deles) por RT-PCR e análise por RFLP para genotipificação (Cavanagh & Naqi, 1997; Song *et al.*, 1998).

A PCR, incluindo suas variações [RT-PCR, RAPD-PCR, RT-*Nested* PCR, com ou sem marcação (radioativa ou não) nos oligos, etc.], é aplicada, praticamente, a qualquer agente infeccioso [vírus (DNA / RNA), bactérias, clamídias, fungos, protozoários] ou genes (associados ou não a distúrbios genéticos – hormônios, enzimas, etc.). Outros métodos surgirão, mas, as técnicas moleculares são ferramentas que vieram para serem usadas, associadas aos métodos tradicionais, e que, seguramente, deverão variar caso a caso. Uma grande variedade de sistemas e kits de detecção e diagnóstico, além de outras facilidades relacionadas à execução da PCR, tem possibilitado, gradativamente, uma crescente utilização por laboratórios de diagnóstico (Pfeffer *et al.*, 1995). No Brasil, além dos laboratórios de diversos centros de pesquisa nas universidades públicas e privadas, a técnica de PCR e suas variações já são utilizadas por alguns laboratórios particulares com finalidades diagnósticas (medicina, medicina veterinária). Alguns trabalhos com isolados brasileiros do VBIg que utilizaram a técnica de RT-PCR, com ou sem análise por RFLP, já foram publicados [Abreu, 2000 (parte do gene N com análise por RFLP); Lunge *et al.*, 1998 (gene S1 total com análise por RFLP + seqüenciamento de parte do gene N); Resende *et al.*, 1998 (parte do gene S2); Santiago *et al.*, 2000 (gene S1 total com análise por RFLP); Silveira & Marques, 1995a,b (a: parte do gene N; b: gene S1 total com análise por RFLP)].

2.5. ESTUDOS DE RELACIONAMENTOS GENÉTICOS ENTRE VBIGs

Seqüências de genes de VBIGs de diversos países foram estudadas e publicadas, estando disponíveis, gratuitamente, no GenBank [via Internet (seqüências disponíveis no endereço eletrônico do

“National Institute of Health – NCBI”: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>] (Binns *et al.*, 1985; Binns *et al.*, 1986; Bournsnel *et al.*, 1987; Brown *et al.*, 1984; Cavanagh & Davis, 1992; Sutou *et al.*, 1988; Wang & Tsai, 1996). Os resultados obtidos pela técnica de RT-PCR / RFLP de isolados de VBIG, mesmo quando não seqüenciados, podem ser comparados, classificados e agrupados com base nas seqüências e informações moleculares disponíveis (Song *et al.*, 1998; Wang & Tsai, 1996). A RT-PCR / RFLP tem o potencial de identificar pequenas mudanças na seqüência genômica do VBIG e a ausência ou presença de sítios de restrição enzimática é suficiente para diferenciar isolados. Com a genotipificação, que pode ter ou não correlação direta com a sorotipificação tradicional (Cavanagh & Naqi, 1997; Kusters *et al.*, 1990; Kwon *et al.*, 1993a,b; Lin *et al.*, 1991a; Wang & Tsai, 1996; Zanotto *et al.*, 1996), pois o genotipo pode agrupar isolados que pertencem a diferentes sorotipos (Song *et al.*, 1998), a construção de árvores filogenéticas tornou-se possível com a aplicação de um ou mais métodos e programas de computador disponíveis, permitindo-se estimar o parentesco de isolados e estirpes do VBIG (Kusters *et al.*, 1989b; Kusters *et al.*, 1990; Lin *et al.*, 1991a; Zwaagstra *et al.*, 1992). O conhecimento genotípico de isolados do VBIG prevalentes em uma determinada região, quando associado ao seu relacionamento filogenético, respeitados os limites da filogenia molecular (Zanotto *et al.*, 1996), é importantíssimo na elaboração de futuras estratégias de controle do VBIG (Song *et al.*, 1998).

2.6. CONTROLE

Na avicultura industrial mundial, o controle do VBIG tem sido feito, com relativo sucesso, pela combinação de medidas básicas de biossegurança (isolamento, lotes próximos com idade única, *all-in-all-out*, limpeza, desinfecção e vazão sanitário) que incluem programas de vacinação desenvolvidos de acordo com cada região ou país. As vacinas vivas utilizadas são constituídas de VBIGs vivos atenuados (atenuação por passagens seriadas em

ovos embrionados de galinha, podendo ser ou não clonados em cultivo primário de células de embrião de galinha) e liofilizados e, as inativadas podem conter os mesmos VBIGs atenuados das apresentações vivas, associados ou não a VBIGs patogênicos (inativados), quando se trata de uso regional ou autóctone (geralmente emulsionados em óleo mineral e associados com diferentes vírus e/ou bactérias). As vacinas vivas com VBIGs atenuados se destinam a aves jovens e/ou em crescimento (frangos de corte, poedeiras e reprodutores em fase de recria), devendo ser aplicadas, preferencialmente, de forma massiva (*spray* - aerossol), rápida e em pelo menos duas aplicações distintas (intervalo de 20-30 dias entre aplicações), visando minimizar a possibilidade real de reversão de virulência e melhorar a resposta imune local ou de mucosas, especialmente do sistema respiratório, principal porta de entrada do VBIG. As vacinas inativadas oleosas, combinadas ou não, se destinam a galinhas de vida útil longa (poedeiras comerciais e matrizes) e devem ser aplicadas de um a dois meses antes do amadurecimento sexual (puberdade), sempre após a utilização anterior de vacinas vivas anti-VBIG (mínimo de duas aplicações distintas prévias com vacinas vivas atenuadas para garantir um *booster* de resposta imune de longa duração com a vacina inativada) (Cavanagh & Naqi, 1997).

A vacinação contra o VBIG com vírus homólogo àquele responsável pelo desafio reduz a transmissão do vírus por contato direto, a gravidade das lesões macro e microscópicas, sinais clínicos respiratórios, perdas por condenação no abatedouro, queda de postura, postura de ovos anormais e mortalidade, mas não impede a infecção com concomitante aparecimento de quadro subclínico (Abreu, 2000; De Wit *et al.*, 1998; Sander *et al.*, 1997).

No Brasil, a vacinação contra o VBIG tem sido feita desde 1980. Os VBIGs importados liberados para uso pelo Ministério da Agricultura e abastecimento (Portaria Ministerial Nº 24/80, de 17 de janeiro de 1980 "Aprova as normas para o controle e o emprego de vacinas contra a bronquite

infeciosa das aves") são atenuados por passagens seriadas em OEG/SPF (H-120, H-90 e H-52 - o "H" vem de "Holland" e os números representam a quantidade de passagens em OEG/SPF e quanto maior, maior a atenuação) ou naturalmente apatogênicos, imunogênicos e clonados (exemplo: MA-5), sendo todos pertencentes ao sorotipo/genotipo Massachusetts (Abreu, 2000; Resende, 1983; Villa, 1998). Os VBIGs "Holland", independente da intensidade de atenuação, podem causar danos aos rins (Winterfield & Albassam, 1984). Estes VBIGs são utilizados tanto em vacinas vivas liofilizadas como nas inativadas oleosas mistas ou não. A decisão de se optar por VBIGs vacinais do sorotipo Massachusetts baseou-se no fato de que eles, com base nas informações disponíveis na literatura científica internacional daquela época (1980), conferiam uma imunogenicidade mais ampla, inclusive sobre VBIGs pertencentes a outros sorotipos (Resende, 1983; Silva, 1989). Foi uma decisão emergencial e desprovida de um necessário estudo prévio de eficiência vacinal frente a isolados brasileiros do VBIG (Resende, 1983).

Diversos países, além dos VBIGs usados como vacina na avicultura industrial brasileira, utilizam outros pertencentes a sorotipos/genotipos diferentes (Tabela 4), tanto regionalmente como nacionalmente, vivos ou inativados, sendo que diferentes VBIGs vivos, mesmo atenuados, quando usados concomitantemente no mesmo plantel ou região, acabaram recombinao entre si e/ou com VBIGs de campo e colaboraram com o aparecimento de surtos da doença causados por VBIGs variantes naqueles lotes vacinados (Cavanagh & Naqi, 1997; De Wit *et al.*, 1998; Jia *et al.*, 1995; Kwon *et al.*, 1993b; Kusters *et al.*, 1989a,b; Kusters *et al.*, 1990; Lin *et al.*, 1991a,b; Song *et al.*, 1998; Wang & Tsai, 1996; Wu *et al.*, 1998).

Entretanto, a despeito dos programas de vacinação sistemática contra o VBIG, os surtos da BIG continuam ocorrendo em plantéis vacinados na avicultura industrial de diversos países, inclusive no Brasil. Estes surtos têm ocorrido devido à

combinação de diversos fatores que podem estar diretamente relacionados ao VBIg [vírus vacinal diferente do de campo pela hipervariabilidade viral (mutação e/ou recombinação), alta ou baixa atenuação do VBIg vacinal] ou outros fatores (imunodepressão, manejo inadequado da vacina, etc.) (Ikuta, 1999; Jia *et al.*, 1995; Lunge *et al.*, 1998; Song *et al.*, 1998; Wang & Tsai, 1996; Wu *et al.*, 1998). Alguns países, ainda que para uso regional ou autóctone em matrizes e poedeiras, têm utilizado vacinas inativadas oleosas preparadas com VBIGs patogênicos, variantes ou não (Gelb *et al.*, 1983; Cavanagh & Naqi, 1997).

3. MATERIAL E MÉTODOS

O projeto foi idealizado e desenvolvido no Setor de Doenças das Aves do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva da Escola de Veterinária da UFMG (EV / UFMG). Contou, ainda, nas fases iniciais, com a colaboração (facilidades no uso de equipamentos relacionados com PCR) do Laboratório de Genética Molecular (hoje não existe mais) do Departamento de Zootecnia da EV / UFMG e dos Laboratórios de Virologia Comparada e Virologia (Humana) do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG (ICB / UFMG).

O suporte financeiro foi obtido junto à FAPEMIG (principal - 85%), da FINEP (10%) e outros [CNPq; FEP / MVZ - Coordenação Preventiva (5%)].

3.1. VBIGs (ESTIRPES DE REFERÊNCIA E ISOLADOS BRASILEIROS)

Vinte e três VBIGs foram replicados em OEG/SPF (item 3.3) e usados neste estudo: oito VBIGs de referência (Tabela 2) representando os sete sorotipos padrões mais importantes, conforme Johnson & Marquardt (1975) e Kwon *et al.* (1993a,b) [seis norte-americanos: USA/M-41/41 (ATCC / VR-21) (sorotipo Massachusetts), USA / A-5968/51 (ATCC / VR-817) / (Connecticut ou C-46), USA/Ark-99/72 (ATCC / VR-841) (Arkansas 99), USA/JMK/64, USA/SE-17/67 e o USA/lowa-

97/53 e dois europeus: NL/H-52/55 (holandês, usado no Brasil como vacina viva atenuada e/ou inativada) e o UK/6-82/82 (inglês)], sendo alguns empregados como vacinas vivas atenuadas (M-41, A-5968 / C-46, Ark-99, JMK e H-52) e/ou inativadas oleosas (idem atenuadas mais o UK/6-82 não atenuado) em programas autóctones de controle do VBIg nos países de origem (Binns *et al.*, 1986), e, 15 isolados brasileiros [(Tabela 3) BR/208/72, BR/G/75, BR/TII/75, BR/29/78, BR/200/81, BR/283/83, BR/290/83, BR/297/83, BR/319/83, BR/327/83, BR/351/84, BR/PM1/87, BR/PM2/87, BR/PM3/89, BR/PM4/89], previamente caracterizados como VBIg (Martins *et al.*, 1996; Resende *et al.*, 1989; Resende *et al.*, 1998). Dentre os VBIGs de referência importados, três (USA/M-41/41, USA/A-5968/51 / C-46, USA/Ark-99/72) tiveram autorização de importação oficial do Ministério da Agricultura e Abastecimento do Brasil (MAA) e, os outros quatro (USA/JMK/64, USA/SE-17/67, USA/lowa-97/53 e UK/6-82/82), foram adquiridos [não concentrados, volume total (500 mL) de uma mistura (*pool*) de líquidos alantóideos - LAs de OEG/SPF inoculados no laboratório de origem / VBIg] previamente inativados pelo calor (56°C / 15 min) devido ao fato de que este procedimento técnico não danifica o RNA do VBIg (Jackwood *et al.*, 1997). Estes quatro VBIGs de referência foram adquiridos inativados por não ter sido solicitada liberação de importação ao referido órgão oficial brasileiro (MAA). O VBIg UK/6-82 foi gentilmente cedido pela Dra. Jane K. A. Cook ao Professor Nelson Rodrigo da Silva Martins da Escola de Veterinária / UFMG. O VBIg NL/H-52/55, mantido liofilizado e lacrado na embalagem original da USDA / EUA, estava liberado para uso como vacina no Brasil e foi gentilmente cedido pelo Dr. Max Augusto Jorge da EPAMIG / EMBRAPA. Os isolados brasileiros foram obtidos a partir de surtos naturais da BIG em lotes da avicultura industrial (não vacinados contra o VBIg) no estado de Minas Gerais (Regiões Alto São Francisco e Metalúrgica), ocorridos no período entre 1972 e 1989. Dos isolados brasileiros, 13 ainda não foram tipificados por métodos convencionais (sorotipificação) e nenhum por métodos moleculares (genotipificação).

Os isolados BR/208/72 e BR/29-78/78 pertencem ao sorotipo Massachusetts (Epiphany, 1998) e foram estudados no tocante à patogenia comparada em pintos SPF e gnotobióticos (axênicos) (Resende *et al.*, 1989). O único procedente de plantel de poedeiras adultas (BR/208/72), gentilmente cedido pelo Professor Maurício Resende (Laboratório de Virologia Comparada do Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG), foi isolado a partir de surto no qual os lotes afetados apresentavam problemas respiratórios graves associados à queda de postura com concomitante postura de ovos anormais (alterações externas na casca: cor, formato e fragilidade, e/ou internas: clara liquefeita, etc.) mas sem mortalidade elevada. Dos outros 14 isolados, os quais foram isolados a partir de frangos de corte

(em todos os surtos, acima de 30 dias de idade) no Laboratório de Doenças das Aves do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva da Escola de Veterinária da UFMG, dez (BR/G/75, BR/TII/75, BR/29-78/78, BR/200/81, BR/290/83, BR/297/83, BR/PM1/87, BR/PM2/87, BR/PM3/89 e BR/PM4/89) são provenientes de plantéis apresentando doença respiratória grave associada à mortalidade elevada (achados macroscópicos à necropsia: traqueíte, pneumonia, aerossaculite, pericardite e perihepatite) e, quatro (BR/283/83, BR/319/83, BR/327/83 e BR/351/84), de plantéis que, além da doença respiratória, apresentavam diarreia, desidratação, mortalidade elevada e, à necropsia, comprometimento renal bilateral grave (síndrome nefrite - nefrose: hipertrofia renal e retenção uratos no parênquima renal).

Tabela 2 - VBIGs (estirpes) de referência usados como controles positivos.

VBIG ^a (ESTIRPE)	Sorotipo ^b	Número de passagens (OEG/SPF) ^c	Procedência ^d
USA/M-41/41	Massachusetts	8	ATCC (VR-21) / EUA ^e
USA/A-5968/51	Connecticut	10	ATCC (VR-817) / EUA
USA/JMK/64	JMK	15	Spafas / EUA ^f
USA/SE-17/67	SE-17	16	Spafas / EUA
USA/Ark-99/72	Arkansas 99	7	ATCC (VR-841) / EUA
UK/6-82/82	UK/6/82	5	Houghton / Ing ^g
USA/Iowa-97/53	Iowa-97	9	Spafas / EUA
NL/H-52/55 ^h	Massachusetts	53	USDA / EUA ⁱ

a - Identificação individual= País de origem (USA: United States of America - Estados Unidos da América - EUA; UK: United Kingdom - Reino Unido; NL: The Netherlands - Holanda ou Países Baixos) / sigla ou número do VBIG / ano do isolamento do VBIG e, também, na maioria dos casos, de ocorrência do surto correspondente (exceção: o USA/A-5968/51, também é denominado C-46, devido ao ano de ocorrência do surto - 1946, mas o ano de isolamento foi posterior. O mesmo parece ter ocorrido com o Iowa-97).

b - Denominação individual de sorotipo conforme Johnson & Marquardt (1975) e Kwon *et al.* (1993a,b). Outrora, os VBIGs JMK e SE-17 foram classificados como pertencentes aos sorotipos Delaware e Georgia, respectivamente (Hopkins, 1974).

c - Número total de passagens em ovos embrionados de galinha (OEG) isentos de patógenos especificados (SPF): somatória das realizadas nos laboratórios do país de origem (procedência) e do Setor de Doenças das Aves do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva da Escola de Veterinária da UFMG, incluindo a realizada para extração do RNA total, incluindo o viral.

d - Os VBIGs da Spafas (EUA) e de Houghton (Inglaterra) foram adquiridos previamente inativados pelo calor (56°C / 15 min).

e - ATCC= American Type Culture Collection, Rockville, MD, EUA.

f - Spafas, Norwich, CT, EUA.

g - AFRC, Institute for Animal Health, Houghton Laboratory, Houghton, Huntingdon, Cambridgeshire, Inglaterra (VBIG gentilmente cedido pela Dra. Jane K. A. Cook ao Professor Nelson Rodrigo da Silva Martins (Escola de Veterinária / UFMG).

h - VBIG "Holland", com 52 passagens consecutivas em OEG/SPF, usado como vacina viva atenuada e inativada em diversos países, inclusive no Brasil, e originalmente isolado, estudado e utilizado como vacina na Holanda. Foi gentilmente cedido pelo Dr. Max Augusto Jorge da EPAMIG / EMBRAPA.

i - USDA= United States Department of Agriculture (Departamento de Agricultura, EUA).

Tabela 3 - Isolados do VBIG a partir de surtos clínicos da BIG na avicultura industrial do estado de Minas Gerais (Regiões Alto São Francisco e Metalúrgica) no período entre 1972 e 1989.

Identificação do Isolado ^a	Número de passagens (OEG/SPF) ^b	Tipo de criação ^c	Sinais principais no surto de origem ^d
BR/208/72	6	P	R + QP + POA
BR/TII/75	6	FC	R
BR/G/75	8	FC	R
BR/29-78/78	6	FC	R
BR/200/81	4	FC	R
BR/283/83	3	FC	R + SNN
BR/290/83	3	FC	R
BR/297/83	3	FC	R
BR/319/83	4	FC	R + SNN
BR/327/83	3	FC	R + SNN
BR/351/84	4	FC	R + SNN
BR/PM1/87	4	FC	R
BR/PM2/87	3	FC	R
BR/PM3/89	3	FC	R
BR/PM4/89	3	FC	R

a - Identificação individual ⇒ Brasil / sigla ou número do isolado / ano do isolamento e, também, de ocorrência do surto correspondente. O BR/208/72 foi isolado pelo Professor Maurício Resende no Laboratório de Virologia Comparada do Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG. Os outros 14 foram isolados no Laboratório do Setor de Doenças das Aves do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva da Escola de Veterinária da UFMG, sendo três (BR/TII/75, BR/G/75 e BR/29-78/78) pelo Professor Regino Leonardo de Oliveira e os outros 11 pelo Professor José Sérgio de Resende. Todos os isolados foram provenientes de lotes da avicultura industrial sem histórico de vacinação contra o VBIG.

b - Número de passagens em ovos embrionados de galinha (OEG) isentos de patógenos especificados (SPF), incluindo a realizada para a extração do RNA total, incluindo o viral.

c - Tipo de ave ⇒ P= poedeira comercial leve; FC= frango de corte.

d - Sinais clínicos principais no surto de origem ⇒ R= doença respiratória; QP= queda de postura; POA= postura de ovos anormais (interna / externamente); SNN= síndrome nefrite - nefrose (desidratação + diarreia).

3.2. ISOLAMENTO DOS VBIGs BRASILEIROS

Nos surtos inicialmente suspeitos e posteriormente confirmados como sendo de BIG, os procedimentos foram conduzidos de acordo com protocolos estabelecidos para o isolamento de VBIG (Gelb, 1989; Lukert, 1975; Villegas, 1985). Nos casos onde ocorreram problemas respiratórios, associados ou não a problemas reprodutivos, foram coletados traquéias, pulmões e sacos aéreos torácicos e abdominais de várias aves doentes do plantel para processamento (necropsia em grupo), enquanto naqueles com síndrome nefrite - nefrose, independentemente se estavam associados a problemas respiratórios, somente os rins de várias aves foram utilizados. No laboratório, os materiais coletados ou foram estocados diretamente

em freezer de ultrabaixa temperatura (-80°C, Revco, EUA) ou foram mantidos refrigerados (4°C - máximo 24 h) para posterior processamento. Dentro de ambiente controlado [capela equipada com cabine de fluxo laminar (mod. FLV - classe II, Trox, Brasil)], foram homogeneizados (usando gral e pistilo com areia, autoclavados) o mais rapidamente possível em uma suspensão (20% - P/V) com salina fosfatada tamponada (PBS pH 7,2) previamente autoclavada e resfriada (4°C). Após centrifugação (3.000 xg / 4°C / 10 min - centrífuga refrigerada, mod. RC5B, rotor GSA, Sorvall DuPont, EUA), o sobrenadante foi coletado, tratado com solução estéril de PBS (pH 7,2) contendo antibióticos [Dose final / OEG/SPF: penicilina G potássica (2.500 UI) + sulfato de estreptomicina (2,5 mg) + sulfato de gentamicina (0,05 mg),

diluídos em PBS (pH 7,2) previamente autoclavado e, a mistura final, filtrada (Swinnex 0,22 μm , Millipore, EUA)] e inoculado (seringa graduada 1 mL equipada com agulha 25 x 7, estéreis e descartáveis, dose / ovo: 250 μL) na cavidade alantóidea de 50 OEG/SPF [(Spafas / Rezende, Brasil) (SPF = Specific Pathogen Free = livres de patógenos especificados)] com dez dias de incubação a 37°C (Incubadora automática eletrônica Petersime / Rooster, mod. Labo 9 e mod. Labo 13, Brasil). Rapidamente foram reincubados e, após três dias (72 horas após inoculação), 30 a 40 OEG/SPF, cujos embriões permaneciam vivos, foram resfriados em geladeira [(4°C) durante 16 horas para morte embrionária, procedimento que facilita obtenção de líquidos alantóideos (LAs) claros]. Os LAs dos OEG/SPF resfriados foram colhidos assepticamente (dentro de cabine de fluxo laminar vertical, mod. FLV - classe II, Trox, Brasil, após desinfecção prévia da casca com álcool iodado 5% e usando seringas, agulhas, tesouras, pinças e vidraria autoclavados), testados individualmente quanto à presença direta (espontânea) de atividade hemaglutinante (100 μL de LA + 100 μL de suspensão 5% de hemácias de galinha adulta em PBS pH 7,2), propriedade que o VBIG naturalmente não possui, agrupados (*pool* de LAs) e estocados a -80°C (Freezer Revco, E.U.A) até a próxima passagem em OEG/SPF (quando dos isolamentos virais, pelo menos cinco passagens consecutivas em OEG/SPF foram realizadas antes de serem considerados negativos). Os OEG/SPF restantes com embriões vivos foram mantidos na incubadora por mais cinco dias (18 dias de incubação total ou oito dias após inoculação) quando foram abertos para observação das lesões típicas nos embriões causadas pelo VBIG (nanismo, enrolamento e presença de uratos nos mesonefros). Antes de serem considerados VBIG, cada isolado individual foi submetido a outras provas de confirmação comprobatórias padrões: sensibilidade ao éter - clorofórmio, ausência de atividade hemaglutinante direta (espontânea) frente a uma suspensão (5%) de hemácias de galinha, testes de vírusneutralização com soros imunes de referência anti - vírus da doença de

Newcastle e adenovírus tipo 1 (Lukert, 1975; Villegas, 1985; Gelb, 1989), e, mais recentemente, em estudos utilizando técnicas de ELISA com anticorpos monoclonais (Martins *et al.*, 1996; Souza, 1999; Souza, 2000) e RT-PCR (Abreu, 2000; Resende *et al.*, 1998; Santiago *et al.*, 2000). O BR/208/72 foi isolado pelo Professor Maurício Resende no Laboratório de Virologia Comparada do Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG e os outros 14 foram isolados no Laboratório do Setor de Doenças das Aves do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva da Escola de Veterinária da UFMG (três BR/TII/75, BR/G/75 e BR/29-78/78 foram isolados pelo Professor Regino Leonardo de Oliveira e, os outros 11, pelo Professor José Sérgio de Resende). Desde a época do isolamento, todos os isolados brasileiros do VBIG foram mantidos em nitrogênio líquido [(-196°C) botijão criogênico, Cryometal, mod. SM-33, SP, Brasil] em pequenas alíquotas (criotubos de 2 mL, Nunc, Dinamarca), o que também foi realizado com os VBIGs de referência importados (vivos ou inativados pelo calor - vide item 3.1), sendo denominados *vírus - semente*. A conservação do VBIG (isolados suspeitos de serem VBIGs e/ou de VBIGs de referência) em nitrogênio líquido é altamente recomendável porque dispensa passagens seriadas e freqüentes no sistema ideal de replicação deste vírus (OEG/SPF) durante sua estocagem e manutenção. Tudo isto porque o VBIG é hipervariável e passagens seriadas são geralmente acompanhadas de alterações irreversíveis nas suas propriedades biológicas mais importantes (antigenicidade e patogenicidade) (Cavanagh & Naqi, 1997).

3.3. REPLICAÇÃO VIRAL

Cada VBIG (referência ou isolado) foi inoculado em 50 OEG/SPF para obtenção de uma mistura individual (*pool* de LAs), sendo utilizado um intervalo de trabalho (entre a inoculação e a coleta do líquido alantóideo - LAs dos OEG/SPF) mínimo de uma semana (entre cada isolado ou VBIG trabalhado), aliado aos procedimentos padrões (lavagem, preparo e desinfecção

rigorosa de materiais e ambiente), os quais visavam evitar contaminações entre VBIGs ou isolados. Resumidamente, o procedimento de inoculação iniciou com a diluição (1:1.000) do vírus-semente em PBS (pH 7,2) previamente autoclavado, o qual permaneceu em banho de gelo até o momento da inoculação (100 µL por OEG/SPF - via cavidade alantóideia). Os procedimentos posteriores, inclusive para confirmação da replicação do VBIG pelos OEG/SPF inoculados, foram similares aos descritos anteriormente (item 3.2). Ao *pool* de LAs obtido foi acrescido um inibidor de proteases [PMSF (1 mg / mL), *phenyl methyl sulfonyl fluoride*, isento de RNases/DNases, BRL, EUA - conforme Ignjatovic & Galli, 1994] para prevenir ruptura do VBIG e liberação prévia indesejável do seu RNA. Em seguida, a mistura (*pool* de LAs + PMSF) foi clarificada (5.000 xg / 60 min / 4°C - centrífuga refrigerada mod. RC5B, rotor GSA, Sorvall DuPont, EUA) para obtenção de um sobrenadante límpido livre de resíduos celulares e de outros componentes grosseiros provenientes dos OEG/SPF.

3.4. CONCENTRAÇÃO DA MISTURA DE LÍQUIDOS ALANTÓIDEOS (LAs)

Diferentemente da metodologia descrita por Lin *et al.* (1991a) e base deste trabalho, no qual foram utilizadas ultracentrifugações (40.000 xg / 120 min / 4°C), primeiramente com colchão e posteriormente com gradiente de sacarose, para concentração e purificação do VBIG, neste trabalho, cada VBIG (referência ou isolado, vivo ou inativado), na forma de um *pool* de LAs clarificado (item 3.3), foi colocado (200 mL) dentro de tubos de diálise (Spectrapor, mwco 12.000, Sigma, EUA) preparados de acordo com as recomendações do fabricante [previamente lavados externa / internamente com detergente neutro (Extran MA O2 - Merck), enxaguados diversas vezes em água de torneira, reenxaguados em água destilada e deionizada (dd) e fervidos (15 min) dentro de becker com água 18 MΩ não estéril]. Em seguida, foram submersos em uma solução concentrada (P/V ou 50% em PBS pH 7,2) de um polímero sintético (PVP-360,

polyvinylpyrrolidone, Sigma, EUA), previamente autoclavada e resfriada (24 - 48 h / 4°C). A massa úmida concentrada (desidratada) foi ressuspensa com água ultrapura (18 MΩ) livre de RNases/DNases [(MilliQ, Millipore, EUA) tratada com 0,1% de DEPC (*diethylpyrocarbonate*, Sigma, EUA) e, posteriormente, autoclavada para eliminação do DEPC (Wang & Tsai, 1996)], na proporção de 1:100 do volume do *pool* de LAs original clarificado, sendo estocada em nitrogênio líquido (duas alíquotas 1mL cada / VBIG ou isolado) até o momento da extração do RNA total, incluindo o viral. Esta massa liquefeita densa foi chamada de *vírus-trabalho*. A título de comprovação da concentração do VBIG com a metodologia empregada, o VBIG de referência M-41 foi titulado em OEG/SPF (Lukert, 1975; Villegas, 1985), antes e após a concentração, e os títulos encontrados foram 10^{5,6} doses infectantes (50%) para o embrião de OEG/SPF (DIE₅₀) / 0,1 mL e 10^{8,8} DIE₅₀ / 0,1 mL, respectivamente. Os outros não foram titulados.

3.5. CONTROLES NEGATIVOS (ESPECIFICIDADE E SISTEMA DE PRODUÇÃO)

Como controle negativo de especificidade, foi utilizada a estirpe La Sota do vírus da doença de Newcastle (VDN - Spafas, EUA), a qual possui genoma RNA, pertence à Família *Paramyxoviridae*, Subfamília *Paramyxovirinae* e Gênero *Avulavirus*, é replicada otimamente em OEG/SPF (tanto quanto o VBIG), sendo utilizada como vacina (viva ou inativada) contra esta doença no Brasil e em diversos países. As técnicas de replicação e concentração foram idênticas às feitas com os VBIGs (itens 4.2, 4.3 e 4.4).

Como controle negativo de sistema de produção, foi utilizado um *pool* de LAs de OEG/SPF não inoculados, obtido e processado como para os VBIGs e o VDN.

3.6. PROCEDIMENTOS DE BIOSSEGURANÇA LABORATORIAL

3.6.1. CONSUMO

De acordo com as recomendações para trabalhos com RNA e DNA (Newton, 1995; Powell, 1995; Promega, 1998; Sambrook *et al.*, 1989), todos os reagentes utilizados nas diversas fases experimentais deste trabalho foram de qualidade ultrapura e desenvolvidos para biologia molecular pelos laboratórios fabricantes, sendo, obrigatoriamente, isentos de RNases, DNases e proteases.

As soluções foram preparadas com água 18M Ω livre RNases/DNases [(18 MegaOhm, MilliQ, Millipore, EUA) tratada com DEPC (0,1% - Sigma, EUA) e, posteriormente, autoclavada (60 min / 121°C) para eliminação do DEPC (Wang & Tsai, 1996)]. Os materiais plásticos usados neste trabalho (ponteiros com barreira contra aerossol, microtubos de 1.500 e 500 μ L - tipo PCR, criotubos, etc.) foram novos, estéreis, livres de RNases/DNases e descartáveis, obtidos de laboratórios conceituados e especializados no fornecimento de materiais para biologia molecular. Luvas novas, descartáveis e isentas de pó (Safeskin Hypoclean, EUA), foram usadas em todas as fases de manipulação deste material, além de máscaras e aventais lavados. Na lavagem de aventais, visando destruir *amplicons* residuais, além do tradicional sabão em pó, utilizou-se água sanitária comercial (solução alvejante de hipoclorito de sódio) em um molho pré-lavagem (a troca de avental foi diária).

Antes do início dos experimentos, cerca de 200 mL de água 18M Ω livre RNases/DNases (tratada com DEPC) destinada ao preparo de soluções de extração de RNA, diluição dos oligos (estoque e uso), transcrição reversa (RT), PCR e RFLP, foi alíquotada (1.000 μ L / alíquota em microtubos 1.500 μ L, estéreis, livres de RNases/DNases), dentro de cabine de fluxo laminar (onde nunca se trabalhou com material amplificado por RT-PCR) e congelada em freezer. Após o uso, o

microtubo que continha água 18M Ω era descartado por ser considerado contaminado.

3.6.2. VIDRARIA

Toda a vidraria reutilizável (cor âmbar, normalmente, e utilizada com soluções tampões estoques concentradas mantidas à temperatura ambiente, além de provetas, etc.) foi submetida a um sistema de lavagem especial, consistindo de: um primeiro tratamento com um produto comercial removedor de RNases (RNaseAWAY, BRL, ou RNaseZAP, Sigma, EUA), dez enxágües subseqüentes com água destilada e deionizada (dd) convencional e um último enxágue com água 18M Ω não estéril, seguidos de secagem (100°C), resfriamento natural, embalagem (papel alumínio), esterilização a seco [(5 h / 150-200°C), forno de secagem e esterilização a seco, Fanem, Brasil] visando destruir RNases/DNases residuais, resfriamento natural, embalagem complementar em filme de PVC sem remoção do papel alumínio e estocagem em ambiente livre de pó. Luvas novas, descartáveis e isentas de pó, foram usadas em todas as fases de preparo da vidraria.

3.6.3. BIOSSEGURANÇA LABORATORIAL

Para a biossegurança laboratorial (e, por conseqüência, ambiental e pessoal) adotada neste trabalho, foi feito um levantamento prévio de todas as possíveis situações que poderiam acontecer e, durante a montagem (sempre prévia) dos protocolos de execução técnica, passo a passo, foram discutidas, previamente, com toda a equipe envolvida. Algumas destas situações previstas (tanto com base nas informações descritas na literatura disponível como na eventual experiência da equipe em uma tarefa específica, além daquelas que acompanham os produtos tóxicos) aconteceram e foram resolvidas adequadamente. Outra precaução adotada importante foi, quando possível, a realização de pré-experimentos, mesmo em escala reduzida, para que as situações de risco ou emergenciais e comportamentais,

fossem enfrentadas de forma adequada e pertinente. Neste trabalho (composto de diversas etapas seqüenciais de desenvolvimento experimental), cada uma das diversas etapas foi realizada de forma gradual, sem a pressa que tanto prejudica os trabalhos científicos, repetindo o que fosse necessário e possível, para não prejudicar os resultados finais.

Nas etapas iniciais envolvendo replicação e concentração virais (itens 3.3 e 3.4, respectivamente), os materiais contaminados resultantes daqueles procedimentos foram desinfetados de acordo com a natureza do material. Os reutilizáveis (vidraria em geral, seringas, agulhas, pinças e tesouras de aço inoxidável) foram imersos em solução aquosa (água dd) com 10% formol comercial (24 h / temperatura ambiente - TA) dentro de balde plástico (com tampa de pressão manual) para posterior lavagem e preparo do material. Os resíduos biológicos (OEG/SPF inoculados ou não - após coleta dos LAs) e utensílios descartáveis (membranas de diálise, luvas, máscaras, papéis toalha e de forração) foram colocados dentro de balde plástico (com tampa de pressão manual) contendo solução desinfetante [água de torneira com 50% de formol comercial (72 h / TA) e, posteriormente, remetidos para forno crematório.

Nas etapas intermediárias e finais envolvendo as atividades relacionadas com biologia molecular (geralmente realizadas em bloco), dois laboratórios foram utilizados: um, denominado "Extra Lab" para atividades de extração de RNA e síntese de cDNA (transcrição reversa - RT e montagem da PCR) e outro, denominado "Biomol Lab", para "incubação da PCR" e eletroforese para análise de produtos da PCR e da restrição enzimática (RFLP), sendo, este último, considerado contaminado com *amplicons* (material amplificado - segmentos de DNA), os quais são praticamente indestrutíveis no ambiente laboratorial e muito contaminantes (Beisel, 1992; Binns, 1993; Newton, 1995; Pfeiffer *et al.*, 1995). Assim, após qualquer atividade no laboratório contaminado, nunca se retornou

ao outro no mesmo dia e, na maioria das vezes, nem naquela semana ou naquele mês. Apesar dos cuidados usuais (substituição sistemática de aventais, luvas descartáveis, muito papel toalha, forração de mesas e bancadas de trabalho), principalmente durante a realização de eletroforese com conseqüente manipulação dos géis para análise e documentação fotográfica, o risco de contaminação ambiental sempre foi grande. Por isto, soluções e quaisquer reagentes, mesmo destinados a PCR, não ficaram jamais neste laboratório. Nestes casos, o preparo das soluções e alíquotamento (para uso único ou gradativo) sempre foi realizado no laboratório livre de *amplicons* (Extra Lab) e o transporte (material acondicionado em estante plástica apropriada para microtubos) para o outro laboratório (Biomol Lab) foi realizado em banho de gelo. As micropipetas (Socorex, Wheaton, EUA e Pipetman, Gilson, França) sempre foram utilizadas com ponteiros descartáveis com barreira contra aerossol e as de um laboratório jamais foram para o outro, sob pena de por todo o experimento a perder, em termos de resultados confiáveis (outro grande problema quando do emprego destas técnicas).

Além da questão da contaminação do ambiente laboratorial com *amplicons*, foi dada atenção especial ao destino dos produtos tóxicos descartáveis, principalmente no tocante ao *Trizol LS* (item 3.7), altamente tóxico, e aos géis de eletroforese (agarose e poliacrilamida) e soluções contendo brometo de etídio [(EtBr) tóxico e mutagênico]. Tubos contendo *Trizol LS*, ponteiros usados, os géis, soluções contendo EtBr, papéis toalha (usados na limpeza de cubas de eletroforese e do transiluminador UV após o uso) e forração de mesas e bancadas, foram acondicionados em garrafas plásticas transparentes (aquelas de refrigerante 2 L), devidamente identificadas, e estão estocadas em sala de uso reservado até serem destinadas, provavelmente, a um forno crematório ou empresa (pública ou privada) especializada em tratamento e descarte de rejeitos químicos. Quando géis de poliacrilamida foram utilizados na

eletroforese (fase inicial da RFLP - item 3.9.2), além de luvas, utilizou-se máscara contra pó fino (3M, Brasil), objetivando evitar o contato e a inalação de acrilamida não polimerizada, neurotóxica e, após o uso, os géis foram acondicionados em garrafas plásticas, a exemplo dos tubos com *Trizol LS* (Abreu, 2000; Newton, 1995).

3.7. EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DO RNA TOTAL (INCLUINDO O VIRAL)

Para a extração e quantificação do RNA total incluindo o viral (RNAtiv), foi utilizado um processo rápido, sem a ultracentrifugação para peletização inicial do VBig utilizada por Lin *et al.* (1991a) e, também, sem os tratamentos posteriores com SDS (sulfato dodecil sódico) e proteinase K utilizados por Kwon *et al.* (1993a) visando a degradação protéica. Nesta fase, os VBIGs (*pool* de LAs de OEG/SPF inoculados com estirpes de referência e isolados - item 3.4), o VDN e *pool* de LAs de OEG/SPF não inoculados (item 3.5), foram processados em bloco (ao mesmo tempo) usando-se dois microtubos novos (1.500 µL, estéril, livre RNases/DNases, Eppendorf, Alemanha) por material (*vírus-trabalho* / controles) nas fases iniciais envolvendo maior volume de solução. Os VBIGs concentrados, denominados *vírus-trabalho*, e os controles negativos (VDN e *pool* de LAs de OEG/SPF não inoculados), foram retirados (um criotubo com 1 mL cada / *vírus-trabalho* e controles) do nitrogênio líquido (-196°C) e descongelados rapidamente em banho-maria (10 min / 37°C). Imediatamente, foram centrifugados para clarificação [(6.500 xg / 10 min / 4°C) (microcentrífuga Centrimicro mod. 212, rotor com adaptadores em ângulo fixo, instalada dentro de geladeira comum, Fanem, Brasil)] e deixados em repouso em banho de gelo. Foi utilizado um produto comercial denominado "*Trizol LS*" (BRL, EUA), uma solução monofásica composta de fenol e isotiocianato de guanidina (desenvolvida por Chomczynsky & Sacchi, 1987), e seguido o protocolo recomendado pelo fabricante (BRL, 1993b).

Resumidamente, à temperatura ambiente (TA) e em cima da bancada (forrada com

papel absorvente descartável), todos microtubos (previamente identificados com o nome do VBig ou número do isolado) receberam 750 µL de *Trizol LS*. Em seguida, adicionaram-se 250 µL do sobrenadante de cada VBig (concentrado e clarificado) aos microtubos correspondentes. Com a própria ponteira utilizada na aplicação individual, homogeneizou-se (dez vezes) e a mistura foi deixada em repouso (15 min / TA), sem apertar a tampa dos microtubos. Adicionaram-se 200 µL de clorofórmio (livre RNases/DNases, Sigma, EUA) à mistura de cada microtubo, homogeneizou-se manualmente, com vigor, durante 15 segundos e deixou-se em repouso (15 min / TA). Centrifugou-se (13.000 xg / 15 min / 4°C) e apareceu um sobrenadante incolor (fase aquosa) contendo o RNAtiv solubilizado. No fundo do microtubo ficou o clorofórmio e, no meio (vermelho), a fase orgânica (DNA e proteínas degradadas pelo *Trizol LS*). Transferiram-se 400 µL da fase aquosa superficial para dois novos microtubos (1.500 µL) [o restante (contendo *Trizol LS* + clorofórmio) foi descartado em local adequado - vide item 3.6.3 - relativo a biossegurança laboratorial], adicionaram-se 500 µL de isopropanol (livre RNases/DNases, Sigma, EUA), misturou-se delicadamente (inversão manual / dez vezes) e deixou-se em repouso (10 min / TA). O RNAtiv foi sedimentado por centrifugação (13.000 xg / 10 min / 4°C). Em seguida, removeu-se o sobrenadante, descartando-o. Adicionaram-se 1.000 µL de uma solução de etanol 75% [preparada com etanol (Sigma, EUA) e água 18MΩ, ambos livres RNases/DNases] e vortexou-se rapidamente. Logo após, centrifugou-se (6.500 xg / 5 min / 4°C) e removeu-se o etanol por derramamento, descartando-o. Os microtubos foram deixados (5 a 10 min / TA), abertos e deitados, dentro de uma cabine de fluxo laminar (mod. FLV - classe II, Trox, Brasil), observando continuamente para não deixar o *pellet* (gel semitransparente de difícil visualização) de RNAtiv secar. Adicionaram-se 50 µL de água 18MΩ (livre RNases/DNases) em cada um dos microtubos, aspirando e expelindo para deslocar e dissolver o *pellet*. As

misturas dos dois microtubos contendo RNAtiv do mesmo VBig / isolado foram agrupadas em um único microtubo novo (500 μL , tipo PCR, estéril, livre RNases/DNases, Eppendorf, Alemanha) e incubou-se em banho-maria (10 min / 60°C) para dissolução completa do *pellet*. Em seguida, homogeneizou-se (aspirando e expelindo) novamente a mistura e transferiram-se 20 μL para um microtubo novo (1.500 μL) contendo 1.000 μL de água 18M Ω (livre RNases/DNases) para determinação da concentração de RNAtiv por espectrofotometria (foram realizadas leituras comparativas em dois espectrofotômetros: Shimadzu, Japão e GeneQuant, Pharmacia, EUA), conforme recomendação de Jackwood *et al.* (1992) e Lin *et al.* (1991a). A mistura restante (80 μL) foi estocada em geladeira (máximo 16 horas) aguardando o resultado da espectrofotometria e posterior uso na reação de transcrição reversa (RT) ou síntese de cDNA (DNA complementar).

3.8. SÍNTESE DO cDNA (DNA COMPLEMENTAR) / TRANSCRIÇÃO REVERSA E REAÇÃO EM CADEIA PELA POLIMERASE (RT – PCR)

3.8.1. OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES (OLIGOS)

Os oligos utilizados neste trabalho são os mesmos descritos por Lin *et al.* (1991a) e foram desenhados com base na análise comparativa (alinhamento) das seqüências dos genes codificadores da glicoproteína S (S1 + S2) de quatro VBigS [dois norte-americanos (M-41 e M-42 / Beaudette), um inglês (UK/6-82) e um japonês (KB-8523)], publicadas na década de 80 (Binns *et al.*, 1985; Binns *et al.*, 1986; Sutou *et al.*, 1988). No gene S, a região escolhida, por ser razoavelmente conservada nestes quatro VBigS, está inserida na região codificadora da glicoproteína S2 (gpS2). Os oligos escolhidos flanqueiam um segmento de 400 pares de bases (pb) limitando a porção 198-598 pb na extremidade N-terminal deste gene (Lin *et al.*, 1991a).

Os nomes dos oligos, seqüências de bases e localização individual no gene codificador

da gpS2 do VBig foram BIGS21 [(fita "forward" +) 5' - TGG ATA AGC TCC AAA TTA ATT G - 3' na região 198-220 pb] e BIGS22 [(fita reversa ou complementar -) 5' - AGC AAA CCA TTA TAT TCA CGA G - 3' na região 576-598 pb], sendo ambos com 22 bases. Os oligos BIGS21 e BIGS22, denominados IBP1 e IBRP2 por Lin *et al.* (1991a), respectivamente, foram analisados [via INTERNET (seqüências disponíveis no endereço eletrônico do "National Institute of Health - NCBI": <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), conforme Altschul *et al.*, 1990], para busca de similaridade, com todas as seqüências depositadas no GenBank (Database: non-redundant PDB + GenBank + EMBL + DDBJ). O oligo BIGS22, por pertencer à fita complementar reversa (-), foi analisado em sua fita invertida (5' - C TCG TGA ATA TAA TGG TTT GCT - 3'). Os resultados da análise comparativa encontram-se no item 4.4.1. O cálculo da temperatura de anelamento / dissociação "Tm" (*melting temperature*) de cada oligo foi feito utilizando-se a fórmula simplificada [Tm = 2 (A + T) + 4 (G + C)] proposta por Ausubel *et al.* (1992), sendo de 58°C a "Tm" do BIGS21 e de 60°C a do BIGS22.

Os oligos foram sintetizados pela New England Biolabs (NEBiolabs, EUA) e fornecidos purificados (HPLC), liofilizados, concentrados (\cong 1 μM) e divididos em 12 criotubos (cada um com 5 OD / A260). A diluição foi realizada dentro de cabine de fluxo laminar (mod. FLV - Classe II, Trox, Brasil) com água 18M Ω (livre RNases/DNases) de forma a obter uma solução estoque de cada oligo com aproximadamente 100 μM (100 pmol / μL). A quantidade de água 18M Ω (livre RNases/DNases) utilizada foi baseada nos parâmetros fornecidos pelo fabricante para cada oligo (μg / OD, OD's e peso molecular). Em seguida, dentro dos próprios criotubos de origem, foram vortexados (5 s) e centrifugados rapidamente (6.500 xg / 1 min / 4°C), sendo mantidos na geladeira (24 h / 4°C) para dissolução completa dos oligos. Após este período, foram retiradas amostras (5 μL) de cada oligo e diluídas em 495 μL de água 18M Ω (livre RNases/DNases) para análise em

espectrofotometria (GeneQuant, Pharmacia, EUA) a 260 nm, para a determinação da concentração de DNA. A partir daí, com o resultado da espectrofotometria, as soluções estoques foram novamente diluídas e alíquotadas (50 μL). Para cada oligo, uma alíquota da solução estoque foi novamente diluída com água 18M Ω (livre RNases/DNases) de forma a obter soluções de uso com 10 μM e alíquotada em vários criotubos pequenos com quantidade suficiente para poucas RT-PCR, sempre descartando a sobra após uso. Para uso na RT, uma alíquota da solução de uso do oligo BIGS22 (10 μM) foi novamente diluída com água 18M Ω (livre RNases/DNases) para obtenção de solução de uso (2 μM) na RT. Tanto as soluções estoques quanto de uso ficaram estocadas em freezer comum em criotubos (200 μL , estéril, livre RNases/DNases, Nunc, Dinamarca) com tampa rosqueável e anel de vedação para impedir desidratação e conseqüente alteração da concentração durante estocagem. Esta fase foi realizada antes da extração do RNAtiv.

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

Nos estudos com vírus RNA, a transcrição reversa (RT) ou síntese do cDNA (DNA complementar fita simples) é obrigatória antes da realização da PCR (Lin *et al.*, 1991a,b). Após a extração do RNAtiv e sua dosagem por espectrofotometria (similar à utilizada para os oligos, porém nas absorvâncias A260, A280 e A320), foi realizada a RT tendo como orientação básica a metodologia descrita por Lin *et al.* (1991a), mas utilizando um *Kit* para esta finalidade específica (*Kit SuperScript II RT RNase H System*, BRL, USA) e seguindo o protocolo do fabricante (BRL, 1993a). Devido à grande variação nas concentrações ($\mu\text{g} / \text{mL}$) dos RNAtiv's individuais (VBIGs referência e isolados) e dos controles negativos (concentrações individuais estão apresentados no item 4.3), foi utilizada uma concentração também variável de RNAtiv na RT [concentração mínima de 0,14 μg (*pool* de LAs) e máxima

de 1,96 μg (M-41) por reação, após diluição]. Considerando que o protocolo do fabricante recomenda de 1 μg a 5 μg de RNAtiv por RT, seis misturas com altas concentrações de RNAtiv (M-41, H-52, 283, 327, PM1 e PM2), além do processamento normal, também foram diluídas (água 18M Ω livre RNases/DNases) e trabalhadas com concentrações mínimas (0,14 $\mu\text{g} / 10 \mu\text{L} / \text{RT}$) para comprovar a eficiência da metodologia utilizada frente a situações como a da baixa concentração de RNAtiv obtido no controle negativo (sistema de produção - *pool* de LAs de OEG/SPF não inoculados). Trabalhando dentro de cabine de fluxo laminar para não contaminar o RNAtiv, a fase inicial da RT consistiu na transferência de 10 μL da solução de RNAtiv de cada VBIG de referência / isolado / controle negativo [(80 μL) estocada em geladeira (item 3.7) durante a espectrofotometria] para um microtubo novo (500 μL , tipo PCR, estéril, livre RNases/DNases, Eppendorf, Alemanha) e, imediatamente, adicionou-se 2 μL da solução de uso preparada com oligo BIGS22 (reverso ou complementar) contendo 2 μM de concentração final. Com a própria ponteira, homogeneizou-se a mistura (dez vezes) e incubou-se (70 $^{\circ}\text{C} / 10$ min) para pareamento do oligo complementar. Em seguida, a mistura foi para banho de gelo. Para cada VBIG de referência, isolado e controle negativo, adicionaram-se 8 μL de uma mistura contendo os seguintes componentes que acompanham o *Kit*: 2 μL de tampão de PCR 10 X [200 mM Tris-HCl (pH 8,4) e 500 mM KCl], 2 μL de uma solução 25 mM de MgCl_2 , 1 μL de uma mistura de dNTP's (10 mM de cada deoxirribonucleosídeo trifosfatado: dATP, dTTP, dCTP e dGTP), 2 μL de uma solução de ditioneitol (DTT - 0,1 M), 1 μL de inibidor de RNases [RNasin, 40 U (unidades) / μL , Promega, EUA] e, no final, após a mistura ser vortexada (10 s) e centrifugada (6.500 $\times\text{g} / 5\text{min} / 4^{\circ}\text{C}$), adicionou-se 1 μL (200 U) de enzima *SuperScript II* (transcriptase reversa do vírus "Moloney" da leucemia murina), a qual foi modificada para remoção da atividade RNase H⁺ que degrada o RNA durante a transcrição reversa (BRL, 1993a). Dois

microtubos contendo 21 μL da mistura final foram preparados para cada VBIG / isolado e controles negativos. Após serem vortexadas (5 s) e centrifugadas rapidamente (6.500 xg / 1 min / 4°C), as misturas foram incubadas em aparelho termociclador também usado para PCR (PTC - 100, MJ Research, EUA), nas seguintes condições: 42°C / 90 minutos para RT seguidos de aquecimento (70°C / 15 min para inativação da enzima e paralisação da reação), resfriamento rápido (25°C / 5 min), remoção do aparelho e imersão em banho de gelo. Mantendo-as resfriadas, foi adicionado 1 μL de enzima RNase H⁺ (vem no *Kit*) em cada mistura após a RT visando eliminar o RNA residual não transcrito em cDNA, o qual, se presente na solução de cDNA, poderia interferir negativamente na amplificação (PCR). Estas misturas foram vortexadas, centrifugadas rapidamente (idem passos anteriores) e incubadas (37°C / 20 min). Os cDNAs dos VBIGs controles positivos (referência), isolados brasileiros e controles negativos (VDN e *pool* de LAs de OEG/SPF não inoculados), foram mantidos em freezer (-18°C a -25°C) até a realização da amplificação do segmento de interesse (PCR) do gene S2.

3.8.3. AMPLIFICAÇÃO DO cDNA OU REAÇÃO EM CADEIA PELA POLIMERASE (PCR)

A PCR foi realizada com os cDNAs previamente preparados (item 3.8.2) a partir dos VBIGs (referência / isolados) e controles negativos (VDN e *pool* de LAs de OEG/SPF não inoculados).

Na primeira etapa de realização da PCR, foi usada a metodologia descrita por Lin *et al.* (1991a) [realizada em um volume total de 50 μL de uma mistura contendo 10 mM Tris-HCl (pH 8,3); 1,5 mM MgCl₂; 50 mM KCl; 30 ng de cada oligo; 0,5 mM de cada dNTP; 3 μL de cDNA e 2,5 U de *Taq* DNA polimerase. O programa utilizado consistiu de: 20 ciclos, sendo cada ciclo de 1 min a 92°C para desnaturação térmica da fita dupla de DNA, 2 min a 52°C para anelamento dos oligos e 3 min a 72°C para

extensão de cadeia], variando apenas a procedência dos reagentes e equipamentos (naquele trabalho a maioria era de origem japonesa e, neste, norte-americana). Os resultados encontrados na primeira etapa mostraram que algumas modificações precisavam ser feitas ou otimizadas na metodologia original descrita por Lin *et al.* (1991a) [a banda esperada (segmento de DNA) de aproximadamente 400 pb única e forte foi obtida nos VBIGs / isolados M-41, Ark-99, UK/6-82, H-52, 208, 29-78, 319, 327, PM1, PM2 e PM4, foi única e fraca nos VBIGs / isolados A-5968 / C-46, JMK, SE-17, Iowa-97, PM3 e 200, e, nos isolados 283, 290, 297, 351, G, TII e nos controles negativos (VDN - La Sota e LAs) não houve amplificação ou nenhuma banda foi detectada].

Na segunda etapa, tecnicamente denominada "etapa de otimização da PCR", foram testados vários parâmetros: variação na concentração final do MgCl₂ na mistura em reação (de 1 a 3 mM); variação no número de ciclos (25 a 40); variação nos tempos de duração das três fases internas de cada ciclo (desnaturação da fita de DNA → anelamento dos oligos → extensão de cadeia); variação na temperatura de anelamento (48, 50, 54, 55, 56 e 58°C) e, inclusão de um ciclo inicial de desnaturação (92°C / 3 min) e outro final para extensão de cadeia (72°C / 10 min). Além disso, foram testados um *Kit* comercial de reagentes básicos para PCR (*PCR Reagent System*, BRL ou Promega, EUA), o qual não é "um *kit* específico para o VBIG", e enzimas *Taq* DNA polimerase de diferentes fabricantes (BRL, Promega, Pharmacia, Sigma, NEBiolabs - EUA), quantidade de cDNA ideal (0,5 a 2 μL), além de reamplificações a partir de materiais pobremente e/ou adequadamente amplificados e não do cDNA (Powell, 1995).

O estabelecimento das condições ideais de amplificação [aparecimento de banda forte única específica esperada de 400 pb em todos VBIGs estudados (referência / controles positivos e isolados) e ausência de quaisquer bandas nos controles negativos (VDN e *pool* de LAs de OEG/SPF não inoculados)] foi obtido utilizando uma

metodologia “híbrida” entre as recomendações do *Kit* comercial de reagentes básicos para PCR (PCR Reagent System, BRL, EUA) e de Lin *et al.* (1991a), sendo denominada fase final da otimização. Para cada cDNA individual (VBIG / isolado), a PCR foi realizada dentro de um microtubo novo (500 μ L, tipo PCR, estéril, livre RNases/DNases, Eppendorf, Alemanha) em um volume total de 50 μ L contendo 5 μ L de tampão de PCR 10 X [(sem $MgCl_2$ e com Triton) - 50 mM Tris-HCl (pH 8,0) + 100 mM de NaCl, + 0,1 mM EDTA + 1 mM DTT + 50% glicerol + 1% Triton X-100 (Promega, EUA)]; 4 μ L de uma solução de $MgCl_2$ (25mM) (Promega, EUA); 1 μ L de uma mistura de dNTP's (com 10mM de cada um dos dATP, dTTP, dCTP e dGTP) (BRL ou Promega, EUA); 1 μ L de cada oligo (10 μ M) (NEBiolabs, EUA); 2 μ L de cDNA; 0,5 μ L (2,5 U) de *Taq* DNA polimerase (Promega, EUA) e 35,5 μ L de água 18M Ω (estéril e livre de RNases/DNases). Em seguida, a mistura foi homogeneizada rapidamente (ponteira com barreira contra aerossol) e coberta com duas gotas (30-40 μ L) de óleo mineral (livre RNases/DNases, BRL ou Sigma, EUA). Os microtubos com as misturas preparadas foram colocados em um aparelho termociclador automático (PTC-100, MJ Research, EUA) utilizando o seguinte programa de PCR: um ciclo inicial de 94°C / 3 min, seguidos de 40 ciclos repetitivos de 92°C / 45 s, 52°C / 30 s e 72°C / 1 min e 30 s, uma etapa final a 72°C / 10 min, e resfriamento rápido a 25°C / 10 min. Os microtubos (dois / VBIG ou isolado, 50 μ L cada) com material supostamente amplificado foram mantidos em freezer até a eletroforese em gel de agarose 2-3,5% e análise sobre luz ultravioleta (UV) após coloração com brometo de etídio (EtBr). Nesta última ou terceira etapa da PCR, cDNAs de todos os VBIGs (referência / isolados) foram novamente amplificados visando a obtenção de volume necessário (oito microtubos 50 μ L cada / VBIG ou isolado) para uso na RFLP (análise dos produtos obtidos na restrição enzimática). Os microtubos contendo as misturas com materiais supostamente amplificados foram estocados congelados (-20°C) até

confirmação da amplificação adequada e uso na restrição enzimática.

3.9. ANÁLISE DOS PRODUTOS DA RT - PCR E POR RESTRIÇÃO ENZIMÁTICA (RFLP)

3.9.1. ELETROFORESE

Na primeira etapa da amplificação (item 3.8.3), 8 μ L do material (supostamente amplificado de cada VBIG / isolado, após a RT-PCR) foram misturados com 2 μ L de tampão corante de amostra [conforme Sambrook *et al.*, 1989, foi preparado com 15% de Ficoll 400; 0,03% de azul de bromofenol; e 0,03% de xileno-cianol FF, diluídos em tampão de corrida TBE 1X (100 mM de Tris-base; 2 mM de solução 0,5 M de EDTA; e 50 mM de ácido bórico anidro em água 18M Ω) (tudo livre RNases/DNases, BRL ou Sigma, EUA)] e submetidos à eletroforese em géis de agarose 2, 3 e 3,5% (4 mm espessura, corrida a 60 V / 1 h / TA com tampão de corrida TBE 1X, em aparelho de eletroforese Horizon 8•10, BRL, EUA). Após a corrida, os géis foram corados com EtBr (0,5 μ g / mL em água 18M Ω) durante 15 min, analisados visualmente quanto à presença de bandas de DNA amplificado em aparelho transiluminador UV (302 nm, Macrovue, Hoefer / Pharmacia, EUA) e simultaneamente fotografados com câmera especial (GelCam, equipada com filme Polaroid 667 e filtro laranja nº 15, Polaroid / Pharmacia, EUA).

Na Segunda etapa da amplificação (item 3.8.3), além dos géis de agarose idênticos aos da primeira etapa, foram utilizados géis de poliacrilamida 6% na eletroforese [PAGE (*polyacrylamide gel electrophoresis*) convencional e, também, desnaturante com uréia, conforme Sambrook *et al.*, 1989; 0,7 mm espessura, corrida a 40 V / 4 h / TA, em aparelho de eletroforese duplo vertical minigel 10 x 8 cm, Sigma e/ou Pharmacia, EUA] e corados pela prata (conforme Herring *et al.*, 1982) para visualização dos produtos da RT-PCR (fase de otimização).

Na terceira e última etapa da amplificação, preferencialmente, foram utilizados géis de

agarose 3,5% como na primeira etapa, porque deram boa resolução nas etapas anteriores e são de fácil confecção, além serem atóxicos (exceto quando estavam corados pelo EtBr - mutagênico - Newton, 1995).

3.9.2. RESTRIÇÃO ENZIMÁTICA E ANÁLISE POR RFLP

A análise do perfil de restrição enzimática (RFLP - *Restriction Fragment Length Polymorphism*) dos produtos amplificados (obtidos na RT-PCR) frente às enzimas de restrição *Bst*YI, *Dde*I, *Hae*III, *Hin*DI, *Hin*FI, *Hpa*II, *Mae*III, *Sca*I e *Pst*I, sendo a *Mae*III adquirida da Boehringer Mannheim (Alemanha) e, as outras, da NEBiolabs (EUA), foi realizada com base na metodologia descrita por Lin *et al.* (1991a). Antes do uso, todas as enzimas foram testadas quanto à atividade pela restrição enzimática de 1 µg de DNA [λ DNA (bacteriófago Lambda, Sigma, EUA) e pUC19 (DNA plasmidial que confere resistência à ampicilina em *Escherichia coli*, NEBiolabs, EUA)] em condições ótimas de atividade [tampões adequados (acompanham as enzimas) e temperatura ideal de incubação: 55°C / 4 h (*Mae*III), 60°C / 4 h (*Bst*YI) e 37°C / 4 h para as outras]. As enzimas de restrição foram diluídas nos respectivos tampões, seguindo as recomendações dos fabricantes, adicionando-se 5 U de enzima a 20 µL de cada produto amplificado na RT-PCR, em um volume final de 25 µL em reação [obtido pela adição de água 18M Ω (livre RNases / DNases)].

Diferentemente de Lin *et al.* (1991a), os produtos amplificados (RT-PCR) destinados à análise por RFLP não foram trabalhados para purificação do segmento amplificado (purificação do DNA ou *amplicon* a partir do produto amplificado pelo tratamento com solução 4M de acetato de amônio e precipitação com isopropanol) e, também, não foram amplificados com oligos marcados com isótopos radioativos na extremidades 5' (fita + ou -).

As misturas (produto amplificado + enzimas) foram incubadas na temperatura de maior atividade de cada enzima. Para avaliação da restrição enzimática, as misturas foram, inicialmente, submetidas à eletroforese em géis de poliacrilamida 6% (PAGE), coradas pela prata como no item 3.9.1 (Herring *et al.*, 1982) e fotografadas sobre transiluminador de luz visível convencional [câmera fotográfica Olympus OM-2, Japão, equipada com lente macro, filtro vermelho e filme (P&B) Panatomic-X Kodak ASA 32 ou Plus-X-Pan Fuji ASA 125]. Posteriormente, devido à praticidade, todas as misturas foram submetidas à eletroforese em géis de agarose 3,5% [aparelhos de eletroforese com géis e tempos de corrida maiores - *Horizon 11•14* (TBE 1X / 75V / 2 h / TA) e *Horizon 20•25* (TBE 1X / 100 V / 4 h / TA), ambos da BRL, EUA)], analisadas e fotografadas conforme descrito na primeira etapa da eletroforese (item 3.9.1). Além da análise visual dos resultados documentados em fotografias, foi usado um programa de computador (*Software Seqaid* - DNAfrag, versão 3,03 - Schaffer & Sederoff, 1981) para se calcular o peso molecular de cada banda presente nos géis de agarose 3,5%.

3.10. RFLP COMPARADA COM DADOS OBTIDOS NA ANÁLISE DAS SEQÜÊNCIAS DO GENE S2 DISPONÍVEIS NO GENBANK E DOS RESULTADOS DE Lin *et al.* (1991a)

As seqüências (parte de interesse flanqueada pelos oligos BIGS21 e BIGS22 - segmento de DNA com 400 pb - oligos inclusos) no gene S2 dos 20 diferentes VBIGs disponíveis no GenBank [quatorze norte-americanos (M-41, M-42 / Beaudette, Ark-99, Ark-DPI, Ark-3168, Ark-3668-4, Ark-4257, C-46 / A-5968, CAV-1013, CU-T2, Fla-18288, GAV-92, JMK e SE-17), um inglês (UK/6-82), um belga (B-1648), um japonês (KB-8523) e três holandeses (D-207, D-274 e D-1466)] foram acessadas [via Internet (seqüências disponíveis no endereço eletrônico do "National Institute of Health - NCBI": <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)] e submetidas a um simulador de restrição enzimática [via Internet - WebGene (<http://darwin.bio.geneseo.edu/~yiu/webgene/RE.html>)] com as mesmas enzimas de restrição utilizadas neste estudo. Também,

embora não tenha sido possível obter os tamanhos dos fragmentos de DNA com as exatidões encontradas nas seqüências disponíveis no GenBank, foram utilizados os resultados obtidos na RFLP (mapa contendo sítios de restrição 5' → 3') do trabalho de Lin *et al.* (1991a) com sete VBIGs norte-americanos (M-41, M-42 / Beaudette, A-5968 / C-46, Holte, Gray, Iowa-97 e Iowa-609) e cinco japoneses (C-78, K-79, KH, Ishida e ON). Informações complementares adicionais importantes dos VBIGs, cujos genes S2 estão disponibilizados no GenBank e daqueles estudados por Lin *et al.* (1991a), foram colocadas na Tabela 4. Os dados obtidos na RFLP (levantamento das seqüências de interesse de VBIG disponíveis no GenBank e posterior análise por RFLP no simulador WebGene + informações sobre o mapa com sítios de restrição enzimática do trabalho de Lin *et al.*, 1991a) foram comparados com os resultados da RFLP deste trabalho (VBIGs de referência e isolados brasileiros), principalmente no tocante à presença e ausência de sítios de restrição, os quais foram denominados padrões de restrição enzimática neste trabalho (Tabela 7).

3.11. CONSTRUÇÃO DAS ÁRVORES FILOGENÉTICAS

Utilizando metodologia específica para este fim [*Software* para construção e desenho de árvores filogenéticas – “*TREECON for Windows*” - Van de Peer & De Wachter (1994) e atualizado em 1998, via Internet (<http://bioc-www.uia.ac.be/u/yvdp/treeconw.html>)], foi possível a construção (desenho) de duas árvores filogenéticas básicas: com (*rooted tree*) ou sem raiz (*unrooted tree*). Para isto, foram utilizados os resultados da RFLP dos VBIGs / isolados deste trabalho (Tabelas 6 e 10), idem para aqueles cujos genes S2 (parte flanqueada pelos oligos BIGS21 e BIGS22) estão disponíveis no GenBank (Tabela 8) e dos utilizados por Lin *et al.* (1991a) (Tabela 9). No caso de árvores com raiz, os VBIGs M-41 e H-52 foram escolhidos como parentais (raízes), separadamente (Figuras 15 e 16). Neste estudo, também foram testadas reduções nos números de enzimas de restrição

utilizadas na RFLP, quando da construção das árvores filogenéticas, visando simplificar a metodologia utilizada [por exemplo, redução de nove para cinco (*Bst*YI, *Ddel*, *Hpa*II, *Pst*I e *Scal* - Figuras 17 e 18), substituição de uma enzima (troca da *Bst*YI pela *Maell*III, mantendo cinco enzimas - Figuras 19 e 20) e redução para quatro enzimas (*Ddel*, *Hpa*II, *Pst*I e *Scal*, sem a *Bst*YI e a *Maell*III - Figuras 21 e 22)]. Árvores sem raiz, somente com os 15 isolados brasileiros, com nove e cinco enzimas de restrição utilizadas na RFLP deste trabalho, também foram construídas em duas formas de apresentação (formatos convencional retangular e circular) para um melhor entendimento da situação regional (Figuras 23, 24, 25 e 26). Outras situações foram estudadas, mas os resultados não foram aproveitados.

3.12. GENOTIPIFICAÇÃO

Visando a genotipificação dos 15 isolados brasileiros, duas árvores filogenéticas sem raiz com todos os 46 VBIGs foram construídas (com nove enzimas de restrição - Figura 27, e, com cinco enzimas de restrição - Figura 28) usando a mesma metodologia específica para este fim anteriormente descrita (item 3.11).

3.13. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Na construção das árvores filogenéticas com raiz (*rooted tree*), a estimativa da distância genética entre VBIGs foi calculada pelo método de Link *et al.* (1995) e a inferência de topologia das árvores foi realizada pelo método *Neighbor - Joining* (Saitou & Nei, 1987; Studier & Keppler, 1988). A análise *bootstrap*, aplicada após os cálculos anteriormente mencionados, confere intervalos de confiança nas filogenias, expressados conjuntamente às percentagens de distanciamentos genéticos (evolutivos) e, por isto, é uma análise estatística, considerando que verifica a confiabilidade das ramificações das árvores evolucionárias construídas (Swofford *et al.*, 1996).

Tabela 4 - Informações complementares adicionais* dos VBIGs de outros países utilizados na RFLP comparada e na construção de árvores filogenéticas.

VBIGs ^a (ESTIRPE)	Sorotipo ^b	Número de passagens (OEG/SPF) ^c	Tipo de criação ^d	Sinais clínicos principais no surto de origem ^e	Histórico de vacinação ^f
USA/M-41/41	Massachusetts	10	P	R + QP + POA	NV
USA/M-42/37 ^g	Massachusetts	>250	P (FR)	R	NV
USA/A-5968/51 (C-46)	Connecticut	ni	P	R	NV
USA/Iowa-609/52	Iowa-609	ni	P	R	NV
USA/Iowa-97/53	Iowa-97	ni	P	R	NV
USA/Holte/54	Holte	ni	P (FR)	R + SNN	V (M + C)
USA/Gray/60	Gray	ni	FC	R + SNN	V (M + C)
USA/JMK/64	JMK	ni	FC	R	V (M + C)
USA/SE-17/67	SE-17	ni	P	R + QP + POA	NV
USA/Ela-18288/70	Connecticut	ni	P	QP + POA	V (M + C)
USA/Ark-99/72	Arkansas 99	ni	FC	R	V (M + C)
USA/ Ark-DPI/81	Arkansas	40	FC	R	V (M + C + J)
USA/Ark-3168/81	Arkansas	ni	FC	R	V (M + C + J)
USA/Ark-3668-4/81	Arkansas	ni	FC	R	V (M + C + J)
USA/Ark-4257/81	Arkansas	ni	FC	R	V (M + C + J)
USA/GAV-92/?	GAV	ni	FC	R	V (M + C)
USA/CAV-1013/?	CAV	ni	FC	R	V (M + C)
USA/CU-T2/94	CU-T2	ni	P	R + QP + POA	V (M + A)
UK/6-82/82 ^h	UK/6/82	ni	FC	R	V (M)
J/KB-8523/83 ⁱ	Massachusetts	ni	P (FR)	R	NV
J/KH/60	Massachusetts	10	P	R	NV
J/K-79/79	C-78 / K-79	10	P	R	V (M)
J/C-78/78 ^j	C-78 / K-79	40	P	R	V (M)
J/Ishida/60 ^j	Massachusetts	40	FC	R	NV
J/ON/74 ^j	Gray	40	FC	R + SNN	NV
B/B-1648/86	B-1648	3	FC	R + SNN	V (M)
NL/H-52/55	Massachusetts	52	P	R + QP + POA	NV
NL/D-1466/78 ^k	D-1466	>27	FC	R	V (M)
NL/D-207/79 ^j	D-207	>110	P + FC	R	V (M)
NL/D-274/79 ^j	D-274	>50	P + FC	R	V (M)

a-Identificação individual⇒País de origem (USA=United States of America-EUA; UK=United Kingdom-Reino Unido; NL=The Netherlands-Holanda ou Países Baixos; B=Belgium-Bélgica; J=Japan-Japão)/sigla ou número do VBIG/ano do isolamento do VBIG e, também, na maioria dos casos, de ocorrência do surto correspondente (exceção: o USA/A-5968/51, também é denominado C-46, devido ao ano de ocorrência do surto-1946 de isolamento foi posterior. O mesmo parece ter ocorrido com o Iowa-609 e o Iowa-97). Regiões onde ocorreram os surtos com alguns VBIGs nos países de origem= **EUA**:M-42 ou Beaudette (North Dakota), Holte (Wisconsin), Gray e JMK (Delaware), SE-17 e GAV-92 (Geórgia-o "v" da GAV é de *variant*), CAV-1013 (Califórnia), CU-T2 (Nova York); **Holanda**: H-52, D-1466, D-207 e D-274 (Doorn); **Bélgica**: B-1648 (fronteira com a França); **Japão**:KB-8523 (Wakayama), e, os KH e K-79, de granjas próximas a Tóquio (os outros são vacinas); **b**-Denominação individual de sorotipo conforme Johnson & Marquardt (1975) e Kwon *et al.* (1993a,b); **c**-OEG/SPF⇒nº de passagens em ovos embrionados (OEG) de galinha isentos de patógenos especificados (SPF)-ni=não informada em nenhuma fonte consultada, inclusive nas informações complementares adicionais e/ou básicas para realização da RFLP no GenBank e em Lin *et al.* (1991a). **d**-Tipo de criação. P=poedeira adulta; P(FR)=poedeira em crescimento (fase de recria); FC=frango de corte. **e**-Sinais clínicos principais no surto de origem: R=doença respiratória; QP=queda de postura; POA=postura de ovos anormais; SNN=síndrome nefrite-nefrose (desidratação+diarreia); **f**-Histórico de vacinação nos lotes onde os VBIGs foram isolados. NV=não vacinado; V=vacinado previamente com um ou mais VBIG(s) vivo(s) atenuado(s) pertencente(s) ao(s) sorotipo(s) Massachusetts (M), Connecticut (C), Arkansas-99 (A) e/ou JMK (J). Nos VBIGs holandeses, quando era frango de corte, recebia só o VBIG vacinal atenuado H-120 (uma ou duas doses), e, quando era poedeira adulta, recebia primeiro o H-120 seguido do H-52 menos atenuado do que o outro (VBIGs atenuados vivos mas com diferentes graus de atenuação-ambos oriundos do VBIG "Holland" pertencente ao sorotipo Massachusetts); **g**-VBIG Beaudette (M-42)=devido à alta adaptação (alto número de passagens consecutivas->250) para OEG/SPF, não é mais patogênico para galinhas-é "vírus de laboratório"; **h**-VBIG isolado, a partir do surto de origem, em cultivo de anéis de traquéia de embrião de galinha SPF (CAT); **i**-VBIG adaptado a OEG/SPF e, posteriormente, clonado em cultivo celular primário de células renais de embrião de pinto SPF; **j**-VBIGs usados como vacinas vivas atenuadas no Japão; **k**-VBIG usado como vacina inativada oleosa na Holanda; **l**-VBIGs usados como vacinas vivas atenuadas e inativadas oleosas na Holanda.

*-Além do GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) e Lin *et al.* (1991a), as informações complementares adicionais foram obtidas nas seguintes referências bibliográficas: Avellaneda *et al.* (1994); Bijlenga (1956); Bins *et al.* (1986); Cavanagh *et al.* (1992); Cavanagh & Naqi (1997); Cook (1984); Davelaar *et al.* (1984); Doi *et al.* (1982); Fields (1973); Gelb *et al.* (1981); Gelb *et al.* (1983); Hoekstra & Rispens (1960); Hofstad (1958); Hofstad (1961); Hopkins (1969); Jia *et al.* (1995); Koch *et al.* (1990); Kusters *et al.* (1990); Meulemans *et al.* (1987); Sutou *et al.* (1988); Winterfield & Hitchner (1962); Winterfield *et al.* (1964); Winterfield *et al.* (1971); Zwaagstra *et al.* (1992).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. VBIGs DE REFERÊNCIA (IMPORTADOS) E OS ISOLADOS BRASILEIROS

A escolha dos isolados brasileiros, provenientes de surtos da BIG em granjas da avicultura industrial do estado de Minas Gerais e abrangendo duas décadas (período entre 1972 e 1989) desta importante atividade da pecuária nacional, visou atender a um antigo sonho no sentido de procurar entender melhor as situações que, hipoteticamente, estariam envolvidas em todo aquele processo saúde / doença. Assim, nada melhor do que estudar os isolados de VBIG que, seguramente, tiveram importante papel naqueles acontecimentos e têm muita história para contar, mas a linguagem informativa deles é diferente da humana e a idéia foi começar a interpretá-la com a metodologia molecular disponível atualmente para esta finalidade. Isto é uma das coisas importantes e positivas do futuro: poder resgatar o passado.

Os VBIGs de referência importados foram importantíssimos porque, além de ajudarem no controle das atividades de processamento do material nas diversas fases do desenvolvimento experimental, propiciaram sustentação científica ao trabalho realizado e, conseqüentemente, confiabilidade aos resultados encontrados. A utilização do banco de seqüências (GenBank) da parte de interesse do gene S2 dos VBIGs idênticos aos trabalhados (M-41, A-5968 / C-46, Ark-99, JMK, SE-17 e UK/6-82) foi de fundamental importância neste trabalho por aumentar o grau de confiabilidade, inclusive na metodologia utilizada (funcionaram como controles, praticamente, em todas as etapas experimentais). Dos VBIGs vacinais atenuados utilizados na avicultura industrial brasileira, os quais poderiam ter sido adquiridos no comércio ou diretamente nos laboratórios que os produzem, optou-se apenas pelo H-52 em razão do fato de ser um vírus - semente original procedente de uma fonte confiável (Departamento de Agricultura dos Estados Unidos da América - USDA/EUA). Os VBIGs vacinais,

principalmente quando são atenuados e, quase sempre, são intensamente manipulados nos laboratórios que os produzem, muitas vezes geram resultados diferentes dos esperados em função da seleção involuntária de mutantes e clones, situação que pode não interferir diretamente na eficiência vacinal mas seguramente prejudica a análise final em trabalhos com biologia molecular, conforme observado por outros autores (Dalton *et al.*, 1998; Kim *et al.*, 1998; Kusters *et al.*, 1989a,b; Kusters *et al.*, 1990; Song *et al.*, 1998; Stirrups *et al.*, 1998; Wang & Tsai, 1996). A metodologia utilizada permitiu detectar os VBIGs adquiridos com o propósito de serem referência (controles positivos) mas que, na verdade, estavam contaminados / trocados por outros, provavelmente no laboratório onde foram processados anteriormente (JMK, SE-17 e Iowa-97 – SPAFAS, EUA). Ao contrário do que pode parecer, esta situação aumentou ainda mais o grau de confiabilidade dos resultados encontrados por terem sido detectados tais problemas (contaminação entre VBIGs) no momento certo (RFLP comparada).

4.2. REPLICAÇÃO E CONCENTRAÇÃO VIRAL

Dentro da linha de pesquisa “Diagnóstico, epidemiologia e controle das doenças dos animais” do DMVP / EV / UFMG, os estudos já realizados pelo Grupo de Pesquisa em Saúde Avícola do Setor de Doenças das Aves, envolvendo alguns aspectos básicos e aplicados do VBIG, permitem afirmar que a metodologia utilizada (replicação e concentração viral objetivando a detecção deste vírus por RT-PCR) foi além da necessária para um teste desta natureza (bastariam poucos microlitros de LA - OEG/SPF contendo virions completos para que os resultados fossem os mesmos). A justificativa para a adoção de toda aquela metodologia laboriosa inicial deste trabalho foi que, até no momento de sua execução, o recomendado era concentrar o VBIG por ultracentrifugação em colchão ou gradiente de sacarose visando a purificação viral (Andreasen *et al.*, 1991; Jia *et al.*, 1995; Kwon *et al.*, 1993a,b; Lin *et al.*, 1991a; Sutou *et al.*, 1988; Zwaagstra *et al.*, 1992)

para extração do RNA viral puro, condição que era considerada vital para a realização de uma adequada RT-PCR livre de inibidores (Andreasen *et al.*, 1991; Lin *et al.*, 1991a). A decisão de realizar a concentração dos LAs de OEG/SPF contendo VBig por desidratação foi tomada mais pela praticidade, indisponibilidade de ultracentrífuga, intuição de que este obstáculo não poderia ser o principal entrave para um teste tão genial (jamais seria utilizado no diagnóstico rotineiro, caso dependesse de ultracentrífuga) do que pela confiabilidade prévia no sucesso da técnica. Felizmente, a escolha foi correta (Abreu, 2000; Resende *et al.*, 1998) e daria certo de qualquer jeito (uso direto do LA com VBig sem concentração ou, por exemplo, após concentração por precipitação com solução saturada de sulfato de amônio - ambas testadas e aprovadas, posteriormente, mas os resultados não são apresentados aqui), desde que a integridade viral fosse mantida até o momento da extração adequada do RNA viral, acompanhado de outros RNAs ou puro. Os passos posteriores, realmente, foram os mais importantes e exigiram maiores cuidados, principalmente aqueles previstos nos protocolos de execução, caso a caso.

4.3. EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DO RNA TOTAL (INCLUINDO O VIRAL)

O RNAtiv extraído com a metodologia utilizada neste trabalho permaneceu íntegro e o emprego do produto comercial denominado "Trizol LS" (BRL, EUA) foi de fundamental importância, principalmente por ser altamente eficiente e rápido (passo único), diferentemente das recomendações publicadas para extração de RNA de VBig até aquele momento (Andreasen *et al.*, 1991; Jackwood *et al.*, 1992; Kwon *et al.*, 1993a,b; Lin *et al.*, 1991a). A manipulação do RNAtiv, durante a realização da espectrofotometria para dosagem de sua concentração final e diluição para uso na RT, recomendada por Jackwood *et al.* (1992) e Lin *et al.* (1991a), foi importante mas, dentro da filosofia original da RT-PCR (rapidez, simplicidade e amplificação a partir de um único RNA transcrito em cDNA, teoricamente), pareceu um contra-senso

naquele momento. Ocorreu uma grande variação nas concentrações ($\mu\text{g} / \text{mL}$) dos RNAtiv_s individuais dos VBig_s / isolados [M-41 (196), A-5968 / C-46 (76), JMK (66), SE-17 (54), UK/6-82 (40), Ark-99 (64), H-52 (138), Iowa-97 (40), 208 (98), 29-78 (118), 283 (138), 290 (60), 297 (46), 319 (126), 327 (134), 351 (40), PM1 (140), PM2 (148), PM3 (80), PM4 (62), G (80), TII (66), 200 (138) e, também, dos controles negativos VDN - La Sota (40) e o *pool* de LAs (14) - a percentagem de pureza do RNA variou de 74 a 87% nos RNAtiv_s, inclusive nos controles negativos, conforme obtido com a utilização da metodologia descrita no item 3.7], o que era esperado com base nas informações da literatura consultada (Andreasen *et al.*, 1991; Jackwood *et al.*, 1992; Kwon *et al.*, 1993a,b; Lin *et al.*, 1991a). A implicação direta desta variabilidade natural nas concentrações dos RNAtiv foi a necessidade do uso de concentrações também variáveis dos RNAtiv individuais na RT [concentração mínima de 0,14 μg (*pool* de LAs) e máxima de 1,96 μg (M-41) por reação (20 μL), após diluição], sendo que o recomendado era o uso de 1 a 5 μg de RNAtiv por RT (BRL, 1993a; Lin *et al.*, 1991a). Os resultados posteriores (RT-PCR, após otimização) mostraram que esta variação não interferiu nos resultados esperados, a julgar pela amplificação normal dos cDNAs de dois VBig_s de referência (controles positivos - M-41 e H-52) e quatro isolados brasileiros (283, 327, PM1 e PM2) com altas concentrações de RNAtiv, os quais, paralelamente ao trabalho normal, foram diluídos (água 18M Ω livre RNases/DNases) e submetidos à RT nas concentrações mínimas trabalhadas (0,14 $\mu\text{g} / 10 \mu\text{L} / \text{RT}$), visando comprovar a eficiência da metodologia utilizada mesmo quando o total de RNAtiv estava muito abaixo do recomendado. Certamente, nem todo o RNAtiv pertencia ao VBig e, também, dificilmente estava 100% puro, além de nem todos estarem íntegros (degradação ocorre com relativa frequência durante a remoção da nucleoproteína N protetora do RNA) (Adzhar *et al.*, 1996; Newton, 1995; Resende *et al.*, 1998).

4.4. SÍNTESE DE cDNA (DNA COMPLEMENTAR) / TRANSCRIÇÃO REVERSA E REAÇÃO EM CADEIA PELA POLIMERASE (RT-PCR)

4.4.1. OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES (OLIGOS)

Uma das razões da escolha dos oligos originalmente descritos por Lin *et al.* (1991a) para uso neste trabalho deveu-se ao fato que flanqueiam uma região altamente conservada do genoma do VBig e isto possibilitaria um interessante estudo filogenético dos isolados brasileiros (a partir do material amplificado e submetido à análise por RFLP). Os oligos (BIGS21 e BIGS22) utilizados neste trabalho foram comparados às seqüências de DNA disponíveis no GenBank (*Database: non-redundant* PDB + GenBank + EMBL + DDBJ) usando o programa BLAST (Altschul *et al.*, 1990) disponível no endereço eletrônico do “National Institute of Health - NCBI”: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>. O oligo BIGS22, por pertencer à fita complementar reversa (-), foi analisado em sua fita complementar invertida (5' - C TCG TGA ATA TAA TGG TTT GCT - 3'). Para o BIGS21, ocorreram similaridades (entre as seqüências de 22 bases) nas seguintes percentagens: VBIGs disponíveis (genomas integrais ou parciais disponíveis mas sempre dentro da parte de interesse do gene S2 - codificador da gp S2) - 100% para os VBIGs M-41, M-42, UK/6-82, KB-8523, D-207 e D-274; 96% para os Ark-99, B-1648 e A-5968 / C-46; 87% para o CU-T2, e, 82% para o D-1466. Foram encontradas percentagens menores de similaridade com outros organismos, como por exemplo, 87% com uma parte do genoma de um *Rhinovirus* humano, 86% com a levedura *Saccharomyces cerevisiae*, 82% com o vírus do papiloma humano, 73% com o *Bacillus subtilis* e a *Musca domestica*, e 66% com a *Drosophila melanogaster*. Com o BIGS22 ocorreram similaridades (entre as seqüências de 22 bases) nas seguintes percentagens: VBIGs disponíveis (genomas integrais ou parciais mas sempre dentro da parte de interesse do gene S2) - 100% para os VBIGs M-41, M-42, Ark-99, UK/6-82, KB-8523, D-207 e D-274; 96% para os A-5968 /

C-46, 91% para o CU-T2, 87% para o B-1648, e, 73% para o D-1466, 82% com *Bacillus fragilis*, 83% com duas diferentes *Escherichia coli*, e outros mais (nematódeos, vírus de outras espécies animais, plantas, etc.), em lista extensa mas com porcentagem decrescente de similaridade, e que, provavelmente, não devem ter chegado à área de trabalho e, conseqüentemente, não são apresentados, sendo esta consideração final válida, também, para o BIGS21. Com a disponibilização de novas seqüências completas do gene S2 de outros VBIGs (disponíveis no GenBank em março e maio de 2000), outra pesquisa de similaridade dos oligos utilizados neste trabalho foi realizada e os resultados foram: para o BIGS21, 96% para os VBIGs JMK, SE-17, Ark-DPI, Ark-3168, Ark-3668-4, Ark-4257, GAV-92 e Fla-18288; 91% para o CAV-1013; para o BIGS22, foram: 100% para os JMK, SE-17, Ark-DPI, Ark-3168, Ark-3668-4, Ark-4257, CAV-1013 e GAV-92; 96% para Fla-18288. Com base no alinhamento comparativo [similaridade maior possível (100%) ou a menor encontrada (73%) - teoricamente perigosa (dúvida porque não foi testada, na prática, neste trabalho) em uma RT-PCR usada no diagnóstico de rotina] dos dois oligos frente às seqüências (parte de interesse do gene S2) dos VBIGs disponíveis no GenBank, ficou claro que sua escolha foi acertada, mesmo se fossem considerados apenas os resultados do primeiro levantamento de similaridade comparativa (fevereiro de 1995) e a despeito da situação atípica encontrada com o VBig D-1466. Não foi objetivo deste trabalho propor e testar novos oligos que flanqueassem a mesma região estudada ou uma parte interna dela (“nested - PCR”, por exemplo), outras regiões do mesmo gene ou todo o gene codificador da gpS2, mas este trabalho deve ser realizado no futuro para ampliar o conhecimento sobre estes isolados brasileiros do VBig e outros mais, se possível.

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

Os resultados desta etapa do trabalho somente foram avaliados após a realização da amplificação do cDNA (PCR) e, conforme relatado no próximo item (4.4.3), foram um sucesso, independente da grande variação individual nas concentrações dos RNAtivs (descrita no item 4.3). A utilização de um *kit* para esta finalidade específica (*Kit* SuperScript II RT RNase H⁻ System, BRL, USA) simplificou esta fase experimental e garantiu sua execução sem tropeços, reforçada com o uso adicional de um inibidor de RNases (RNasin, 40 U / μ L, Promega, EUA), o qual não acompanha o *kit* mas é recomendado por diversos autores para garantir a síntese de cDNA (Adzhar *et al.*, 1996; Jackwood *et al.*, 1997; Kwon *et al.*, 1993a; Song *et al.*, 1998; Wang & Tsai, 1996). Durante este trabalho, os cDNAs (2 x 20 μ L / VBIG e/ou isolado) ficaram estocados congelados em freezer e, durante quatro anos, foram congelados e descongelados por cerca de dez vezes, sem que tenham ocorrido problemas com sua amplificação (PCR) devido à degradação do cDNA. Os cDNAs, devido às ínfimas quantidades produzidas na RT, não têm suas concentrações determinadas para uso na PCR para o VBIG e o ajuste da quantidade de uso (μ L) deve ser feito durante a fase de otimização da RT-PCR (Adzhar *et al.*, 1996; Andreasen *et al.*, 1991; Jackwood *et al.*, 1997; Kwon *et al.*, 1993a,b; Lin *et al.*, 1991a; Song *et al.*, 1998; Wang & Tsai, 1996; Zwaagstra *et al.*, 1992).

4.4.3. AMPLIFICAÇÃO DO cDNA OU REAÇÃO EM CADEIA PELA POLIMERASE (PCR)

Os resultados da primeira e da segunda etapa (otimização) da PCR, assim como o detalhamento das atividades nelas realizadas, encontram-se descritos e relatados no item 3.8.3 do Material e Métodos. Apesar de importantes, os resultados destas duas etapas não serão apresentados aqui pelo entendimento que são inerentes ao adequado uso de uma técnica desta natureza (Belák & Ballagi-

Pordány, 1993; Binns, 1993; Deacon & Lah, 1989; Gravitt & Manos, 1993; Jackwood, 1992; Newton, 1995; Pfeffer *et al.*, 1995; Rodriguez & Schudel, 1993) e a extensa documentação fotográfica dos diversos géis de eletroforese (cada alteração mínima gerava um novo gel), destinada à análise subsequente visando a otimização da PCR, nada acrescentaria ao conteúdo realmente útil desta parte do trabalho.

Na primeira etapa, durante a qual foi utilizado o programa de amplificação proposto por Lin *et al.* (1991a) sem modificações, as amplificações dos cDNAs geraram produtos com bandas únicas esperadas e fortes, com aproximadamente 400 pb, nos VBIGs / isolados M-41, Ark-99, UK/6-82, H-52, 208, 29-78, 319, 327, PM1, PM2, PM3, PM4 e 200, e, nos VBIGs A-5968 / C-46, JMK, SE-17 e Iowa-97, geraram banda única e fraca. Os cDNAs dos isolados 283, 290, 297, 351, G e TII não amplificaram e, felizmente, os controles negativos [especificidade (VDN - La Sota) e sistema de produção viral (*pool* de LAs de OEG/SPF não inoculados)] também não. Corroborando com os resultados da primeira etapa deste estudo (seis em 15 isolados brasileiros não amplificaram), Wang & Tsai (1996), utilizando a mesma metodologia descrita por Lin *et al.* (1991a), somente amplificaram seis dentre 14 isolados de VBIG em Taiwan e os resultados podem ser atribuídos ao fato de que não otimizaram a técnica, principalmente no tocante ao número de ciclos repetitivos (\cong 20). Não foi possível comprovar a ligação dos resultados variáveis encontrados durante a primeira etapa de amplificação deste trabalho com o único fator que comprovadamente variou: as concentrações dos RNAtivs e, conseqüentemente dos cDNAs, mas este problema já foi comprovado quando o cDNA se destina a gerar segmentos amplificados acima de 1.500 pb (Adzhar *et al.*, 1996).

Na segunda etapa, a utilização de *kit* comercial de reagentes básicos para PCR (PCR Reagent System, BRL ou Promega, EUA - não é *kit* de diagnóstico por RT-PCR específico para o VBIG) ou de enzima *Taq* DNA polimerase que é comercializada acompanhada de soluções prontas (tampão

de PCR 10 X com 1% de Triton X-100 + solução 25 mM MgCl₂, Promega, EUA), simplificou e colaborou positivamente na otimização do sistema (Powell, 1995; Resende *et al.*, 1998). A suspeita de que o programa de amplificação de Lin *et al.* (1991a) continha um número insuficiente de ciclos repetitivos (20), além da ausência dos ciclos inicial de desnaturação e final para extensão de cadeia, foi comprovada como verdadeira quando os produtos fracamente ou não amplificados foram reamplificados (novos 20 ciclos repetitivos - totalizando 40, mesmo microtubo, apenas adicionando, novamente, a Taq DNA polimerase) com aparecimento da banda esperada única e forte, à exceção dos controles negativos que não amplificaram. Corroborando com os resultados obtidos neste trabalho com a otimização (23 em 23 amplificaram), Adzhar *et al.* (1996) usaram os mesmos oligos de Lin *et al.* (1991a), mas com um programa de amplificação também modificado (ciclos inicial e final e 35 ciclos repetitivos), e conseguiram amplificar 41 VBIGs / isolados oriundos de diversos países [Austrália (1), EUA (5), França (1), Holanda (6 + 2 VBIGs vacinais), Inglaterra & Escócia (19 + 2 VBIGs vacinais), Japão (3), Portugal (2)].

Após a segunda etapa, foi realizada a última etapa de PCR, na qual foram obtidos grandes volumes de materiais amplificados individuais para uso na RFLP (demandou grandes volumes de material amplificado em decorrência de repetições por possíveis erros de pipetagem, na montagem dos géis de eletroforese, documentação fotográfica, etc.). Conforme esperado (Lin *et al.*, 1991a,b; Resende *et al.*, 1998), após a otimização, produtos com bandas únicas de aproximadamente 400 pares de bases (pb) foram obtidos nos oito VBIGs importados (referência) e, também, nos quinze isolados brasileiros submetidos à RT-PCR para o VBIG neste trabalho (Figura 5). Aparentemente, nenhuma deleção ou inserção com alteração significativa no tamanho do produto amplificado dos VBIGs estudados (referência e isolados brasileiros) foi detectada (teoricamente, os produtos obtidos teriam < 400 pb ou > 400 pb, respectivamente), situação que, também, foi encontrada em estudos que utilizaram os

mesmos oligos (Adzhar *et al.*, 1996; Lin *et al.*, 1991a,b). A extrema exatidão de tamanho (sempre 400 pb) encontrada nas seqüências (parte do gene S2 flanqueada pelos oligos BIGS21 e BIGS22) que estão disponíveis no GenBank (Tabela 11 - total de 20 VBIGs: M-41, M-42 / Beaudette, C-46 / A-5968, JMK, SE-17, Ark-99, Ark-DPI, Ark-3168, Ark-3668-4, Ark-4257, Fla-18288, UK/6-82, CAV-1013, GAV-92, KB-8523, CU-T2, D-1466, D-207, D-274, B-1648), a despeito do fato de que alguns deles são comprovadamente variantes (B-1648, CAV-1013, D-1466, D-207, D-274, GAV-92 e UK/6-82) e/ou recombinantes (CU-T2 e KB-8523) e poderiam ter alterações significativas no tamanho do segmento de DNA estudado, permite afirmar que os isolados brasileiros tiveram amplificado um segmento de exatos 400 pb, até prova contrária. O que variou, até onde a metodologia utilizada permitiu elucidar, foram substituições de nucleotídeos e que, algumas delas, foram detectadas pela restrição enzimática (RFLP - item 4.5). Estes resultados confirmaram o caráter de uso universal proposto por Adzhar *et al.* (1996) para os oligos BIGS21 e BIGS22 utilizados originalmente por Lin *et al.* (1991a) na amplificação de parte do gene codificador da gpS2 do VBIG, a julgar pela detecção dos quinze isolados brasileiros (Figura 5). Conseqüentemente, também até prova contrária, pode-se afirmar que a RT-PCR utilizada e modificada (após a otimização), pode identificar isolados suspeitos de serem VBIG e teria aplicação no diagnóstico rápido de rotina (24 - 48 h), diretamente a partir do LA (não concentrado - resultados não publicados) de OEG/SPF inoculados previamente (48 - 72 h) com material suspeito de conter VBIG. Por sua vez, a quantidade (extraída e utilizada) de RNAtiv na síntese de cDNA não precisaria ter sido determinada, conforme a metodologia descrita por Abreu (2000).

Outros vírus que podem infectar o mesmo sistema ideal de isolamento do VBIG (OEG/SPF) e que, portanto, deveriam fazer parte dos controles negativos deste trabalho, como por exemplo, os vírus da doença infecciosa bursal (RNA - VDIB ou Gumboro), da EDS-76 (*Egg Drop Syndrome*)

- adenovírus, DNA, vacinal, adaptado a este sistema) e da laringotraqueíte infecciosa das galinhas (herpesvírus, DNA), todos com muitos dos seus genes completos já publicados no GenBank, não foram empregados porque, a exemplo de outros coronavírus que sabidamente não infectam OEG/SPF (murino, canino, suíno, bovino, peru, etc.), sequer foram detectados no levantamento de similaridade comparativa dos oligos (item 4.4.1), mas os três primeiros (Gumboro, EDS-76 e Laringotraqueíte) já foram testados anteriormente (Wang & Tsai, 1996) quanto à especificidade no tocante aos oligos usados neste trabalho.

A técnica modificada (otimizada) precisa ser testada com materiais coletados diretamente de galinha proveniente de

granja com surto suspeito de BIG [orgão(s) do(s) sistema(s) - alvo(s) do VBIG; *swabs* (traquéia, cloaca); etc. - Gelb *et al.*, 1987; Gelb, 1989] e ajustes serão necessários nestes casos, inclusive no que se refere ao título mínimo de VBIG detectável ou prova de sensibilidade de técnica (Adzhar *et al.*, 1996; De Wit, 2000). Entretanto, o isolamento do VBIG [OEG/SPF (Cunningham *et al.*, 1973; Villegas, 1985) e CAT (Cook *et al.*, 1979; Darbyshire *et al.*, 1976; Epiphany, 1998)] é essencial porque permite outros estudos (patogenia; desenvolvimento de vacinas convencionais autóctones; etc.) com o(s) isolado(s) e que normalmente não poderiam ser realizados simplesmente com a detecção molecular (Cavanagh & Naqi, 1997; Dhinakar Raj & Jones, 1997; Resende *et al.*, 1989; Resende *et al.*, 1998).

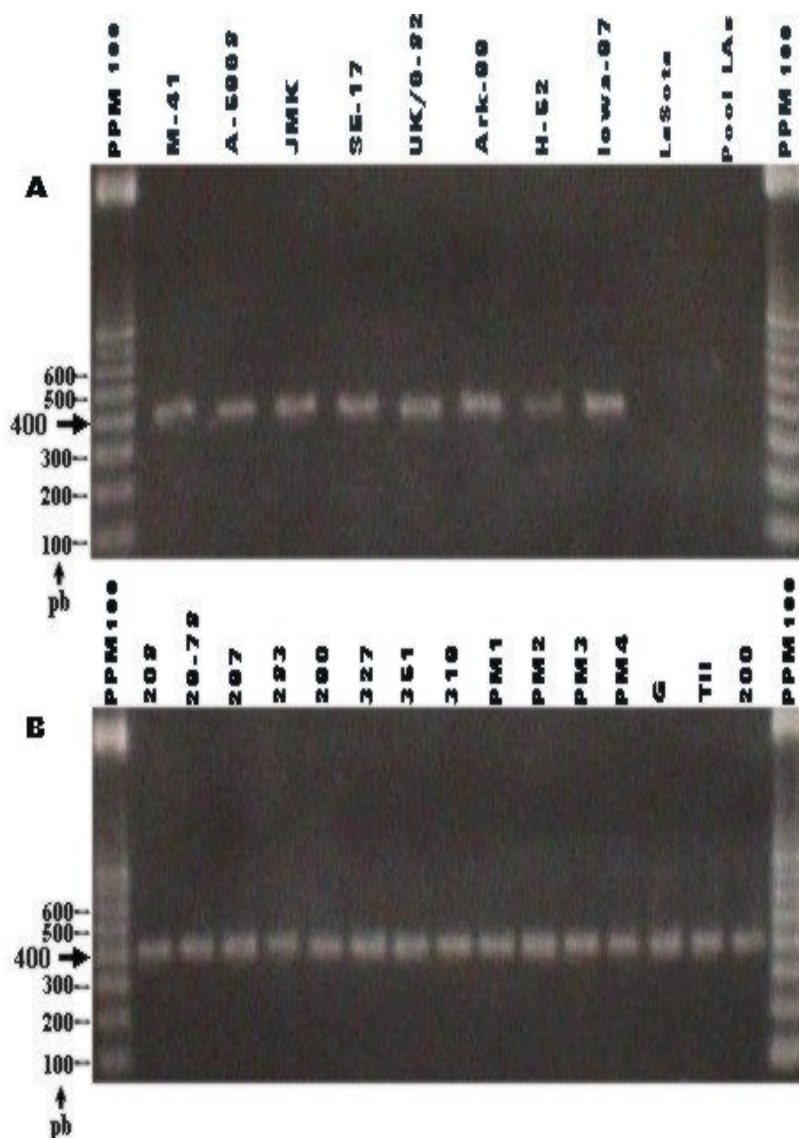


Figura 5 - Eletroforese dos produtos da RT-PCR. Visualização, sob luz UV, dos géis de agarose 3,5% corados com EtBr após eletroforese dos produtos amplificados (parte do gene S2) obtidos de 23 VBIGs (PPM 100: padrão molecular de fragmentos de DNA fita dupla de diferentes tamanhos - 100 *bp* DNA *Ladder*; pb: pares de bases). Gel A - Oito VBIGs de referência e dois controles (negativos) de especificidade (VDN - La Sota) e de sistema (*pool* de LAs de OEG/SPF). Gel B - Quinze isolados brasileiros.

4.5. RESTRIÇÃO ENZIMÁTICA E ANÁLISE POR RFLP

Após a realização da RT-PCR para obtenção de volume de material amplificado (400 µL / VBIG), fez-se a confirmação da amplificação da banda de interesse (única, forte e esperada com \cong 400 pb) principalmente pela eletroforese em géis de agarose 3,5% (no início, foi utilizada eletroforese em géis de poliacrilamida 6%, conforme Lin *et al.*, 1991a) e posteriormente corados com EtBr e fotografados sobre luz UV para análise (Newton, 1995; Sambrook *et al.*, 1989). Visando detectar pequenas diferenças (a substituição de até mesmo um simples nucleotídeo pode induzir ou inibir a restrição por uma determinada enzima) dentro dos DNAs amplificados dos diferentes VBIGs / isolados, os produtos da amplificação foram submetidos à restrição enzimática (RE) com nove enzimas de restrição (*Bst*YI, *Dde*I, *Hae*III, *Hinc*II, *Hinf*I, *Hpa*II, *Mae*III, *Pst*I e *Sc*I), conforme recomendado (Lin *et al.*, 1991a), mas sem purificar o DNA amplificado de cada VBIG / isolado ou usar marcação das extremidades dos oligos com isótopo radioativo, em uso alternado e em PCRs diferentes (duas PCRs / VBIG / ainda durante a amplificação para produção de volume). A purificação do DNA amplificado [corte de banda específica e posterior purificação em *kit* adequado para esta finalidade (utilizado por Kwon *et al.*, 1993a - DNA do gene S1) ou purificação por precipitação similar à extração de RNAtiv deste trabalho (Lin *et al.*, 1991a)] é necessária quando a otimização da RT-PCR não foi adequada [presença de banda(s) inespecífica(s) e/ou uso de isótopos radioativos - se não for purificado, não se consegue foto/radiografar e analisar adequadamente nem o produto amplificado e nem os fragmentos de DNA após RFLP], o que não foi o caso deste trabalho. A marcação dos oligos com isótopos radioativos, em uso alternado (ora o oligo direto, ora o reverso, em duas amplificações distintas por cDNA de cada VBIG / isolado) conforme Lin *et al.* (1991a), visando determinar com exatidão qual banda pertencia à extremidade 5' ou à 3' durante a RFLP, sequer foi tentada neste trabalho

porque, mesmo adquirindo o enxofre (S^{35}) por três vezes consecutivas na Amersham - Inglaterra (na primeira aquisição, o piloto recusou a embarcar o material; noutra, o material foi para Santiago - Chile; e, na última, chegou seis meses antes da data combinada), foi impossível realizar a tarefa. Felizmente, graças ao uso de várias enzimas de restrição e das informações obtidas nas seqüências de interesse dos vinte VBIGs disponibilizadas no GenBank, principalmente dos VBIGs de referência e de procedência confiável (M-41, A-5968 / C-46, Ark-99 e UK/6-82), foi possível montar a RFLP comparada e contornar, satisfatoriamente, a situação descortinada sem prejudicar os objetivos originais do trabalho.

Os produtos amplificados pela RT-PCR e submetidos à restrição enzimática, geraram diversos fragmentos de DNA, os quais foram visualizados e fotografados após eletroforese em gel de agarose 3,5% corado com EtBr: *Bst*YI (Figura 6), *Dde*I (Figura 7), *Hae*III (Figura 8), *Hinc*II (Figura 9), *Hinf*I (Figura 10), *Hpa*II (Figura 11), *Mae*III (Figura 12), *Sc*I (Figura 13), e *Pst*I (Figura 14). Com base nos resultados encontrados na restrição enzimática (RFLP), antes da elaboração da RFLP comparada e, conseqüentemente, da determinação dos padrões de restrição enzimática (PRE), foi possível determinar quais "VBIGs e isolados" foram "cortados ou não" pelas enzimas utilizadas e, até, pequenas diferenças nos padrões de corte foram detectadas. A *Bst*YI, cujo sítio de restrição é (A ou G)↓GATC(T ou C), gerou um padrão de restrição enzimática (PRE) único: cinco VBIGs de referência (A-5968 / C-46, JMK, SE-17, UK/6-82 e Ark-99) e quatro isolados brasileiros (327, PM3, PM4 e 200) foram cortados, enquanto os outros 14 não (Figura 6). Com a *Dde*I, cujo sítio de restrição é C↓T(A ou T ou C ou G)AG, todos foram cortados e quatro PRE distintos foram encontrados: um primeiro com a maioria dos VBIGs e isolados (M-41, A-5968 / C-46, JMK, SE-17, UK/6-82, Ark-99, Iowa-97, 208, 327, 319, PM1, PM2, PM4 e 200), um segundo com os 297, 283 e 290, um terceiro com os 351, G e TII e um quarto

com os H-52, 29-78 e PM3 (Figura 7). A *HaeIII*, cujo sítio de restrição é $\text{GG}\downarrow\text{CC}$, gerou dois PRE distintos: um com a maioria dos VBIGs e isolados (M-41, A-5968 / C-46, JMK, SE-17, UK/6-82, Ark-99, Iowa-97, 208, 327, 319, PM1, PM2, PM4 e 200) e outro com os 297, 283, 290, 351, G e TII, enquanto os H-52, 29-78 e PM3 não foram cortados (Figura 8). A *HincII*, cujo sítio de restrição é $\text{GT}(\text{T ou C})\downarrow(\text{A ou G})\text{AC}$, gerou um resultado bem simples: ou cortou com um PRE único (M-41, A-5968 / C-46, JMK, SE-17, UK/6-82, Ark-99, Iowa-97, 208, 327, 319, PM1, PM2, PM3, PM4 e 200) ou não (H-52, 29-78, 297, 283, 290, 351, G e TII) (Figura 9). A *Hinfl*, cujo sítio de restrição é $\text{G}\downarrow\text{A}(\text{A ou T ou C ou G})\text{TC}$, curiosamente, cortou todos os 23 VBIGs / isolados estudados com um mesmo PRE e não ajudou a diferenciar os VBIGs / isolados (Figura 10). A *HpaII*, cujo sítio de restrição é $\text{C}\downarrow\text{CGG}$, também, gerou um resultado bastante simples: ou cortou com um PRE único (M-41, H-52, Iowa-97, 208, 29-78, 327, 319, PM1, PM2, PM3, PM4 e 200) ou não (A-5968 / C-46, JMK, SE-17, UK/6-82, Ark-99, 297, 283, 290, 351, G e TII) (Figura 11). A *MaellI*, cujo sítio de restrição é $\downarrow\text{GT}(\text{A ou T ou C ou G})\text{AC}$, gerou dois PRE distintos (um com os M-41, UK/6-82, Ark-99, 208, 351, 319, PM1, PM2, G e TII, e outro com os 297, 283 e 290) ou não cortou (A-5968 / C-46, JMK, SE-17, H-52, Iowa-97, 29-78, 327, PM3, PM4 e 200) (Figura 12). A *MaellI* foi a única enzima cuja aquisição e uso foram problemáticos (produção demorada, sob encomenda e muito cara – atualmente, tem sido fabricada e/ou comercializada pela Pharmacia a um custo dez vezes menor). Até por este motivo, não foi possível a necessária repetição da restrição enzimática e, também, uma adequada documentação fotográfica, mas os resultados obtidos mostraram-se corretos, conforme verificado após a RFLP comparada (GenBank + WebGene e Lin *et al.*, 1991a). Com a *PstI*, cujo sítio de restrição é $\text{CTGCA}\downarrow\text{G}$, dois PRE distintos foram gerados (um com os VBIGs / isolados M-41, Ark-99, H-52, Iowa-97, 208, 29-78, 327, 319, PM1, PM2, PM3, PM4 e 200, e, outro, com os A-5968 / C-46, JMK, SE-17, UK/6-82, 297, 283 e 290) e os isolados 351,

G e TII não foram cortados (Figura 13). A *Scal*, cujo sítio de restrição é $\text{AGT}\downarrow\text{ACT}$, nos VBIGs / isolados que foram cortados, gerou, também, dois PRE distintos (um com os UK/6-82, 297, 283, 290, 351, G e TII, e, outro, com os A-5968 / C-46, JMK e SE-17) e, os outros, não foram cortados (Figura 14). Os resultados encontrados (Tabelas 5, 6 e 10) foram sempre os mesmos em três repetições distintas de restrição enzimática (única exceção foi a *MaellI* - só foi possível adquirir 50 U, suficiente para uma única RFLP), inclusive com produtos amplificados em diferentes ampliações (PCR), mostrando que eles foram confiáveis e reprodutíveis, como, também, conseqüentemente, a metodologia utilizada na obtenção dos mesmos. Nesta fase, os problemas com os VBIGs de referência (controles positivos) JMK, SE-17 e Iowa-97 utilizados neste estudo ainda não haviam sido detectados (com certeza, somente foram confirmados após a RFLP comparada - item 4.6), apenas havia a questão da similaridade dos resultados da RFLP dos JMK e SE-17 com o do A-5968 / C-46, principalmente por causa do PRE encontrado nestes VBIGs após a restrição enzimática (*BstYI*, *DdeI* e *Hinfl* - Tabela 10).

Na tentativa de calcular o tamanho exato de cada banda (fragmento de DNA) no gel de agarose 3,5%, independente de sua posição no gene (5' → 3'), foi usado um programa de computador (*Software Seqaid* - DNAfrag versão 3,03), especialmente desenvolvido para medições dos tamanhos dos fragmentos (DNA e/ou proteína) em géis de agarose e/ou SDS-PAGE (Schaffer & Sederoff, 1981). Para isto, nas fotografias dos géis, primeiramente, foram medidos com uma escala milimetrada os deslocamentos das bandas do padrão molecular de fragmentos de DNA fita dupla de diferentes tamanhos (PPM 100 = 100 bp DNA *Ladder*) e, posteriormente, o deslocamento das bandas dos VBIGs. De posse dos resultados dos tamanhos dos fragmentos do padrão molecular (tamanhos reais: 100, 200, 300 e 400, e os calculados: 106, 203, 266 e 430), foi montada uma curva padrão. O desvio padrão individual e, finalmente, o médio, foi calculado, ficando em torno de 22,57 pares de bases (pb).

Traduzindo, com este desvio padrão, a banda calculada como tendo 106 pb teve um erro de mais ou menos 22,57 pb, ou seja, o tamanho estimado variou de 83,43 até 128,57 pb. Como o cálculo tornou-se difícil em decorrência do fato de que o total dos fragmentos de DNA obtidos na restrição enzimática quase sempre ultrapassou os 400 pb de cada VBIG, além de que as

bandas abaixo de 100 pb tiveram baixa resolução e os erros foram grandes (resultados não apresentados), os cálculos visuais foram implementados (Tabela 5). O ideal seria um programa que fizesse os cálculos diretamente a partir das fotografias (hoje está disponível), mas não foi possível obtê-lo para uso neste trabalho.

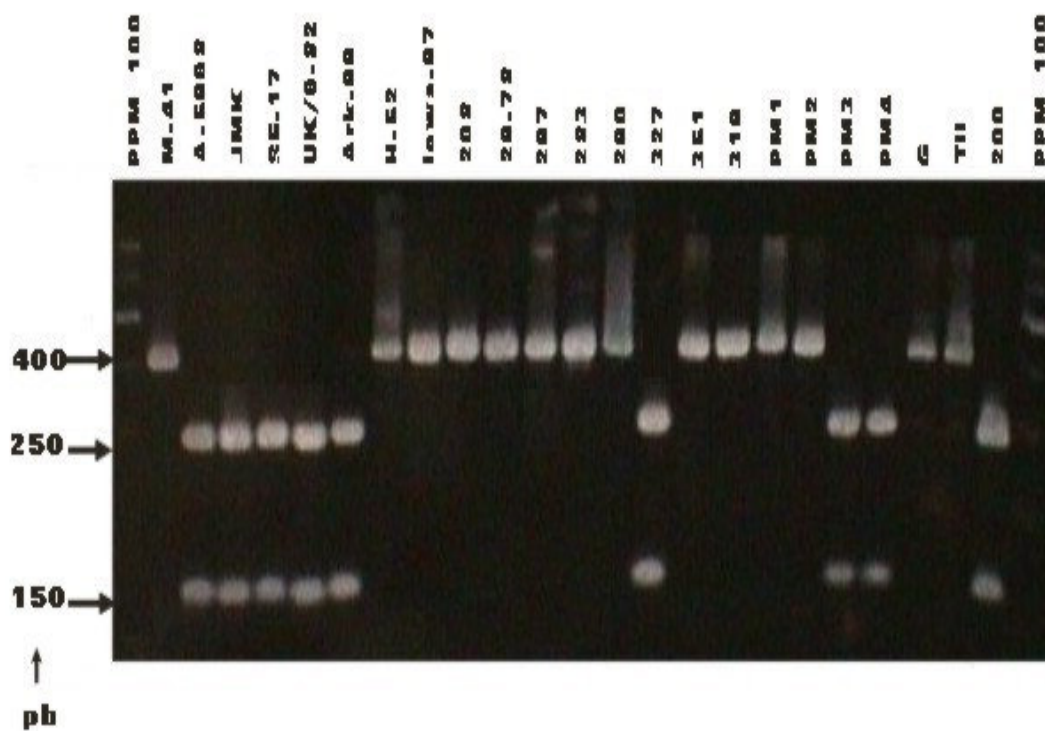


Figura 6 - Visualização dos produtos da restrição enzimática com *Bst*YI. RFLPs dos produtos amplificados (parte do gene S2) por RT-PCR de 23 VBIGs [oito de referência (M-41 → Iowa-97) e quinze isolados brasileiros (208 → 200)] sobre luz UV após eletroforese em gel de agarose 3,5% corado com EtBr (PPM 100: 100 *bp* DNA Ladder; pb: pares de bases).

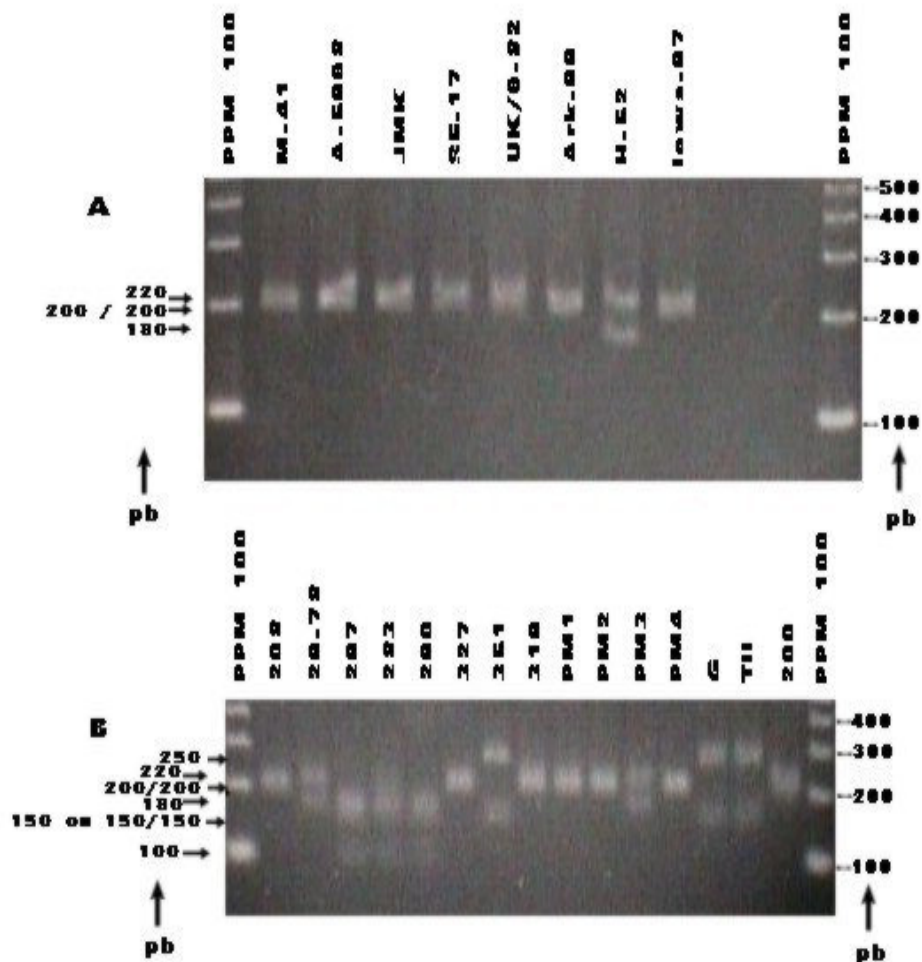


Figura 7 - Visualização dos produtos da restrição enzimática com *Ddel*. RFLPs dos produtos amplificados (parte do gene S2) por RT-PCR de 23 VBIGs sobre luz UV após eletroforese em géis de agarose 3,5% corados com EtBr (PPM 100: 100 *bp* DNA Ladder, pb: pares de bases). Gel A - Oito VBIGs de referência. Gel B - Quinze isolados brasileiros.

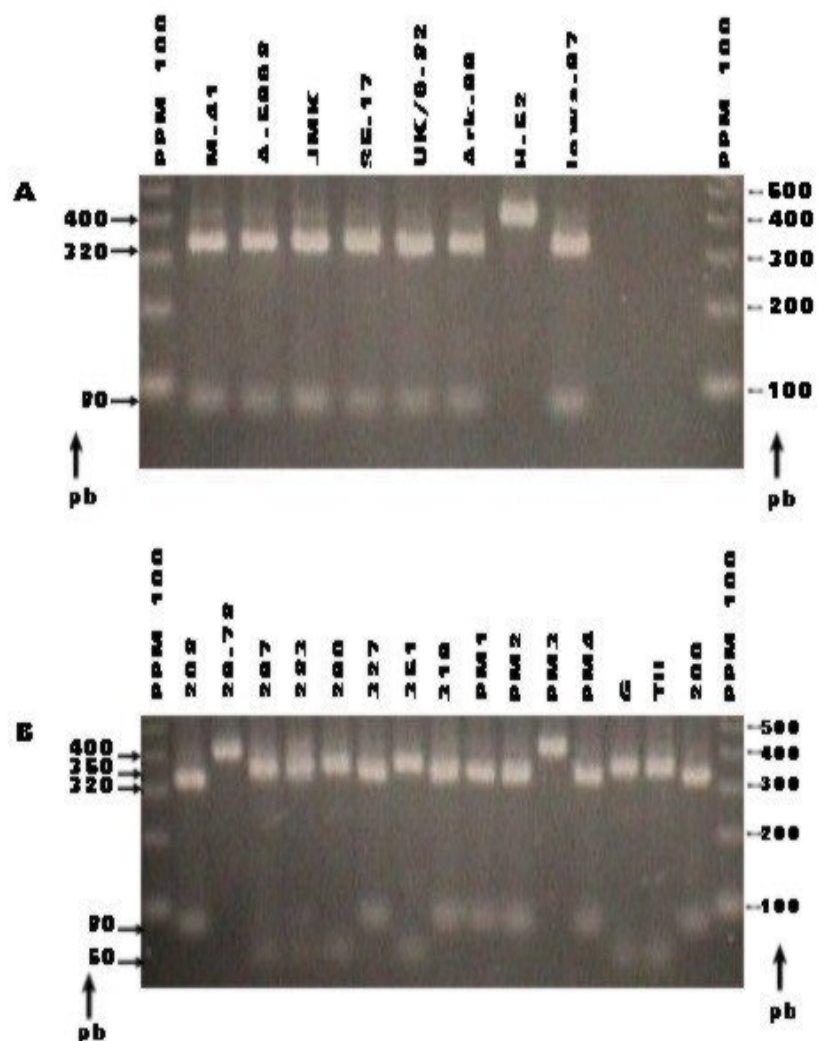


Figura 8 - Visualização dos produtos da restrição enzimática com *HaeIII*. RFLPs dos produtos amplificados (parte do gene S2) por RT-PCR de 23 VBIGs sobre luz UV após eletroforese em géis de agarose 3,5% corados com EtBr (PPM 100: 100 *bp* DNA Ladder, pb: pares de bases). Gel A - Oito VBIGs de referência. Gel B - Quinze isolados brasileiros.

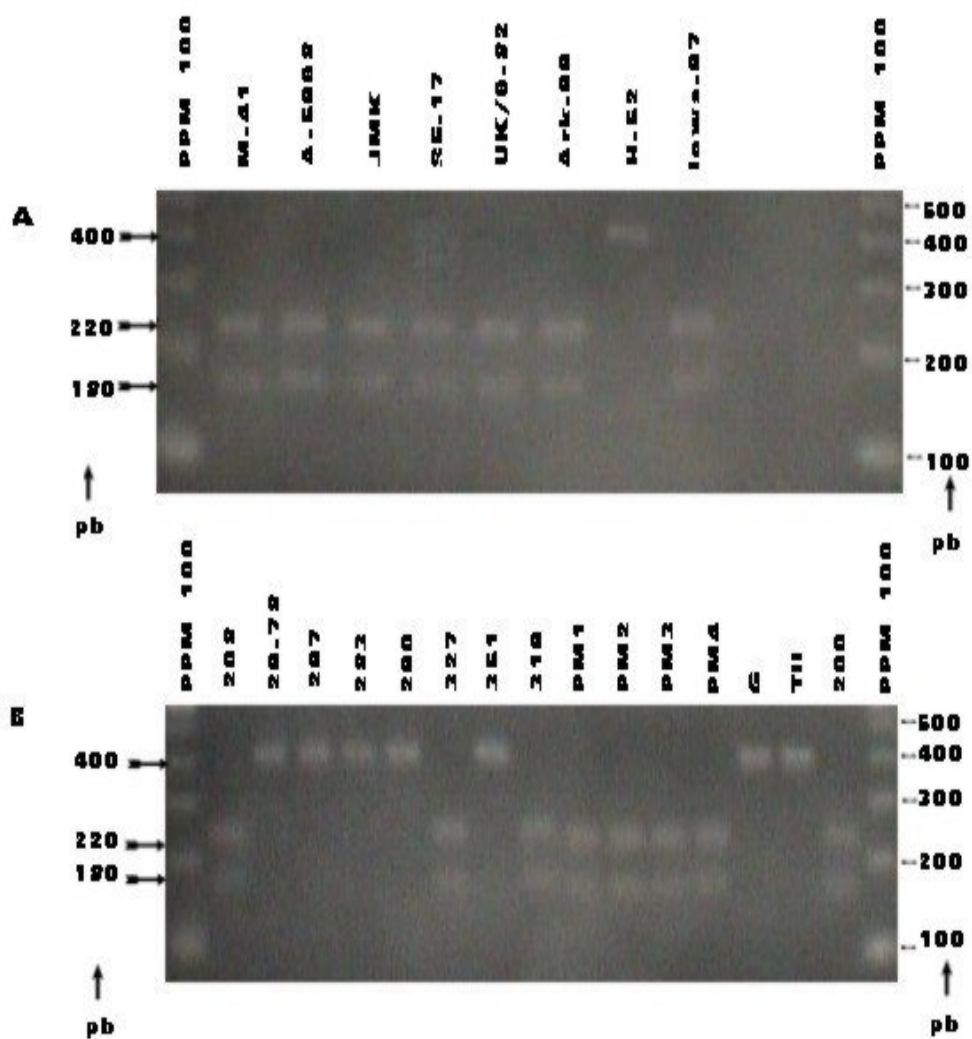


Figura 9 - Visualização dos produtos da restrição enzimática com *HincII*. RFLPs dos produtos amplificados (parte do gene S2) por RT-PCR de 23 VBIGs sobre luz UV após eletroforese em géis de agarose 3,5% corados com EtBr (PPM 100: 100 *bp* DNA Ladder, pb: pares de bases). Gel A - Oito VBIGs de referência. Gel B - Quinze isolados brasileiros.

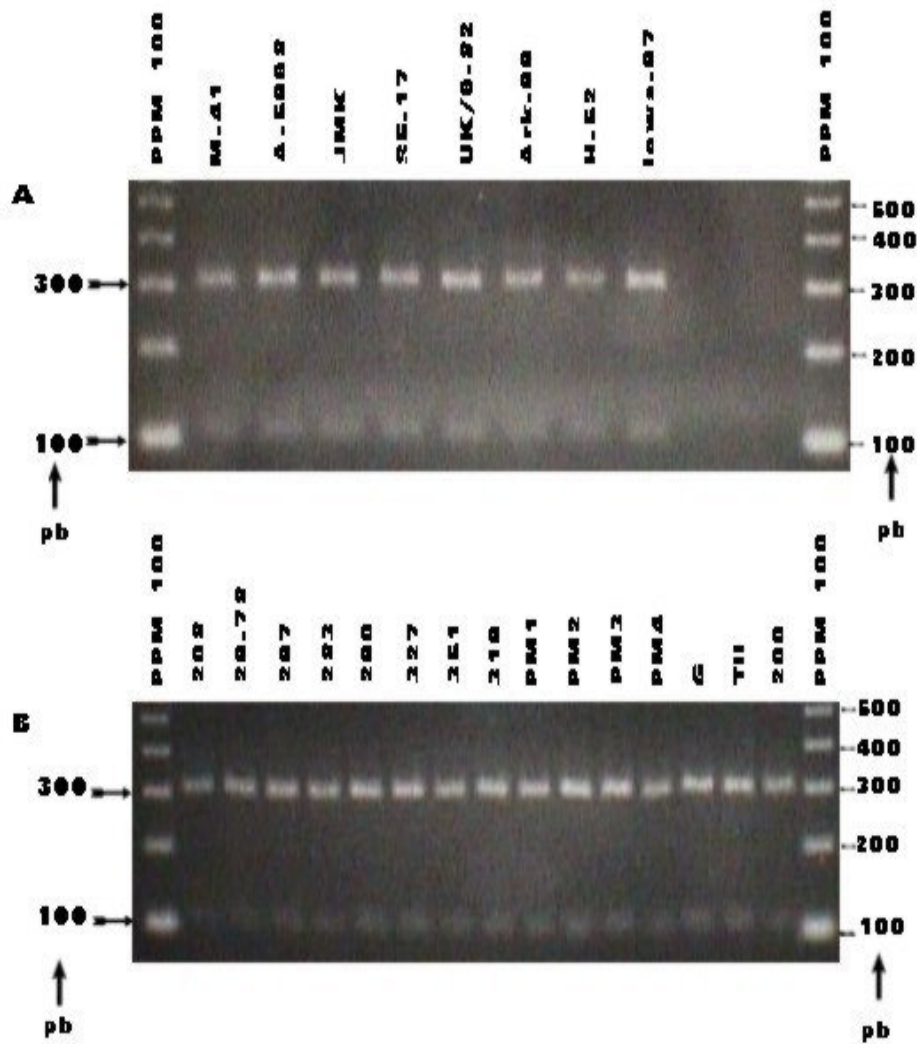


Figura 10 - Visualização dos produtos da restrição enzimática com *HinfI*. RFLPs dos produtos amplificados (parte do gene S2) por RT-PCR de 23 VBIGs sobre luz UV após eletroforese em géis de agarose 3,5% corados com EtBr (PPM 100: 100 *bp* DNA Ladder, pb: pares de bases). Gel A - Oito VBIGs de referência. Gel B - Quinze isolados brasileiros.

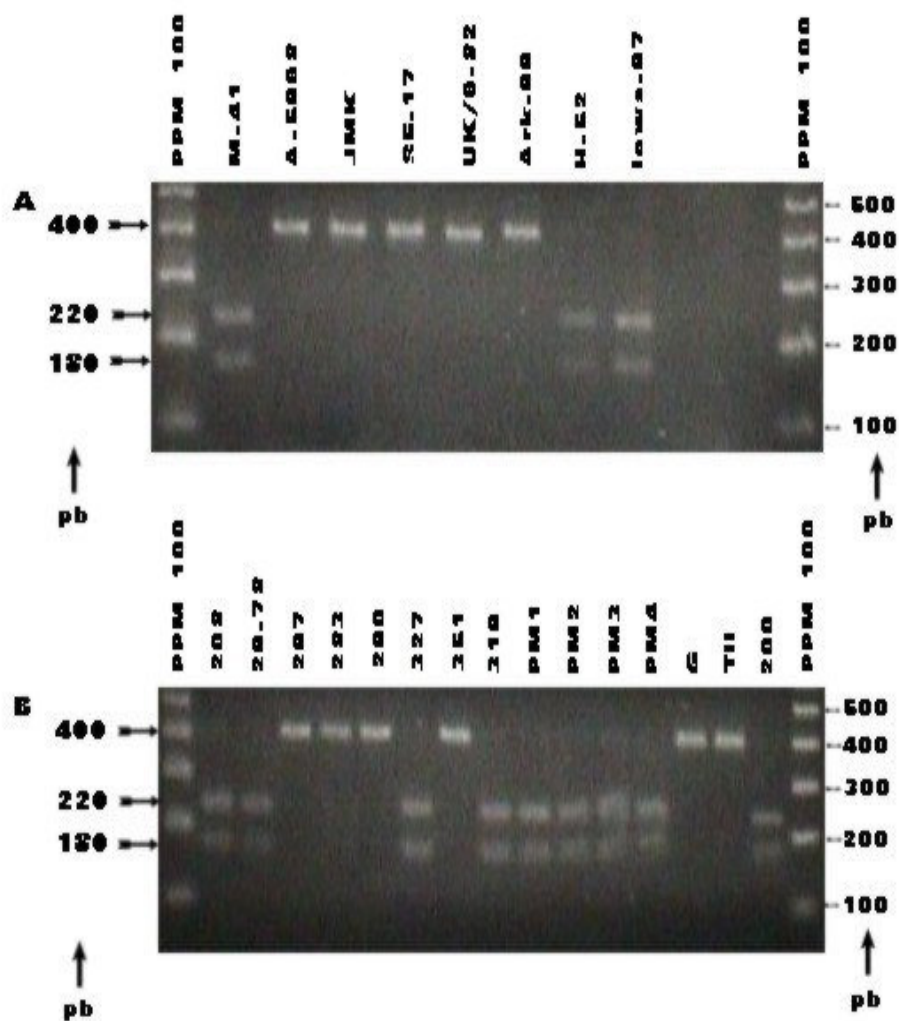


Figura 11 - Visualização dos produtos da restrição enzimática com *Hpa*I. RFLPs dos produtos amplificados (parte do gene S2) por RT-PCR de 23 VBIGs sobre luz UV após eletroforese em géis de agarose 3,5% corados com EtBr (PPM 100: 100 *bp* DNA Ladder, pb: pares de bases). Gel A - Oito VBIGs de referência. Gel B - Quinze isolados brasileiros.

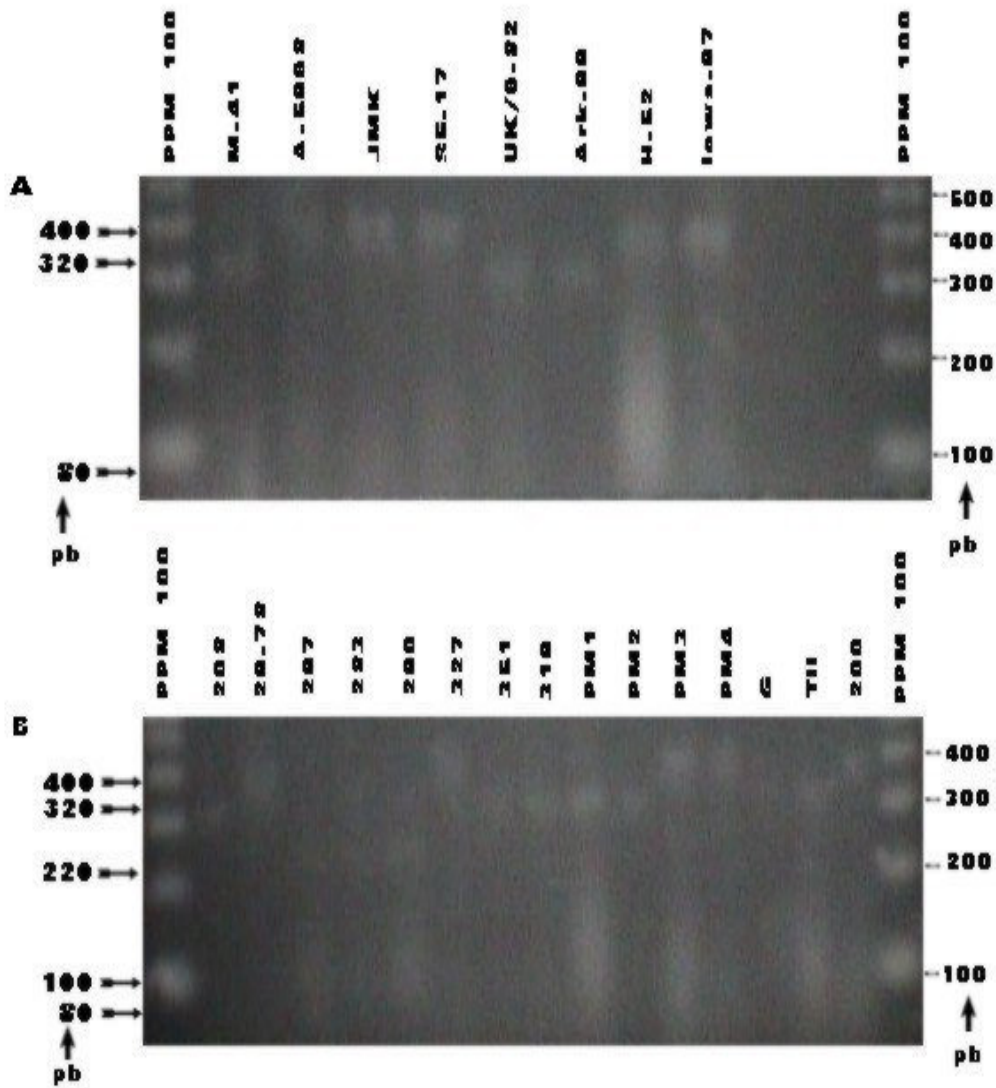


Figura 12 - Visualização dos produtos da restrição enzimática com *MaeIII*. RFLPs dos produtos amplificados (parte do gene S2) por RT-PCR de 23 VBIGs sobre luz UV após eletroforese em géis de agarose 3,5% corados com EtBr (PPM 100: 100 *bp* DNA Ladder; pb: pares de bases). Gel A - Oito VBIGs de referência. Gel B - Quinze isolados brasileiros.

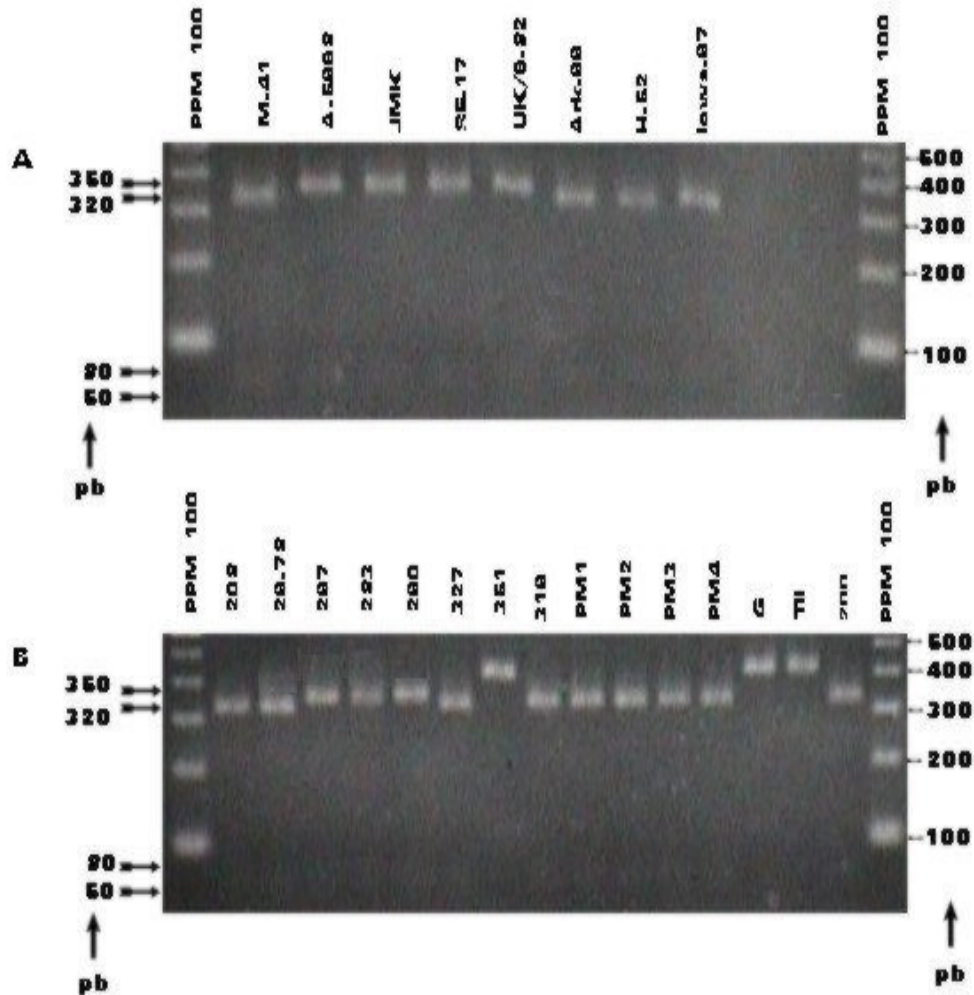


Figura 13 - Visualização dos produtos da restrição enzimática com *Pst*I. RFLPs dos produtos amplificados (parte do gene S2) por RT-PCR de 23 VBIGs sobre luz UV após eletroforese em géis de agarose 3,5% corados com EtBr (PPM 100: 100 *bp* DNA Ladder, pb: pares de bases). Gel A - Oito VBIGs de referência. Gel B - Quinze isolados brasileiros.

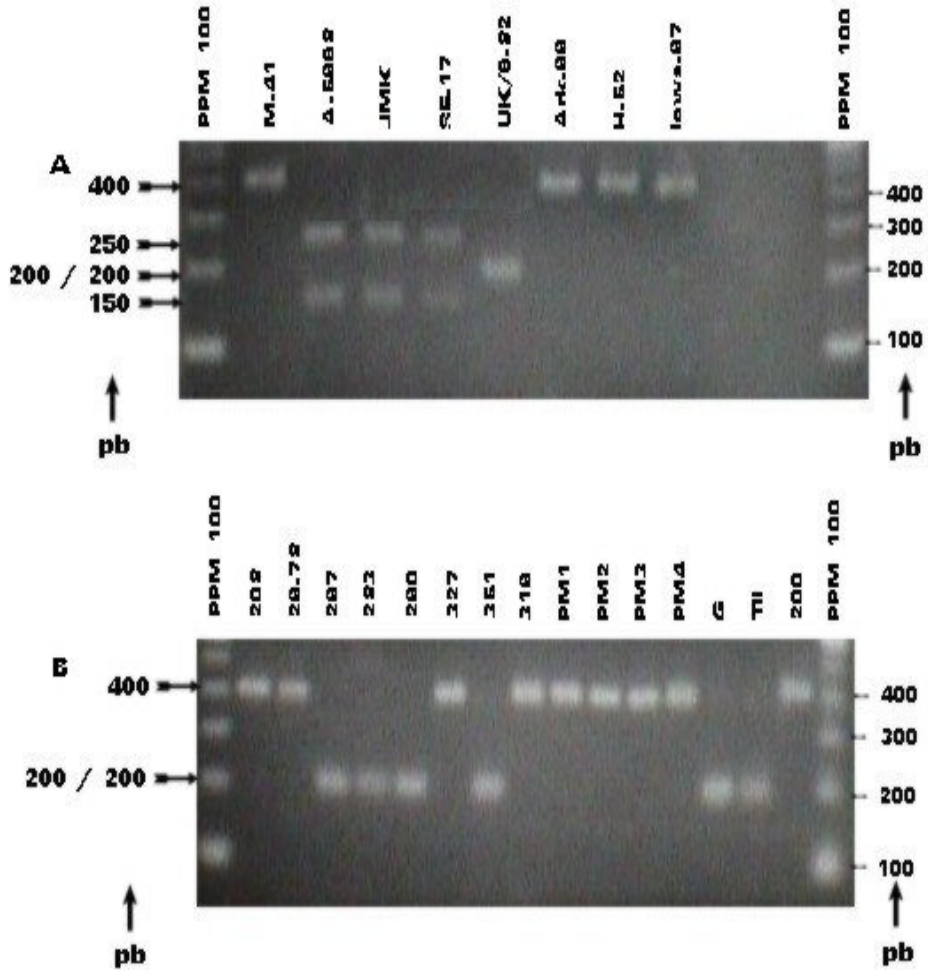


Figura 14 - Visualização dos produtos da restrição enzimática com *ScaI*. RFLPs dos produtos amplificados (parte do gene *S2*) por RT-PCR de 23 VBIGs sobre luz UV após eletroforese em géis de agarose 3,5% corados com EtBr (PPM 100: 100 *bp* DNA *Ladder*, pb: pares de bases). Gel A - Oito VBIGs de referência. Gel B - Quinze isolados brasileiros.

Tabela 6 – Padrões de corte encontrados na RFLP (análise inicial) do segmento amplificado de S2 obtido por RT-PCR de 23 VBIGs (oito de referência e 15 isolados brasileiros).*

Restrição enzimática (RFLP - análise inicial) X padrões de corte (PC)																
VBIGs ↓	<i>Bst</i> YI	<i>Ddel</i>				<i>Hae</i> III		<i>Hinc</i> II	<i>Hinf</i> I	<i>Hpa</i> II	<i>Mae</i> III		<i>Pst</i> I		<i>Sca</i> I	
PC ^a →	C	A	B	C	F	D	E	F	G	F	D	H	D	E	A	C
M-41	-	+	-	-	-	+	-	+	+	+	+	-	+	-	-	-
A-5968	+	+	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-	+
JMK	+	+	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-	+
SE-17	+	+	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-	+
UK/6-82	+	+	-	-	-	+	-	+	+	-	+	-	-	+	+	-
Ark-99	+	+	-	-	-	+	-	+	+	-	+	-	+	-	-	-
H-52	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-
Iowa-97	-	+	-	-	-	+	-	+	+	+	-	-	+	-	-	-
208	-	+	-	-	-	+	-	+	+	+	+	-	+	-	-	-
29-78	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-
297	-	-	+	-	-	-	+	-	+	-	-	+	-	+	+	-
283	-	-	+	-	-	-	+	-	+	-	-	+	-	+	+	-
290	-	-	+	-	-	-	+	-	+	-	-	+	-	+	+	-
327	+	+	-	-	-	+	-	+	+	+	-	-	+	-	-	-
351	-	-	-	+	-	-	+	-	+	-	+	-	-	-	+	-
319	-	+	-	-	-	+	-	+	+	+	+	-	+	-	-	-
PM1	-	+	-	-	-	+	-	+	+	+	+	-	+	-	-	-
PM2	-	+	-	-	-	+	-	+	+	+	+	-	+	-	-	-
PM3	+	-	-	-	+	-	-	+	+	+	-	-	+	-	-	-
PM4	+	+	-	-	-	+	-	+	+	+	-	-	+	-	-	-
G	-	-	-	+	-	-	+	-	+	-	+	-	-	-	+	-
TII	-	-	-	+	-	-	+	-	+	-	+	-	-	-	+	-
200	+	+	-	-	-	+	-	+	+	+	-	-	+	-	-	-

* - Análise inicial dos resultados da RFLP deste estudo antes da realização da RFLP comparada (análise final) com VBIGs de outras fontes de informação - GenBank + WebGene e Lin *et al.* (1991a).

a - Padrões de corte (PC) encontrados após eletroforese nos géis de agarose 3,5% (Figuras 6 a 14) e análise por RFLP inicial deste trabalho, antes da realização da RFLP comparada quando, então, passaram a ser usados números no lugar de letras. As letras, conforme pode ser observado na Tabela 5, correspondem aos seguintes fragmentos de DNA em pares de bases (bandas: maior: → menor e não estão na posição 5' → 3'): A (200 ↔ 200), B (150 ↔ 150 → 100), C (250 → 150), D (320 → 80), E (350 → 50), F (220 → 180), G (300 → 100) e H (220 → 100 → 80).

4.6. RFLP COMPARADA COM DADOS OBTIDOS NA ANÁLISE DAS SEQÜÊNCIAS DO GENE S2 DISPONÍVEIS NO GENBANK E DOS RESULTADOS DE Lin *et al.* (1991a)

Com a análise por RFLP do segmento de DNA delimitado pelos oligos BIGS21 e BIGS22 dos 20 VBIGs depositados no GenBank, após submetê-las à simulação restrição enzimática no programa WebGene, foi possível fazer um detalhamento discriminatório dos sítios de restrição enzimática e, conseqüentemente, dos fragmentos de DNA resultantes (Tabela 7). Além das considerações positivas deste fato e que já foram mencionadas no item 4.1, a ampliação das informações aumentou, consistentemente, a importância dos resultados e a profundidade da discussão. Adicionalmente aos resultados obtidos no GenBank + WebGene (Tabela 8), foi necessário “traduzir para uma linguagem universal matemática” as informações do mapa contendo sítios de restrição enzimática apresentado na análise por RFLP de 12 VBIGs (cinco japoneses) do trabalho de Lin *et al.* (1991a) e calcular o tamanho presuntivo dos fragmentos de DNA, coincidentes ou não, com os obtidos anteriormente (Tabelas 7, 8 e 9).

Visando a homogeneização das informações obtidas nas análises por RFLP dos 23 VBIGs (oito de referência e 15 isolados brasileiros) deste trabalho (Tabelas 6 e 10), dos 20 VBIGs com gene S2 disponíveis no GenBank (Tabela 8) e dos 12 VBIGs de Lin *et al.* (1991a) (Tabela 9), foi montada uma tabela (Tabela 7) considerada essencial à compreensão do conjunto do trabalho. Nesta tabela, foram discriminados 28 padrões (perfis) de restrição enzimática (PRE) englobando os oito padrões de corte (PC) encontrados na RFLP (análise inicial) deste trabalho (Tabelas 5 e 6). Alguns PRE (62, 63, 71, 73 e 83) somente foram estabelecidos em função da RFLP dos VBIGs do trabalho de Lin *et al.* (1991a) (Tabelas 7 e 9). Os fragmentos de DNA encontrados na análise por RFLP deste trabalho (Tabelas 5, 6 e 10) tiveram seus tamanhos aproximados determinados cruzando as informações das três diferentes

fontes, sendo, inicialmente, entre os VBIGs “homólogos” de referência (M-41, A-5968 / C-46, Ark-99, JMK, SE-17, UK/6-82, H-52 e Iowa-97) e, posteriormente, entre todos os outros (Tabelas 6, 8, 9 e 10). Diferentes enzimas de restrição que apresentaram resultados semelhantes quanto ao tamanho dos fragmentos de DNA gerados após a restrição enzimática, ajudaram na discriminação e/ou estabelecimento dos PREs, inclusive no provável posicionamento (5' → 3') dos fragmentos de DNA (bandas) encontrados, principalmente quando a opção foi única (ou corta com padrão único ou não). Certamente, a posição de migração das bandas em gel de agarose 3,5% utilizado neste trabalho (Tabela 5) não ajudou na identificação do posicionamento das mesmas.

Comparando os resultados deste trabalho com os do GenBank + WebGene e de Lin *et al.* (1991a), ficou comprovado que três VBIGs de referência (JMK, SE-17 e Iowa-97) são realmente VBIGs mas não os esperados. Os VBIGs JMK e SE-17 deste trabalho apresentaram um conjunto de PRE diferentes dos obtidos a partir dos dados do GenBank + WebGene e idênticos, ambos, ao do A-5968 / C-46 nas duas fontes adicionais de informação (Tabelas 8 e 9). O VBIG Iowa-97 deste trabalho apresentou um conjunto de PREs diferentes do mesmo obtido por Lin *et al.* (1991a) e idênticos ao M-42 (Beaudette) do GenBank + WebGene. Os outros VBIGs de referência (M-41, A-5968 / C-46, Ark-99 e UK/6-82), excetuando o H-52 [gene S2 indisponível no GenBank e não foi estudado por Lin *et al.* (1991a)], apresentaram conjuntos de PRE idênticos aos do GenBank + WebGene, sendo, no caso dos M-41 e A-5968 / C-46, idênticos aos PREs encontrados em Lin *et al.* (1991a), o que validou os resultados obtidos neste trabalho.

Com a determinação dos PREs dos VBIGs de referência, a despeito do problema da baixa resolução dos géis de agarose 3,5% e das inexatidões do tamanho e da posição (5' → 3') dos fragmentos de DNA obtidos na análise por RFLP deste trabalho, foi possível discriminar e/ou determinar os

PREs dos 15 isolados brasileiros estudados (Tabelas 3, 5, 6 e 10). A dificuldade descortinada com o surgimento dos PREs parecidos (após eletroforese em gel de agarose 3,5%) obtidos com as enzimas *Bst*YI (42 e 43), *Dde*I (11 e 12), *Hae*III (62 e 63), *Hin*fI (72 e 73), *Hpa*II (23 e 24) e *Mae*III (81, 82 e 83) foi resolvida analisando os resultados com as outras enzimas de restrição e as possibilidades individuais (presença ou ausência de restrição, caso a caso) em conjunto com os resultados encontrados no GenBank + WebGene e em Lin *et al.* (1991a). Este foi o caso, por exemplo, da *Hin*fI, onde a opção em bloco pelo PRE 72, de difícil discriminação do PRE 73, levou em conta os resultados dos VBIGs do GenBank + WebGene e de Lin *et al.* (1991a) e não poderia ser de outra forma. Desta maneira, não foi difícil optar pelos PREs mais prováveis (Tabela 10).

Dentre os isolados brasileiros (Tabelas 3, 6 e 10), os 297, 283 e 290, seguidos de perto pelos 351, G e TII, foram os que apresentaram maiores modificações no conjunto dos PREs encontrados, aproximando-os dos encontrados para os japoneses C-78 e K-79 e, também, dos europeus B-1648 (belga) e D-1466 (holandês). No caso dos PREs (81, 82 e 83) obtidos com a *Mae*III nos isolados 297, 283 e 290, e, portanto, de determinação mais complicada, a opção por qualquer um dos três PREs não mudou o resultado final substancialmente (são muito próximos) (Tabelas 7 e 10). Em sua maioria (nove), os isolados brasileiros apresentaram conjuntos de PREs individuais parecidos com os do M-41 e diferentes do A-5968 / C-46. Estas situações individuais ficaram evidentes quando da montagem das árvores filogenéticas (item 4.7).

O emprego do conjunto das nove enzimas de restrição (*Bst*YI, *Dde*I, *Hae*III, *Hin*cII, *Hin*fI, *Hpa*II, *Mae*III, *Pst*I e *Sc*aI) no diagnóstico de rotina (detecção direta do

VBIG por RT-PCR e análise por RFLP) é possível mas os resultados, também encontrados por Lin *et al.* (1991a) e nos VBIGs do GenBank + WebGene, confirmaram que a *Hin*fI, isoladamente, serviria para a identificação de grupo do VBIG, em um teste de triagem, logo após a RT-PCR [apenas a D-1466 apresentou um PRE diferente com esta enzima; a situação da verdadeira Iowa-97 (Lin *et al.*, 1991a) não é diferente quando da análise do gel (Tabelas 7, 8, 9 e 10)].

A redução de nove para cinco enzimas de restrição (neste caso, *Bst*YI, *Dde*I, *Hpa*II, *Pst*I e *Sc*aI) não mudou substancialmente os resultados e permitiu o agrupamento dos VBIGs com maiores afinidades no tocante ao conjunto dos PREs (item 4.7). Uma redução para quatro (excluindo a *Bst*YI) permitiu aglutinar aqueles relacionados (mesmo parcialmente) com a M-41 em um único bloco (grupo genotípico) mas não resolveu o posicionamento dos outros VBIGs, os quais permaneceram isolados ou agrupados.

Os VBIGs M-42 (Beaudette) das duas fontes de informações adicionais (GenBank + WebGene e Lin *et al.* 1991a) (Tabelas 8 e 9) apresentaram PREs distintos com a *Hin*cII, provavelmente devido ao fato de que este VBIG foi excessivamente manipulado em laboratório (Tabela 4) (Kusters *et al.*, 1989; Kusters *et al.*, 1990) e, por isto, não foi utilizado neste trabalho.

O conjunto dos PREs encontrados com as nove enzimas de restrição favoreceu a escolha das opções, provavelmente acertadas, quando PREs semelhantes foram encontrados, mas estas situações podem ser resolvidas definitivamente com a técnica de seqüenciamento genômico. Novas enzimas de restrição podem ser descobertas e, também, ajudar na solução destas questões.

Tabela 7 - Determinação dos padrões de restrição enzimática (PRE) com base nas informações obtidas nas seqüências flanqueadas pelos oligos BIGS21 e BIGS22 (gene codificador da glicoproteína S2) dos VBIGs disponíveis no GenBank (submetidos à análise por RFLP no WebGene), no mapa contendo os sítios de restrição enzimática de Lin *et al.* (1991a) e nos resultados deste trabalho.

ER ^a	FORE (G+W) ^b	FP ^c	TAFENT ^d	PRE ^e
<i>Ddel</i>	192 ; 208 ^f	192 ; 208	200 ; 200	11
<i>Ddel</i>	201 ; 199	201 ; 199	200 ; 200	12
<i>Scal</i>	206 ; 194	- ^g	200 ; 200	13
<i>Ddel</i>	163 ; 29 ; 208	-	220 ; 180	21
<i>HincII</i>	235 ; 165	235 ; 165	220 ; 180	22
<i>HpaII</i>	168 ; 232	168 ; 232	220 ; 180	23
<i>HpaII</i>	172 ; 228	-	220 ; 180	24
<i>Ddel</i>	144 ; 19 ; 159 ; 78	-	150 ; 150 ; 100	31
<i>HinfI</i>	143 ; 154 ; 21 ; 82	-	- ^h	32
<i>Ddel</i>	136 ; 243 ; 21	-	250 ; 150	41
<i>BstYI</i>	7 ; 268 ; 125	7 ; 268 ; 125	250 ; 150	42
<i>BstYI</i>	275 ; 125	275 ; 125	250 ; 150	43
<i>Scal</i>	251 ; 149	251 ; 149	250 ; 150	44
<i>HaeIII</i>	80 ; 320	80 ; 320	320 ; 80	51
<i>MaellI</i>	87 ; 313	87 ; 313	320 ; 80	52
<i>PstI</i>	28 ; 316 ; 56	28 ; 316 ; 56	320 ; 80	53
<i>BstYI</i>	365 ; 35	-	-	61
<i>HaeIII</i>	- ⁱ	20 ; 60 ; 320	350 ; 50	62
<i>HaeIII</i>	-	>320 ; <80	350 ; 50	63
<i>HpaII</i>	343 ; 57	-	-	64
<i>PstI</i>	344 ; 56	344 ; 56	350 ; 50	65
<i>BstYI</i>	-	7 ; 268 ; 90 ; 35	-	71
<i>HinfI</i>	297 ; 103	297 ; 103	300 ; 100	72
<i>HinfI</i>	-	297 ; 21 ; 82	300 ; 100	73
<i>MaellI</i>	307 ; 93	-	-	74
<i>MaellI</i>	87 ; 123 ; 190	-	220 ; 100 ; 80	81
<i>MaellI</i>	87 ; 211 ; 102	-	220 ; 100 ; 80	82
<i>MaellI</i>	-	87 ; 220 ; 93	220 ; 100 ; 80	83

a - ER = "Enzima de Restrição".

b - FORE (G + W) = "Fragmentos de DNA (posição 5' → 3', em nº de pb) Obtidos na Restrição Enzimática" das seqüências (flanqueadas pelos oligos BIGS21 e BIGS22) dos 20 VBIGs disponíveis no "GenBank" e submetidas à análise por RFLP no programa "WebGene".

c - FP = "Fragmentos de DNA (posição 5' → 3', em nº de pb) Presuntivos" estimados a partir das informações do mapa (contendo sítios de restrição enzimática de 12 VBIGs) apresentado no trabalho de Lin *et al.* (1991a).

d - TAFENT = "Tamanho Aproximado dos Fragmentos de DNA Encontrados (oito VBIGs de referência e 15 isolados brasileiros) Neste Trabalho" após análise por RFLP. O gel de agarose (neste trabalho, a eletroforese foi realizada em gel de agarose 3,5%) apresenta baixa resolução para fragmentos de DNA (bandas) com menos de 100 pb (pares de bases).

e - PRE = "Padrão de Restrição Enzimática" encontrado. Os números foram designados visando uniformizar as informações dos três trabalhos, quando possível.

f - número de pares de bases dos fragmentos de DNA após restrição enzimática.

g - PRE não encontrado (13; 21; 24; 31; 32; 41; 61; 64; 74; 81; 82) na RFLP dos 12 VBIGs estudados por Lin *et al.* (1991a).

h - PRE não encontrado (32; 61; 64; 71; 74) na RFLP dos 23 VBIGs (oito de referência e 15 isolados) deste trabalho.

i - PRE não encontrado (62; 63; 71; 73; 83) na RFLP (WebGene) dos 20 VBIGs cujos genes S2 estão disponíveis no GenBank.

4.7. ÁRVORES FILOGENÉTICAS

Analisando as seqüências de S2 delimitadas pelos oligos BIGS21 e BIGS22 dos 20 VBIGs que estão disponíveis no GenBank, verificou-se que poucas mudanças ocorreram nesta região, quando comparadas com o VBIG M-41, caracterizadas, basicamente, por substituições de alguns nucleotídeos [apenas três (B-1648, CAV-1013 e D-1466), apresentaram maiores variações]. Esta variabilidade mínima foi o motivo da escolha desta região para estudo por Lin *et al.* (1991a), após comparação das seqüências completas dos genes S1 e S2 dos VBIGs M-41, M-42 / Beaudette, KB-8523 e UK/6-82, e, também, neste trabalho, considerando que tal fato viabilizaria a construção de árvores filogenéticas.

As árvores filogenéticas foram construídas com raiz (*rooted tree*) ou sem (*unrooted tree*) a partir das informações obtidas na RFLP comparada de todas as análises por RFLP [GenBank + WebGene (Tabela 8), Lin *et al.*, 1991a (Tabela 9) e deste trabalho (Tabela 10)], conforme metodologia específica para este fim de Link *et al.* (1995); Saitou & Nei (1987); Studier & Keppler (1988); Swofford *et al.* (1996); Van de Peer & De Wachter (1994).

Pelas razões anteriormente descritas (item 4.6), os VBIGs (JMK, SE-17 e Iowa-97) que apresentaram PREs diferentes neste estudo foram excluídos da referida análise de dados e, conseqüentemente, da construção e desenho das árvores filogenéticas (Link *et al.*, 1995; Saitou & Nei, 1987; Studier & Keppler, 1988; Swofford *et al.*, 1996; Van de Peer & De Wachter, 1994). Os que foram utilizados se referem aos dados dos VBIGs idênticos disponíveis no GenBank (JMK e SE-17) e o Iowa-97 de Lin *et al.* (1991a).

Os VBIGs com resultados idênticos em duas (Ark-99 e UK/6-82) ou três fontes de informações (M-41 e A-5968 / C-46) foram considerados como sendo de fonte única. Os dois VBIGs M-42 (Beaudette) que apresentaram uma pequena diferença entre si (item 4.6), foram incluídos mas com a

sigla da fonte de informação [M-42 (L) de Lin *et al.* (1991a) e M-42 (G) de GenBank + WebGene] para evitar confusão.

Primeiramente, árvores filogenéticas com raízes foram construídas [uma usando o M-41 (Figura 15) e outra o H-52 (Figura 16) como VBIGs raízes ou parentais ou precursores ancestrais] com os resultados (RFLP) obtidos com as nove enzimas de restrição nas três fontes de informações envolvendo todos os VBIGs (aqueles com resultados idênticos em diferentes fontes de informações foram agrupados para evitar repetições) (Figuras 15 e 16). Para isto, foram utilizados agrupados (conforme Link *et al.*, 1995) os resultados da RFLP dos 15 isolados deste trabalho (Tabelas 6 e 10), daqueles (20 VBIGs) cujos genes S2 (parte flanqueada pelos oligos BIGS21 e BIGS22) estão publicados no GenBank (Tabela 8) e dos (sete VBIGs e cinco isolados) utilizados por Lin *et al.* (1991a) (Tabela 9).

Quanto às árvores com raízes, os VBIGs M-41 e H-52 foram escolhidos como parentais, separadamente, pelas seguintes razões: o M-41 foi utilizado, informalmente e não oficialmente, no controle do VBIG na avicultura industrial brasileira (décadas de 60 e 70), como vacina viva atenuada contrabandeada dos EUA; o H-52, oficialmente autorizado para uso no controle do VBIG no Brasil a partir de 1980 (Villa, 1998), foi utilizado, emergencialmente e, também não oficialmente, desde o início da década de 70 por algumas grandes empresas do segmento avícola, inclusive no estado de Minas Gerais.

Neste estudo, também foram testadas reduções nos números das enzimas de restrição utilizadas na RFLP [por exemplo, de nove para cinco (*Bst*YI, *Ddel*, *Hpa*II, *Pst*I e *Scal* - Figuras 17 e 18), substituição de uma enzima (troca da *Bst*Y pela *Ma*eIII, mantendo cinco enzimas - Figuras 19 e 20) e redução para quatro enzimas (*Ddel*, *Hpa*II, *Pst*I e *Scal*, sem a *Bst*YI e a *Ma*eIII - Figuras 21 e 22)] quando da montagem das árvores filogenéticas visando simplificar a metodologia utilizada.

Árvores filogenéticas sem raízes e somente com os 15 isolados brasileiros, as quais pareceram estar mais próximas da nossa realidade [as árvores são “sem raiz” porque a(s) posição(ões) do(s) hipotético(s) VBIG(s) ancestral(is) é(são) desconhecida(s)], com nove (Figuras 23 e 24) e cinco (*Bst*YI, *Ddel*, *Hpa*II, *Pst*I e *Sca*I - Figuras 25 e 26) enzimas de restrição utilizadas na RFLP deste estudo, foram montadas com outra

forma de apresentação (circular) para um melhor entendimento da situação regional daquele momento. Infelizmente, nestas árvores sem raízes, não foi possível calcular as percentagens das distâncias filogenéticas (análise *bootstrap* - item 3.12), mas os comprimentos das linhas (galhos) refletem perfeitamente estes distanciamentos (Zwaagstra *et al.*, 1992; Van de Peer & De Wachter, 1994).

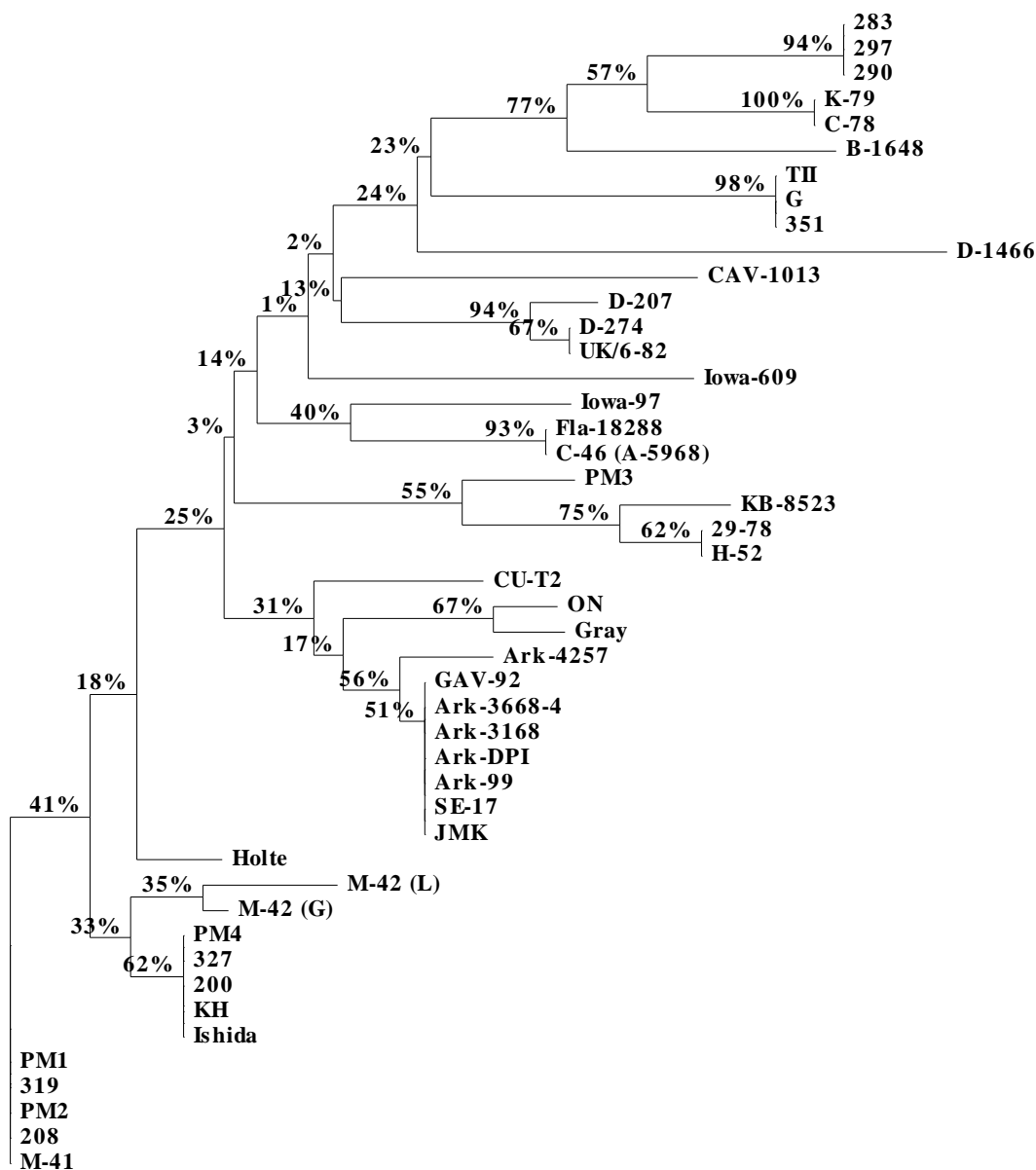


Figura 15 - Árvore filogenética de VBIGs usando o VBIG M-41 como raiz (parental) e o programa TREECON. As porcentagens (indicam alta repetibilidade no *bootstrap* e refletem os distanciamentos genéticos) foram calculadas a partir dos resultados da análise por RFLP com nove enzimas de restrição (*Bst*Y1, *Dde*I, *Hae*III, *Hinc*II, *Hinf*I, *Hpa*II, *Mae*III, *Pst*I e *Sca*I) de parte do gene S2 de 46 VBIGs procedentes de três fontes de informações (GenBank + WebGene, Lin *et al.*, 1991a e deste trabalho).

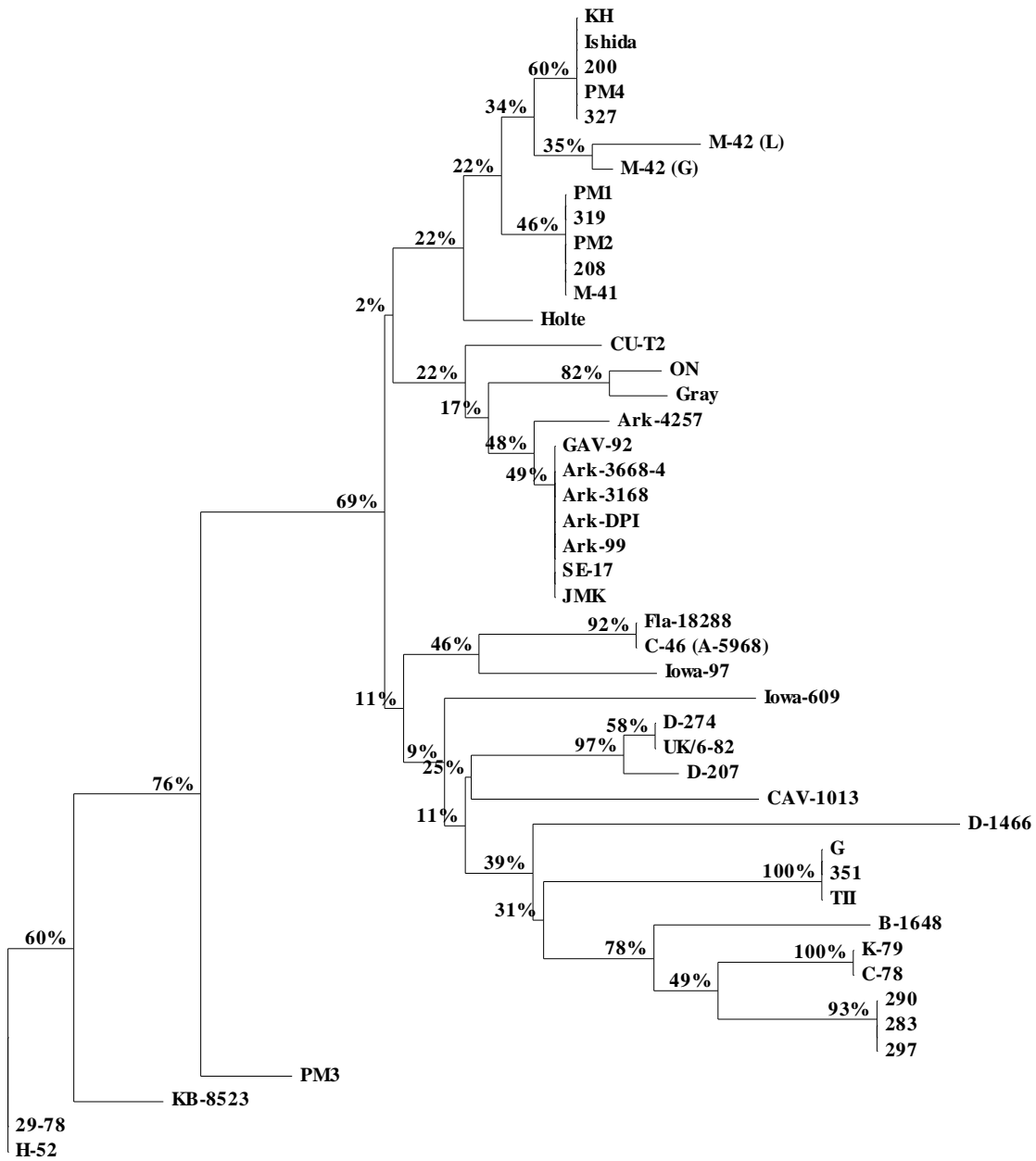


Figura 16 - Árvore filogenética de VBIGs usando o VBIG H-52 como raiz (parental) e o programa TREECON. As porcentagens (indicam alta repetibilidade no *bootstrap* e refletem os distanciamentos genéticos) foram calculadas a partir dos resultados da análise por RFLP com nove enzimas de restrição (*Bst*YI, *Dde*I, *Hae*III, *Hinc*II, *Hinf*I, *Hpa*II, *Mae*III, *Pst*I e *Sca*I) de parte do gene S2 de 46 VBIGs procedentes de três fontes de informações (GenBank + WebGene, Lin *et al.*, 1991a e deste trabalho).

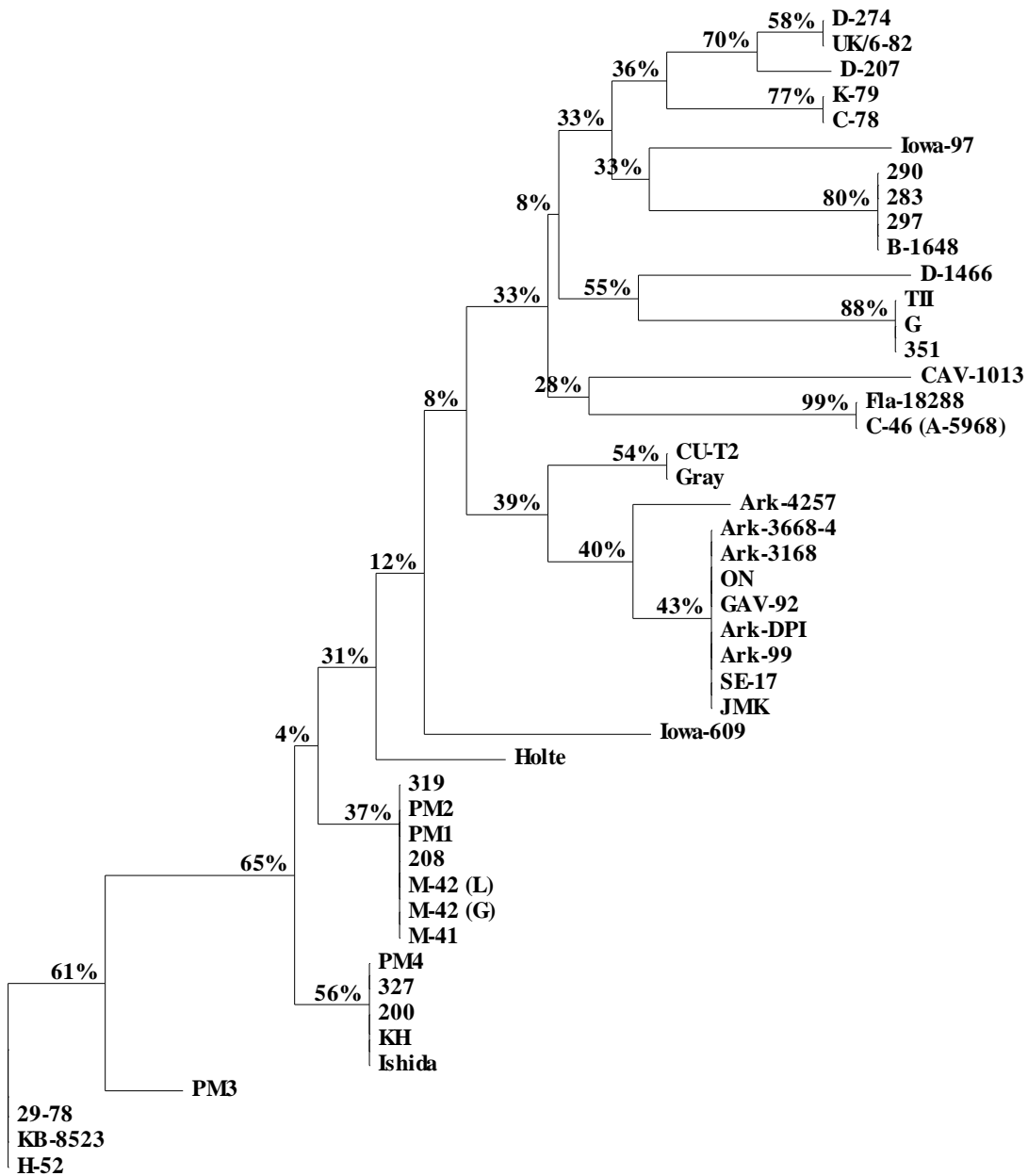


Figura 18 - Árvore filogenética de VBIGs usando o VBIG H-52 como raiz (parental) e o programa TREECON. As porcentagens (indicam alta repetibilidade no *bootstrap* e refletem os distanciamentos genéticos) foram calculadas a partir dos resultados da análise por RFLP com cinco enzimas de restrição (*Bst*YI, *Dde*I, *Hpa*II, *Pst*I e *Sca*I) de parte do gene S2 de 46 VBIGs procedentes de três fontes de informações (GenBank + WebGene, Lin *et al.*, 1991a e deste trabalho).

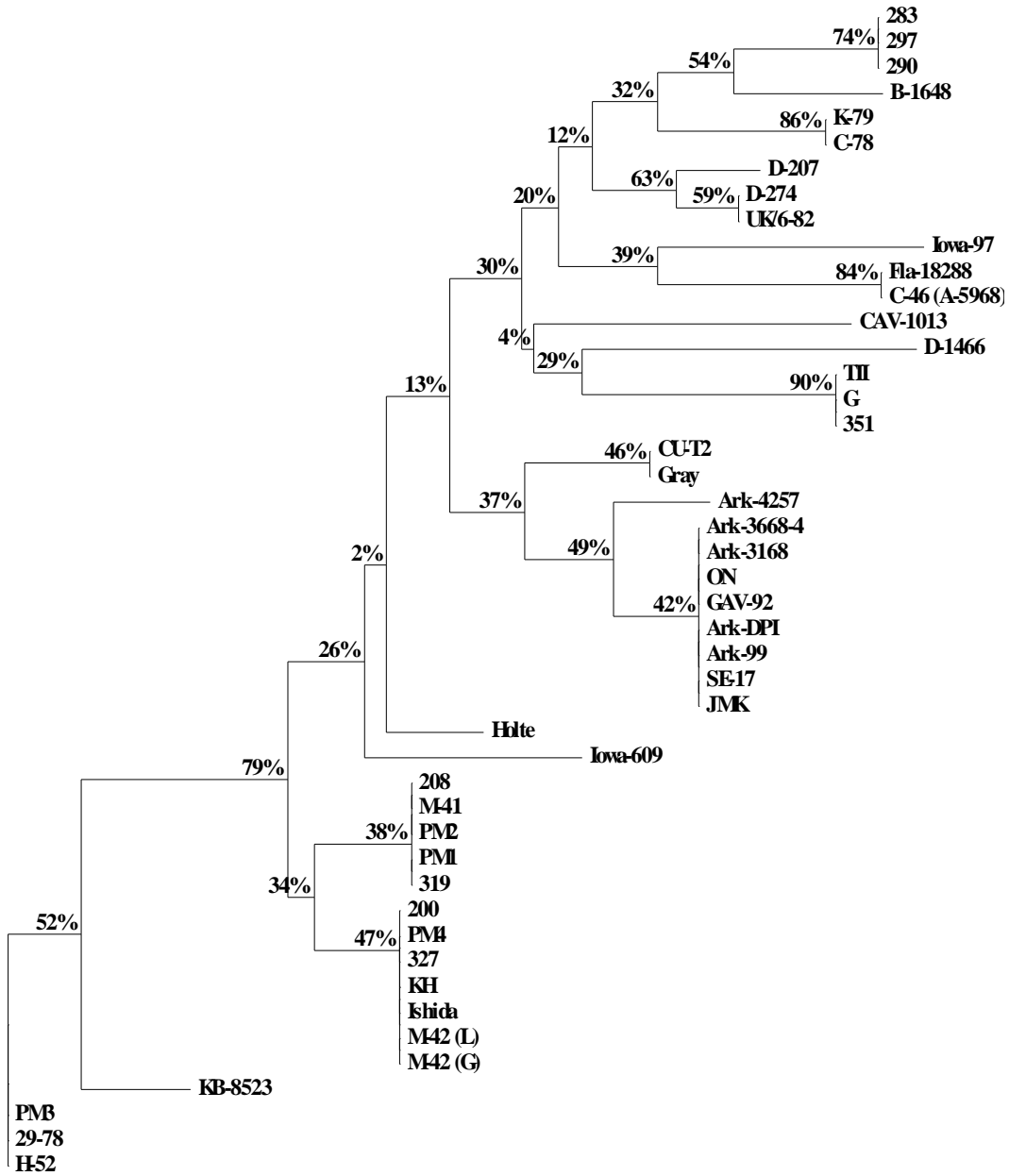


Figura 20 - Árvore filogenética de VBIGs usando o VBIG H-52 como raiz (parental) e o programa TREECON. As porcentagens (indicam alta repetibilidade no *bootstrap* e refletem os distanciamentos genéticos) foram calculadas a partir dos resultados da análise por RFLP com cinco enzimas de restrição (*DdeI*, *HpaII*, *MaeIII*, *PstI* e *ScaI* - sem a *BstYI*) de parte do gene S2 de 46 VBIGs procedentes de três fontes de informações (GenBank + WebGene, Lin *et al.*, 1991a e deste trabalho).

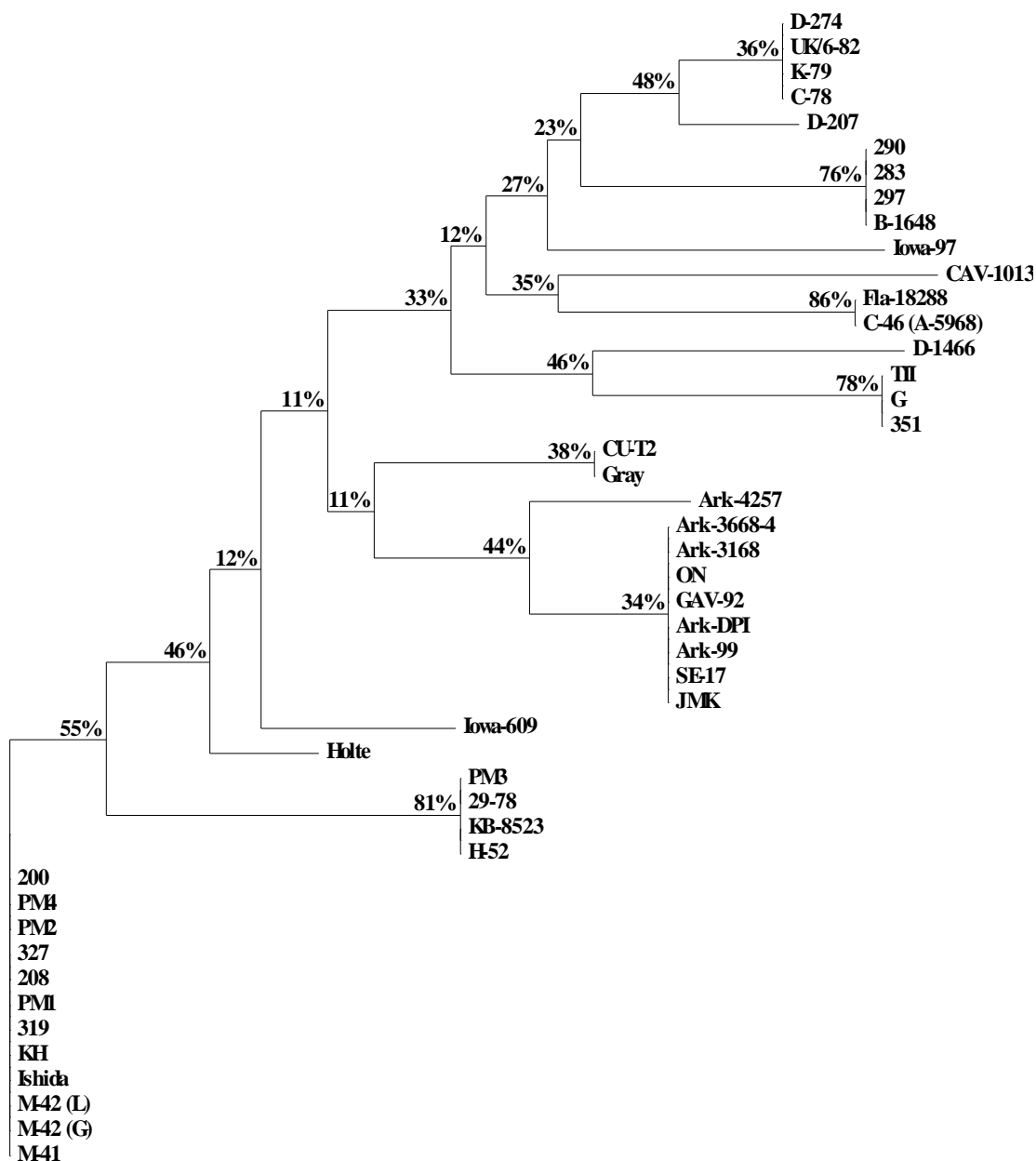


Figura 21 - Árvore filogenética de VBIGs usando o VBIG M-41 como raiz (parental) e o programa TREECON. As porcentagens (indicam alta repetibilidade no *bootstrap* e refletem os distanciamentos genéticos) foram calculadas a partir dos resultados da análise por RFLP com quatro enzimas de restrição (*Ddel*, *HpaI*, *PstI* e *ScaI* - sem a *BstYI*) de parte do gene S2 de 46 VBIGs procedentes de três fontes de informações (GenBank + WebGene, Lin *et al.*, 1991a e deste trabalho).

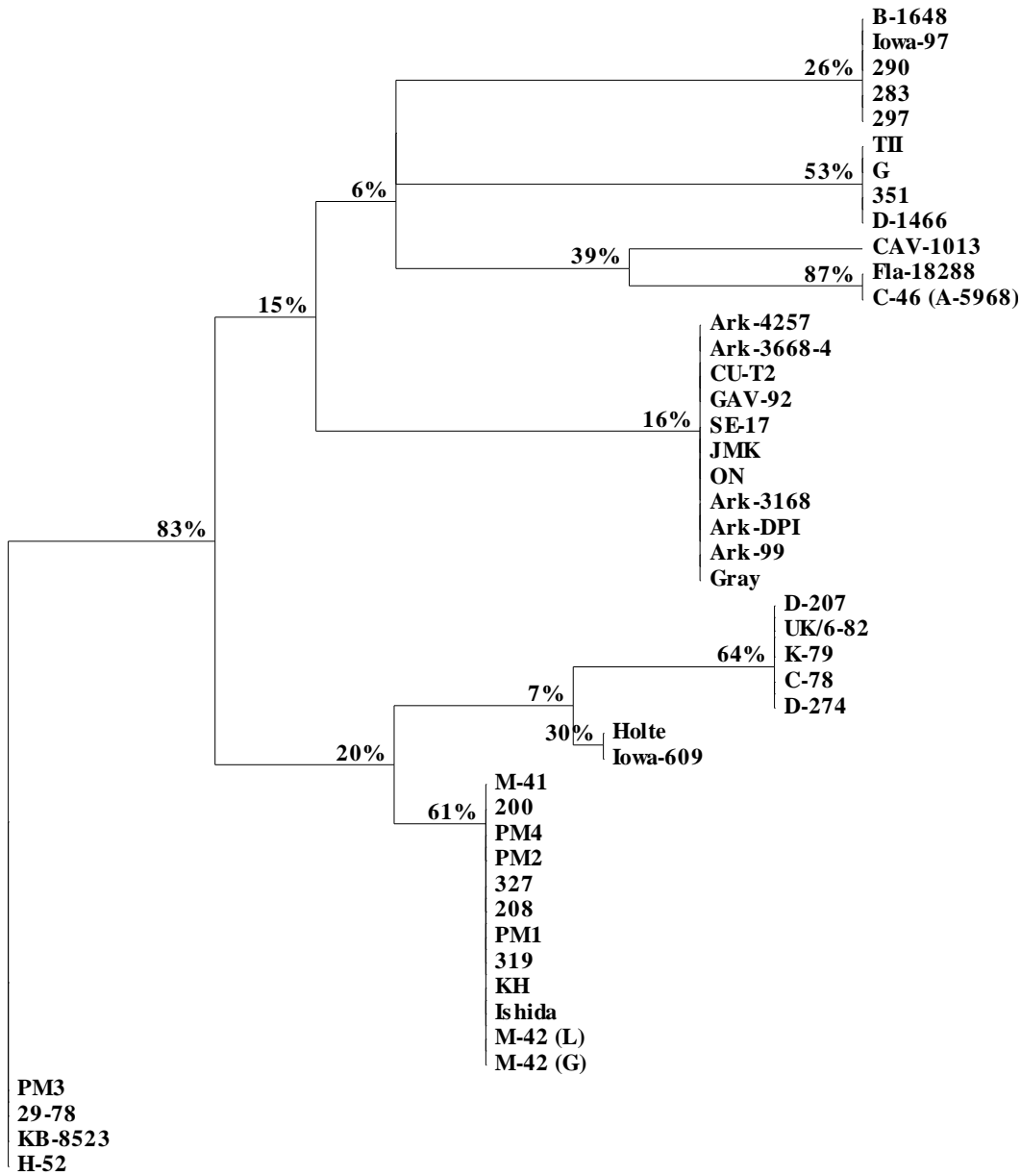


Figura 22 - Árvore filogenética de VBIGs usando o VBIG H-52 como raiz (parental) e o programa TREECON. As porcentagens (indicam alta repetibilidade no *bootstrap* e refletem os distanciamentos genéticos) foram calculadas a partir dos resultados da análise por RFLP com quatro enzimas de restrição (*DdeI*, *HpaII*, *PstI* e *ScaI* - sem a *BstYI*) de parte do gene S2 de 46 VBIGs procedentes de três fontes de informações (GenBank + WebGene, Lin *et al.*, 1991a e deste trabalho).

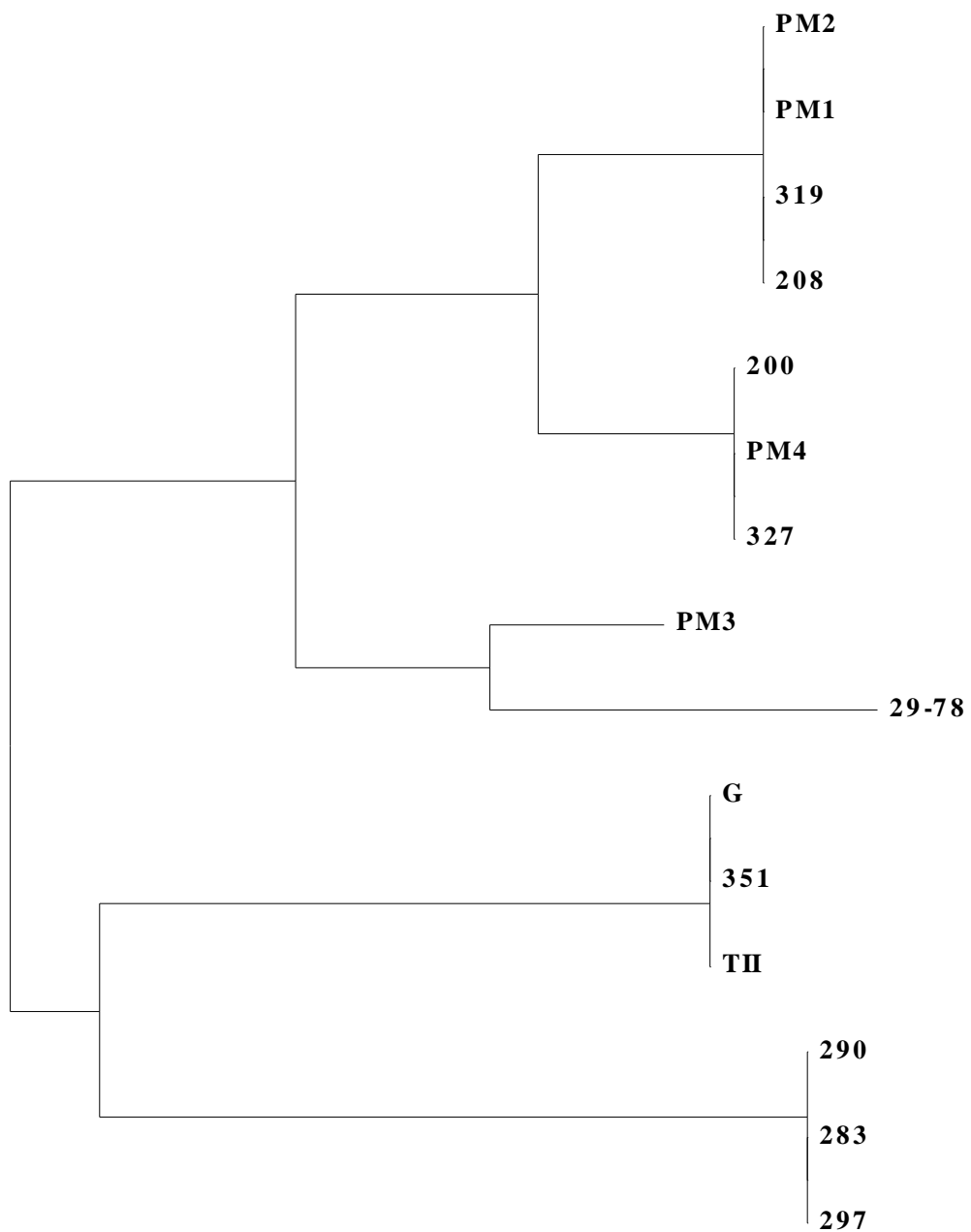


Figura 23 - Árvore filogenética de quinze isolados brasileiros do VBIG. A árvore é sem raiz, isto é, a posição do(s) hipotético(s) VBIG(s) ancestral(is) é desconhecida. Usando o programa TREECON, os comprimentos dos “galhos” da árvore foram calculados a partir dos resultados da análise por RFLP com nove enzimas de restrição (*Bst*YI, *Dde*I, *Hae*III, *Hinc*II, *Hinf*I, *Hpa*II, *Mae*III, *Pst*I e *Sca*I) de parte do gene S2.

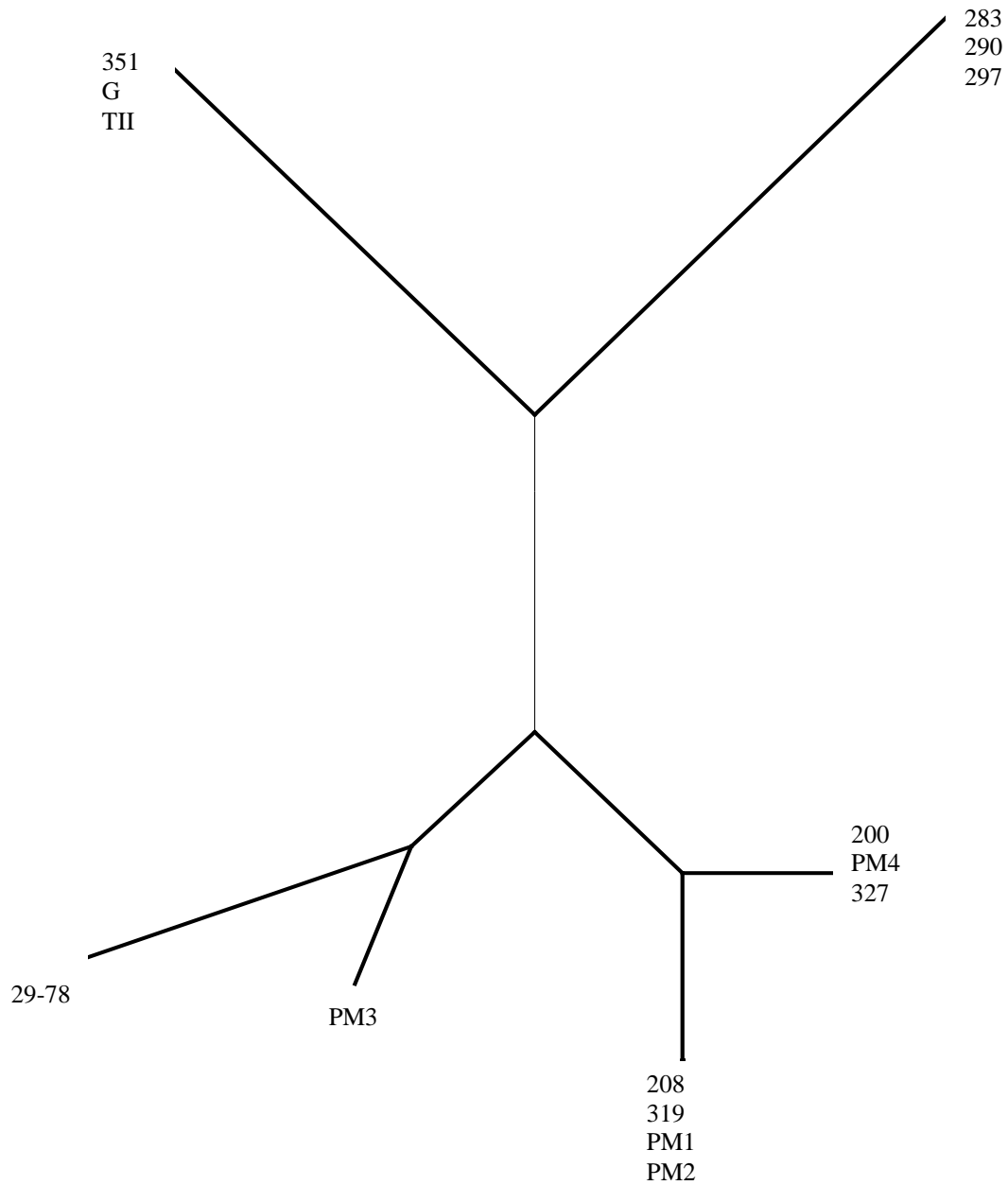


Figura 24 - Árvore filogenética no formato circular de quinze isolados brasileiros do VBIG. A árvore é sem raiz, isto é, a posição do(s) hipotético(s) VBIG(s) ancestral(is) é desconhecida. Usando o programa TREECON, os comprimentos dos “galhos” da árvore foram calculados a partir dos resultados da análise por RFLP com nove enzimas de restrição (*Bst*YI, *Dde*I, *Hae*III, *Hin*CI, *Hin*FI, *Hpa*II, *Mae*III, *Pst*I e *Sca*I) de parte do gene S2.

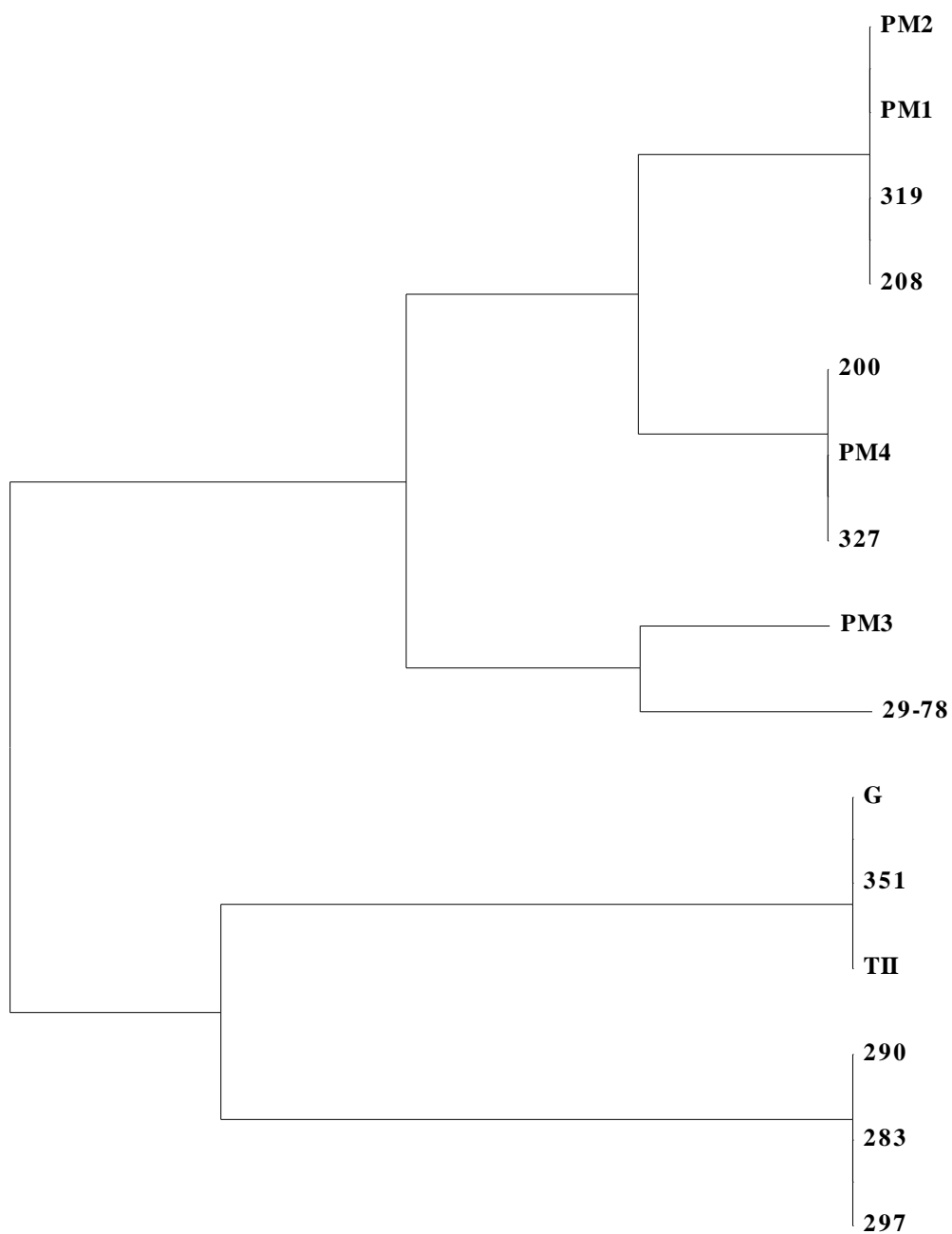


Figura 25 - Árvore filogenética de quinze isolados brasileiros do VBIG. A árvore é sem raiz, isto é, a posição do(s) hipotético(s) VBIG(s) ancestral(is) é desconhecida. Usando o programa TREECON, os comprimentos dos “galhos” da árvore foram calculados a partir dos resultados da análise por RFLP com cinco enzimas de restrição (*Bst*YI, *Dde*I, *Hpa*II, *Pst*I e *Sca*I) de parte do gene S2.

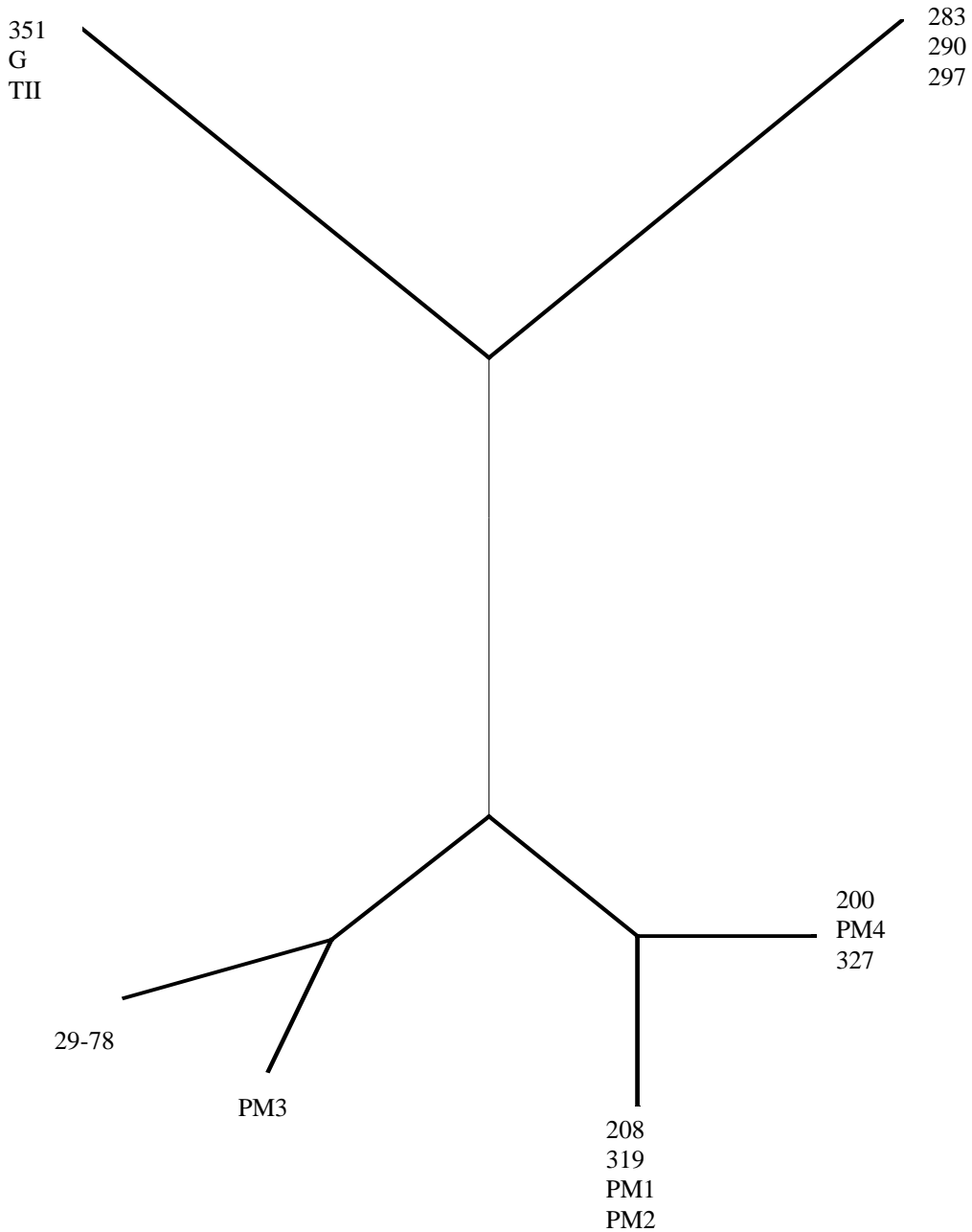


Figura 26 - Árvore filogenética no formato circular de quinze isolados brasileiros do VBIG. A árvore é sem raiz, isto é, a posição do(s) hipotético(s) VBIG(s) ancestral(is) é desconhecida. Usando o programa TREECON, os comprimentos dos “galhos” da árvore foram calculados a partir dos resultados da análise por RFLP com cinco enzimas de restrição (*Bst*YI, *Dde*I, *Hpa*II, *Pst*I e *Sca*I) de parte do gene S2.

As árvores filogenéticas contendo os 46 VBIGs (incluindo os 15 isolados brasileiros) foram construídas (programa TREECON) a partir dos resultados obtidos na análise por RFLP com nove enzimas de restrição, independente do VBIG usado como raiz ou “parental” (M-41 ou H-52), mostraram resultados (as porcentagens indicam alta repetibilidade no *bootstrap* e refletem os distanciamentos genéticos) com topologia semelhante para os mesmos isolados e VBIGs.

Para árvores filogenéticas montadas com os mesmos 46 VBIGs, mas com os resultados obtidos com cinco (inicialmente, foram escolhidas, ao acaso, *Bst*YI, *Dde*I, *Hpa*II, *Pst*I e *Scal*I, e, posteriormente, foi usado o mesmo grupo mas substituindo a *Bst*YI pela *Mae*III) ou quatro enzimas de restrição (*Dde*I, *Hpa*II, *Pst*I e *Scal*I), independente do VBIG usado como “parental” (M-41 ou H-52), os resultados foram parecidos, principalmente quanto à topologia, com aqueles obtidos nas árvores com nove enzimas. Houve um desejável agrupamento daqueles VBIGs com menores distanciamentos genéticos e, conseqüentemente, maiores relacionamentos genéticos. Também, não ocorreu comprometimento real do distanciamento genético, principalmente daqueles VBIGs que realmente são diferentes e estão publicados no GenBank (Tabelas 4, 8 e 11), acompanhados dos isolados japoneses (Lin *et al.*, 1991a) e dos brasileiros (Tabelas 3, 9 e 10). Naquelas árvores com cinco enzimas de restrição onde a *Mae*III substituiu a *Bst*YI (Figuras 19 e 20) e nas com apenas quatro (*Dde*I, *Hpa*II, *Pst*I e *Scal*I - Figuras 21 e 22), apesar do desejável agrupamento dos VBIGs e isolados mais relacionados, o distanciamento genético aumentou exageradamente entre as “parentais” e os outros VBIGs diferentes estudados. Este problema ficou evidenciado no caso da árvore filogenética que teve o VBIG H-52 como raiz (Figura 22).

Analisando todas as árvores filogenéticas que possuem o H-52 como “parental” (Figuras 16, 18, 20 e 22), independente do

número de enzimas de restrição, ficou claro que o isolado brasileiro 29-78, provavelmente, é o próprio H-52. Em seguida, o VBIG japonês KB-8523 mostrou ter grande relacionamento genético com o H-52 (genes S1 + S2 - Kusters *et al.*, 1990; Sutou *et al.*, 1988), seguido pelo isolado brasileiro PM3. Os brasileiros 327, PM4 e 200, os quais estão persistentemente juntos com os japoneses Ishida e KH, também apresentaram um forte relacionamento genético com o H-52, seguidos pelo grupo composto pelos norte-americanos M-41, M-42 [‘G’ (fonte: GenBank) e ‘L’ (fonte: Lin *et al.*, 1991a)] e dos brasileiros 208, 319, PM1 e PM2.

As árvores filogenéticas que possuem o M-41 como “parental” (Figuras 15, 17, 19 e 21), independente do número de enzimas de restrição empregadas, mostraram que os isolados brasileiros 208, 319, PM1 e PM3, provavelmente, são o próprio M-41. O norte-americano M-42 (G e L) mostrou ter um forte relacionamento genético com a M-41, o que está correto e de acordo com a literatura (genes S1 + S2 - Adzhar *et al.*, 1996; Binns *et al.*, 1985; Kwon *et al.*, 1993a; Kusters *et al.*, 1989a,b; Kusters *et al.*, 1990; Zwaagstra *et al.*, 1992). Em seguida, os permanentemente agrupados - isolados brasileiros 327, PM4 e 200 e os japoneses Ishida e KH - foram os que apresentaram maior relacionamento genético, seguidos dos brasileiros 29-78 e PM3, do japonês KB-8523 e do holandês H-52.

As árvores filogenéticas, sem raiz, construídas apenas com os quinze isolados brasileiros, independente se os resultados da análise por RFLP foram obtidos com nove (Figuras 23 e 24) ou cinco (Figuras 25 e 26) enzimas de restrição, mostraram resultados semelhantes e comprovaram que, mesmo sem a importantíssima RFLP comparada, o agrupamento dos isolados foi preservado mantendo dois troncos básicos de relacionamento genético: um composto pelos isolados 208, 319, PM1, PM2, 200, PM4, 327, 29-78 e PM3 e, outro, composto pelos 290, 283, 297, 351, G e TII. Entretanto, do ponto de vista filogenético ou da filogenia, estes dois troncos pareceram

não ter a mesma origem ancestral, mas para comprovar esta hipótese, novos estudos precisam ser realizados.

Os VBIGs 297, 283 e 290 foram isolados de frangos de corte com doença respiratória, provenientes de três diferentes granjas que não vacinavam contra o VBIG, sendo que, em uma delas (283), concomitantemente, ocorreu síndrome nefrite - nefrose e elevada mortalidade. Estes três VBIGs podem ser um único vírus porque os surtos da BIG correspondentes aconteceram na mesma região (Alto São Francisco - alta concentração avícola) e no mesmo ano (1983), apesar dos meses de ocorrência [maio (283), julho (290) e agosto (297)] também terem sido diferentes.

Os VBIGs 351, G e TII, também, podem ser um único vírus, a despeito de terem sido isolados a partir de lotes apresentando surtos da BIG em anos diferentes (Tabela 3) mas as regiões de origem (Alto São Francisco e Metalúrgica) são vizinhas e, ambas, têm alta concentração avícola. Esta situação indica que este provável VBIG único permaneceu circulando naquela região por quase dez anos.

Os isolados 283, 290, 297, 351, G e TII, curiosamente, só tiveram seus produtos adequadamente amplificados por RT-PCR após a otimização (item 4.4.3) e esta situação pareceu refletir importantes substituições de nucleotídeos localizados nas seqüências complementares aos oligos BIGS21 e BIGS22 (Tabela 11), o que geraria um anelamento mais complicado durante a amplificação (Newton, 1995; Powell, 1995). Nas árvores filogenéticas com todos os 46 VBIGs (Figuras 15, 16, 17 e 18), independente dos resultados terem sido obtidos com nove ou cinco enzimas de restrição, esta hipótese ficou reforçada em razão do parentesco com VBIGs portadores de variações nas regiões dos oligos (B-1648, CAV-1013 e D-1466) mas a comprovação definitiva somente virá com o seqüenciamento do segmento de DNA estudado.

Caso os isolados dos grupos com mesmas características filogenéticas (por exemplo:

283, 290 e 297 e/ou 351, G e TII) sejam, por grupo, um mesmo vírus, apesar de procedentes de surtos que ocorreram em granjas, épocas e regiões distintas, esta situação de circulação e, também, de manutenção de vírus em uma região, favorece enormemente o VBIG, perpetuando-o naquela região (Cavanagh & Naqi, 1997; Cook, 1984; Doi *et al.*, 1982; Gelb *et al.*, 1981; Gelb *et al.*, 1983; Ignjatovic *et al.*, 1997; Kusters *et al.*, 1987; Lin *et al.*, 1991b; Resende, 1983). Tal situação é decorrente de uma característica típica da avicultura industrial que é a alta aglomeração de granjas (alta densidade avícola) em uma determinada área, geralmente objetivando minimizar custos de produção.

Analisando as árvores filogenéticas com raiz contendo 46 VBIGs (M-41 e H-52), independente do número de enzimas de restrição (nove, cinco ou quatro), ficou evidenciada a maior participação do M-41 como "parental" do que o H-52 nos isolados brasileiros e este fato refletiu, seguramente, a situação no universo (isolados virais presentes em uma determinada região e dentro de um período de tempo) estudado naquele momento.

Nenhum estudo de filogenia envolvendo tantos VBIGs (46) foi realizado, conforme verificado nos vários trabalhos realizados a respeito, independente das metodologias empregadas na obtenção de dados serem similares às deste trabalho. Outros estudos foram feitos empregando RT-PCR / RFLP (parte do gene S2 - Lin *et al.*, 1991a), comparação de seqüências de nucleotídeos (parte do gene N - Zwaagstra *et al.*, 1992; parte do gene S1 - Wang & Tsai, 1996) ou de seqüências de aminoácidos de proteínas a partir de seqüenciamento genômico (genes S1 e S2 completos, e, parte final do NS e inicial do M - Kusters *et al.*, 1989b; Kusters *et al.*, 1990). Entretanto, os únicos trabalhos que podem ter seus resultados filogenéticos diretamente comparados com os deste trabalho foram, obviamente, o de Lin *et al.* (1991a), com resultados idênticos, mas, agora, inserido em um universo amostral comparativo mais amplo, e o de Kusters *et al.* (1990), no qual o gene S2 foi

estudado fracionado em três partes, sequenciado e traduzido para as seqüências de aminoácidos correspondentes. O excelente estudo de Kusters *et al.* (1990) utilizou seis importantes VBIGs (M-41, M-42 / Beaudette, KB-8523, UK/6-82, D-207 e D-1466) e, na primeira parte do gene S2 (englobando a região utilizada neste estudo), os resultados da árvore filogenética sem raiz foram idênticos ao deste trabalho com os mesmos VBIGs, inclusive na árvore filogenética sem raiz construída com resultados do seqüenciamento e tradução (para proteína) do gene total S1 destes VBIGs. Noutro excelente estudo realizado anteriormente por Kusters *et al.* (1989b), com sete VBIGs (cinco idênticos aos deste trabalho: M-41, M-42 / Beaudette, UK/6-82, D-207 e D-1466) e baseado no seqüenciamento e alinhamento comparativo de seqüências de nucleotídeos do gene S1 total, uma árvore filogenética sem raiz foi construída e os resultados foram semelhantes aos deste trabalho (mesma topologia). Os resultados das árvores filogenéticas sem raízes de outros estudos com genes diferentes do utilizado neste trabalho (Wang & Tsai, 1996; Zwaagstra *et al.*, 1992) não puderam ser comparados porque VBIGs muito diferentes (exemplo: M-41, KB-8523, D-207 e D-274) ficaram agrupados com base no seqüenciamento de parte do gene N (Zwaagstra *et al.*, 1992), o que está correto porque o gene (N) é muito conservado (Abreu, 2000; Cavanagh & Naqi, 1997), e, no caso do seqüenciamento de parte do gene S1 (Wang & Tsai, 1996), a árvore foi construída apenas com 12 isolados de Taiwan, sem utilizar nenhum VBIG (estirpe de referência) como parâmetro de comparação.

4.8. GENOTIPIFICAÇÃO

Até 1998, a genotipificação somente estava relacionada com a sorotipificação tradicional quando o gene S1 (total ou parcial) era estudado por RT-PCR / RFLP e/ou seqüenciamento genômico (Cavanagh *et al.*, 1988; Cavanagh *et al.*, 1997; Cavanagh & Naqi, 1997; Jackwood *et al.*, 1997; Kwon *et al.*, 1993a,b; Song *et al.*, 1998; Wang & Tsai, 1996). Recentemente (Callison *et al.*,

1999), porém, foi comprovado que a variabilidade no gene S2 (seqüências de nucleotídeos) pode afetar, principalmente, a sorotipificação baseada exclusivamente na glicoproteína S1, apesar do fato de que a genotipificação por análise do mesmo gene (S1), em tese, não estar alterada, porque a estrutura tridimensional da glicoproteína S1 pode ficar modificada neste caso, ainda que de forma sutil mas significativa (genotipificação ≠ sorotipificação).

A genotipificação proposta por Lin *et al.* (1991a,b), baseada na análise por RFLP de parte do gene S2 amplificada por RT-PCR, idêntica à realizada neste trabalho, foi criticada por Kwon *et al.* (1993a), não porque existia discrepância no relacionamento genotipo / sorotipo, mas devido ao grande número de enzimas de restrição necessárias à RFLP (nove) e, também, ao baixo número de VBIGs de campo estudados (cinco japoneses, sendo três vacinais - Tabelas 4 e 9).

A situação de hipervariabilidade do gene S1 associada à variabilidade mínima do gene S2, mas que pode alterar significativamente a conformação da glicoproteína S1 (Callison *et al.*, 1999), corroborou, conseqüentemente, com a necessidade de um novo estudo de genotipificação com o gene S2 mais amplo como foi o deste estudo. Também, como reforço no sentido de justificar o estudo do gene S2, obviamente sem descartar os necessários estudos com os outros genes [S1 (Santiago *et al.*, 2000), N (Abreu, 2000) e outros], é importante salientar que o S2, assim como o N, devido à maior similaridade inter-VBIGs, estaria mais sujeito à recombinação homóloga entre VBIGs diferentes do que o gene S1 (Cavanagh *et al.*, 1992a; Jia *et al.*, 1995; Kusters *et al.*, 1990).

Analisando as árvores filogenéticas sem raízes, construídas com resultados da RFLP dos 46 VBIGs obtidos das três fontes de informações (GenBank + WebGene, Lin *et al.*, 1991a e dos quinze isolados deste trabalho) empregando nove (Figura 27) e cinco (Figura 28) enzimas de restrição, foi encontrada uma grande correlação entre genotipificação (13 genótipos) e a

sorotipificação tradicional (Cavanagh *et al.*, 1997; Cavanagh & Naqi, 1997; Jackwood *et al.*, 1997; Kwon *et al.*, 1993a,b; Kusters *et al.*, 1990; Song *et al.*, 1998; Wang & Tsai, 1996). A redução de nove para cinco no número de enzimas de restrição não alterou os agrupamentos em genótipos e nem as situações individuais, sendo, portanto, uma contribuição deste trabalho na simplificação da metodologia utilizada. Três genótipos distintos foram encontrados no tocante aos isolados brasileiros: um denominado “Massachusetts” (29-78, 208, 319, 327, PM1, PM2, PM3, PM4 e 200), outro denominado “351 / G / TII” com os isolados homônimos e outro “283 / 290 / 297 / B-1648”, agrupando os três isolados homônimos e o variante belga B-1648 (Meulemans *et al.*, 1987).

Os resultados encontrados na genotipificação (gene S1 inteiro) proposta por Kwon *et al.* (1993a,b) e Jackwood *et al.* (1997) para os genótipos / sorótipos “Massachusetts”, “Connecticut”, “Holte”, “Iowa-97” e “Arkansas” foram os mesmos neste trabalho. Entretanto, os VBIGs JMK e Gray, classificados como sendo do genótipo único “JMK” pelo gene S1 (Kwon *et al.* 1993a,b; Jackwood *et al.*, 1997), ficaram próximos neste estudo com parte do gene S2 mas agrupados em genótipos diferentes (o JMK no “Arkansas” e o Gray no “Gray / CU-T2”). Ocorreram, também, discrepâncias com o SE-17 e o GAV-92, pertencentes aos genótipos / sorótipos “SE-17” e “Variante”, respectivamente, nos estudos com o gene S1 (Avellaneda *et al.*, 1994; Kwon *et al.* 1993a,b; Jackwood *et al.*, 1997), os quais ficaram agrupados no genótipo “Arkansas” neste estudo.

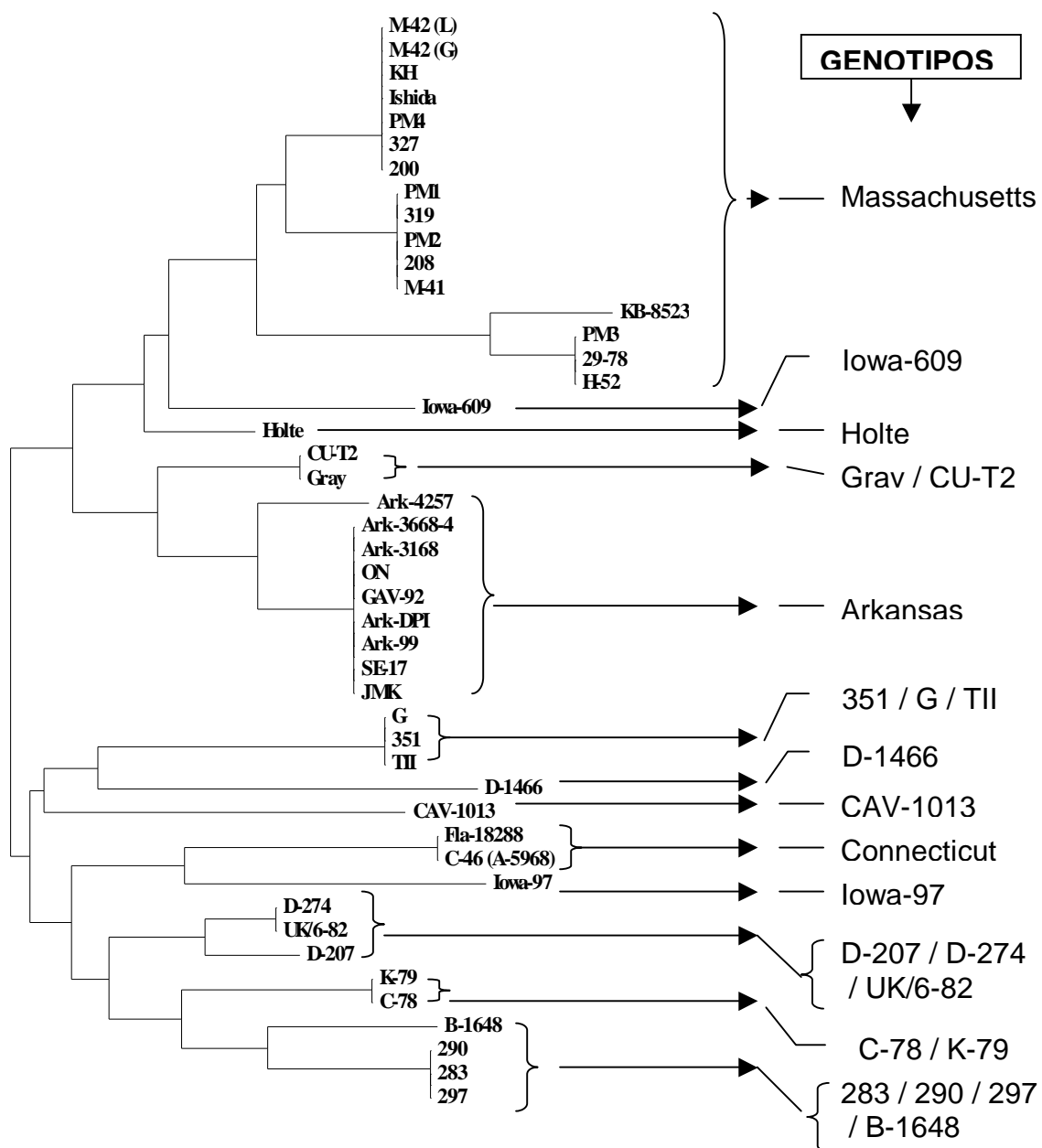


Figura 27 - Genotipificação. Árvore filogenética de VBIGs sem raiz construída com o programa TREECON a partir dos resultados da análise por RFLP com nove enzimas de restrição (*Bst*YI, *Dde*I, *Hae*III, *Hinc*II, *Hin*II, *Hpa*II, *Mae*III, *Pst*I e *Sca*I) de parte do gene S2 de 46 VBIGs procedentes de três fontes de informações (GenBank + WebGene, Lin *et al.*, 1991a e deste trabalho).

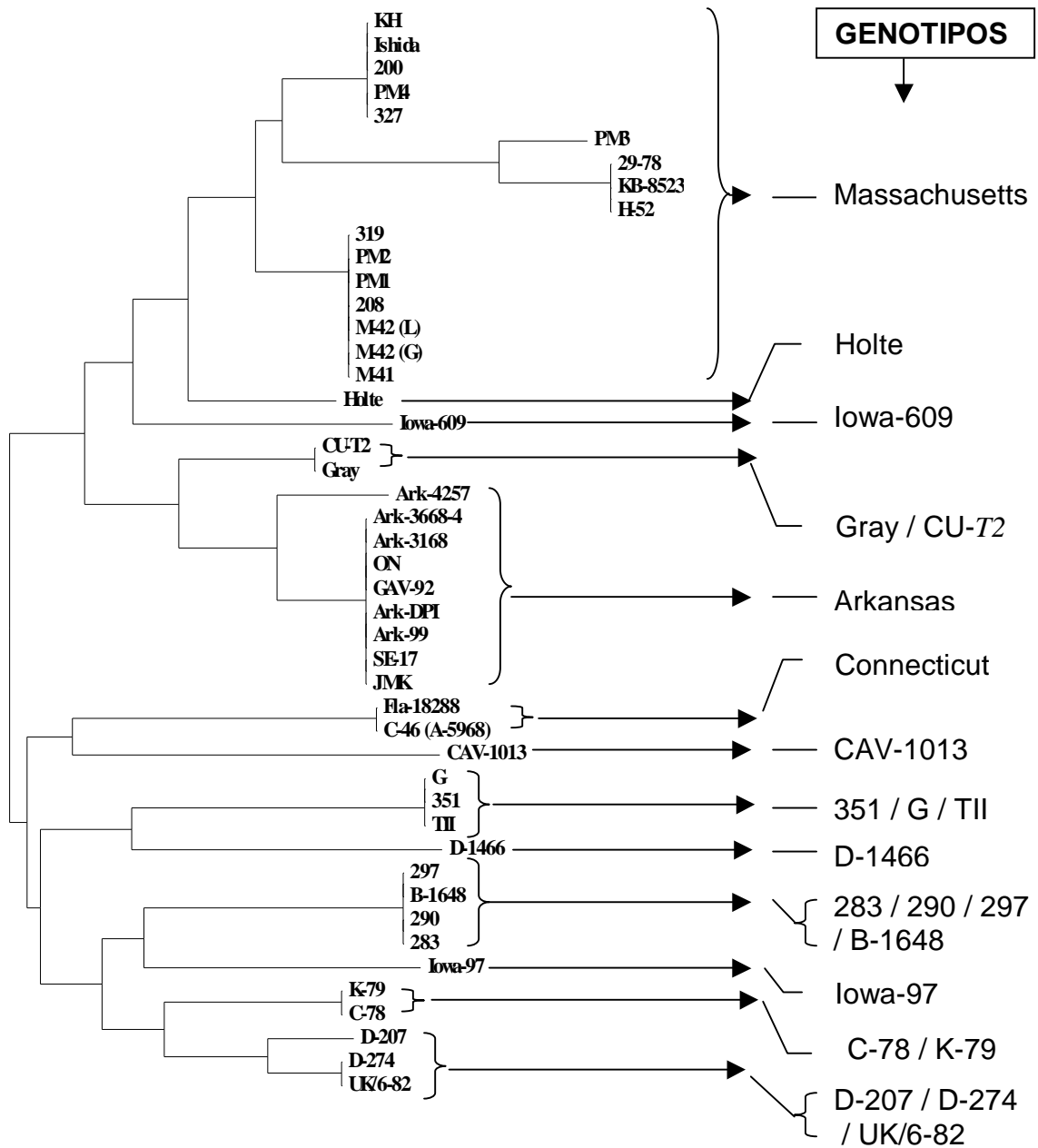


Figura 28 - Genotipificação. Árvore filogenética de VBIGs sem raiz construída com o programa TREECON a partir dos resultados da análise por RFLP com cinco enzimas de restrição (*Bst*YI, *Dde*I, *Hpa*II, *Pst*I e *Sca*I) de parte do gene S2 de 46 VBIGs procedentes de três fontes de informações (GenBank + WebGene, Lin *et al.*, 1991a e deste trabalho).

Os isolados japoneses C-78 e K-79 também permaneceram agrupados em um genótipo próprio, como foi encontrado por Lin *et al.* (1991a) ao construir uma árvore filogenética simples (não utilizou o programa TREECON) visando a genotipificação, próximos do genótipo “283 / 290 / 297 / B-1648”, contendo o VBIG belga variante B-1648 e dos isolados brasileiros 283, 290 e 297.

Um resultado curioso foi o agrupamento do VBIG norte-americano CU-T2 com o Gray, cujo gene S2 ainda não foi sequenciado, em um genótipo único “Gray / CU-T2”, sendo que o Gray não entrou no estudo (Jia *et al.*, 1995) que comprovou ser a CU-T2 um variante recombinante de três diferentes VBIGs conhecidos [gene S1 (90% das seqüências de nucleotídeos são idênticas às do Ark-99 e 10% do M-41), gene S2 (65% do Ark-99 e 35% de um desconhecido) e no gene N (40% do Ark-99 e 60% do H-52)]. Hipoteticamente, talvez o Gray seja o quarto VBIG “desconhecido”, o qual teria participação de 35% no processo natural de recombinação homóloga no gene S2 do CU-T2, conforme a parte estudada do gene S2 neste estudo demonstrou, mas a seqüência completa do gene S2 teria de estar invertida em sua posição 5' → 3'. Entretanto, pelo mapa de caracterização esquemática do genoma do CU-T2 apresentado por Jia *et al.* (1995), a região estudada neste trabalho pertence ao Ark-99, conforme, também, pode ser observado na Tabela 11 (partes A, B, C, D e E). As mutações (substituições) ocorreram em poucos nucleotídeos, porém suficientes para mantê-los próximos, mas não juntos (Figuras 27 e 28).

A genotipificação encontrada para outros VBIGs foi coerente com as fontes de informações originais e não poderia ser diferente: KH e Ishida (genótipo “Massachusetts” - Lin *et al.*, 1991a), Iowa-609 (genótipo homônimo - Lin *et al.*, 1991a), D-207, UK/6-82 e D-274 (muito parecidos quanto aos genes S1 e S2 - Cavanagh *et al.*, 1992b; Kusters *et al.*, 1990), e o CAV-1013 (genótipo homônimo ou “Variante” -

gene S1/ Kwon *et al.*, 1993a,b; Jackwood *et al.*, 1997).

Os isolados 351, G e TII ficaram agrupados separadamente em um genótipo próprio (“351 / G / TII”) numa topologia próxima ao VBIG D-1466, sabidamente variante, recombinante e pertencente a um genótipo / sorotipo isolado que tem o próprio nome, independente se a análise for do gene S1 ou S2 (Kusters *et al.*, 1989b; Kusters *et al.*, 1990).

Os seis isolados brasileiros (283, 290, 297, 351, G e TII), de acordo com as evidências (Figuras 27 e 28), seguramente são variantes. Podem ser, também, recombinantes, mas, no caso de recombinação, a suspeita de enquadramento nesta situação deve ser estendida para qualquer um dos isolados estudados, inclusive daqueles agrupados no genótipo “Massachusetts”, aliás, um grupo cujos componentes estiveram em permanente circulação, quando se analisa os isolados tomando por base o ano do surto, o período e a região de ocorrência. Por isto, com relação à recombinação, nada pode ser afirmado com base apenas nos resultados deste trabalho onde somente parte ($\cong 1/4$) do gene S2 foi estudado. Estes resultados são insuficientes para uma conclusão segura do(s) sítio(s) de recombinação(ões) e seriam necessários estudos de seqüenciamentos genômicos comparativos completos dos genes S (S1 + S2), M e N para detecção de áreas contendo seqüências homólogas. A recombinação pode ocorrer em um gene e não necessariamente em outro, podendo alterar ou não suas características relacionadas à genotipificação / sorotipificação, conforme já comprovado com outros VBIGs no mundo [entre diferentes VBIGs (um norte-americano e seis europeus) do genótipo / sorotipo “Massachusetts” (Cavanagh *et al.*, 1992a); CU-T2 (Jia *et al.*, 1995); D-207, KB-8523 e UK/6-82 (Kusters *et al.*, 1990) e outros (Wang *et al.*, 1993)].

4.9. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A participação do estado de Minas Gerais no total da parte final da cadeia produtiva (produções de carne e ovo de consumo) da avicultura industrial brasileira vem, gradativamente, decaindo nas últimas décadas [exemplos: anos (percentagens nas produções de frangos de corte / ovos de consumo do estado proporcionalmente ao total da produção brasileira nos dois tipos de produção – carne e ovo): 1980 (14,8 / 16,42) → 1990 (8,9 / 10,87) → 1999 (8,4 / 10,25)]. Entretanto, apesar destes números, tomando por base as informações sobre instalações de empresas e o número de aves alojadas, o crescimento do segmento de produção de frangos de corte foi da ordem de 250% desde o início da década de 80, embora o de produção de ovos de consumo tenha aumentado apenas 10% (Dra. Marília Martha Ferreira, AVIMIG, Minas Gerais - *Comunicação Pessoal*). Estas informações visam mostrar a importância do segmento avícola estadual no contexto nacional e pode-se afirmar que está passando por profundas reestruturações visando melhorar ainda mais sua eficiência.

No período entre 1985 e 1986, foi realizado (Setor de Doenças das Aves / DMVP / EV / UFMG + MAA + EMATER + AVIMIG) um estudo em 78 granjas de frangos de corte no qual fez-se um levantamento sorológico de vários agentes infecto-contagiosos virais e bacterianos, incluindo o VBI, nas mesmas regiões (Alto São Francisco e Metalúrgica) do estado de Minas Gerais de onde vieram os isolados utilizados neste trabalho (Jorge *et al.*, 1992). Neste estudo, ficou evidenciada soropositividade ao teste de imunodifusão para o VBI em 30 granjas, embora a vacinação contra o VBI (vacina viva atenuada H-120) tenha ocorrido em apenas 12 das 30 soropositivas, indicando a circulação do VBI nas granjas das regiões estudadas. Em decorrência desses resultados sorológicos, foi realizado um grande esforço visando o isolamento daqueles VBIs autóctones circulantes, que culminou com quatro dos isolados que foram utilizados neste trabalho (PM1, PM2, PM3 e PM4).

Na tentativa de se correlacionar patogenicidade e antigenicidade de VBIs já bem caracterizados nestas duas características biológicas individuais, alguns trabalhos foram realizados em outros países, mas os resultados foram inconclusivos devido, em parte, aos fatores extrínsecos e intrínsecos, inerentes ou não, à ocorrência do surto ou relacionados à reprodução experimental da infecção (Avellaneda *et al.*, 1994; Cook *et al.*, 1986; Dhinakar Raj & Jones, 1997). Neste trabalho, também foi impossível estabelecer um relacionamento entre as informações individuais dos isolados ligadas à patogenicidade (sinais clínicos principais no surto de origem - Tabela 3) com os resultados da genotipificação estabelecida (Figuras 27 e 28), onde os isolados envolvidos com problemas respiratórios, síndrome nefrite - nefrose ou ambas ficaram distribuídos em três genótipos distintos.

Estudos com alguns isolados utilizados neste trabalho foram realizados anteriormente. Primeiramente, Resende (1983) e Resende *et al.* (1989) estudaram os isolados 208 e 29-78, agora agrupados no genótipo "Massachusetts", usando a patogenicidade comparada em frangos SPF e gnotobióticos, verificando que ambas lesaram intensamente o sistema respiratório daquelas aves. Curiosamente, a partir da suspeita evidenciada neste trabalho de que o 29-78 talvez seja o próprio VBI vacinal H-52, não foram encontradas lesões (macro / microscópicas) nos rins dos frangos comprovadamente expostos e infectados pelo vírus, o que seria esperado nas infecções das aves, obviamente dentro da faixa etária estudada que foi do 21º ao 51º dia de idade, altamente susceptível, com o H-52 (Albassam *et al.*, 1986; Winterfield & Albassam, 1984). Isto, hipoteticamente, sugeriu que o 29-78, caso não seja o próprio H-52, seria um recombinante e, neste caso, pelo menos o segmento de DNA estudado do gene S2 pertenceria ao H-52, apesar do fato de que, na época do seu isolamento (1978), o H-52 ainda não estava oficialmente liberado para uso na avicultura industrial brasileira (Villa, 1998). O PM3 também seria um recombinante com grande parte do segmento estudado pertencente ao

H-52. As mesmas considerações podem ser feitas com relação ao 208, só que relacionadas ao M-41, sabidamente pneumotrópico, mas não nefrotrópico (Cavanagh & Naqi, 1997; Dhinakar Raj & Jones, 1997).

Em um estudo utilizando a técnica de SN / CAT (Cook *et al.*, 1976; Darbyshire *et al.*, 1979), Epiphany (1998) verificou que os isolados 208, 29-78 e PM2 pertencem ao sorotipo “Massachusetts” e não ao “Connecticut”, resultados que corroboram com os da genotipificação deste trabalho. Porém, observou que o PM4 é um sorotipo diferente, resultado que difere deste trabalho, mas que pode ser explicado, talvez, pelo fenômeno de variabilidade genotípica e, por consequência, fenotípica “S1 / S2 dependente” descoberto por Callison *et al.* (1999).

Em outro estudo, utilizando a técnica de ELISA com anticorpos monoclonais (AcMs) A13 e A38, especificamente dirigidos contra a glicoproteína S1 do VBIg M-41 e a 13 dos 15 isolados deste trabalho, Souza (1999) verificou que os isolados 208, PM1 e PM2 foram identificados como pertencentes ao sorotipo “Massachusetts” e os isolados 283, 290, 297, 351, G e TII não. Os resultados estão de acordo com este trabalho de genotipificação e, curiosamente, os isolados 319, 327, PM3, PM4 e o vacinal H-52, detectados como sendo do genotipo “Massachusetts”, não foram detectados pelos AcMs específicos da S1 do M-41, o que indicou variabilidade antigênica na glicoproteína S1 para a qual a especificidade dos AcMs é direcionada e, também nesse caso, talvez, tenha sido a situação descrita por Callison *et al.* (1999).

Dentro da linha de pesquisa empregando metodologias de biologia molecular no diagnóstico e controle de viroses causadoras de doenças das aves, outro estudo de RT-PCR (parte do gene N - técnica original de Zwaagstra *et al.*, 1992) com análise por RFLP (enzima de restrição Avall) foi realizado com os mesmos isolados deste trabalho (Abreu, 2000) e os isolados 283, 290 e 297 apresentaram um padrão de restrição enzimática totalmente diferente

dos demais, corroborando os deste trabalho, apesar do gene ser diferente. Os demais foram agrupados em três genogrupos (genotipos), sendo que os 29-78, PM1 e PM2 ficaram juntos com o vacinal H-52, o que está coerente com os resultados deste trabalho. Os demais ficaram participando, ao mesmo tempo (não houve possibilidade técnica de separação individual) entre os genotipos “Massachusetts” e “Arkansas”, em decorrência do uso de uma única enzima de restrição.

Quatorze dos 15 isolados brasileiros utilizados neste estudo já foram estudados por RT-PCR com análise por RFLP (gene total S1 - técnica original de Kwon *et al.*, 1993a) por Santiago *et al.* (2000) e os isolados 283, 290 e 297, como neste trabalho, apresentaram resultados que também os classificam como variantes.

O VBIg é considerado o pior patógeno para galinha, em grande parte devido às variabilidades genômica e, conseqüentemente, antigênica, situação que torna difícil o seu controle com vacinas (Cavanagh *et al.*, 1992a,b; Cavanagh & Naqi, 1997). Como nenhum dos quinze isolados brasileiros mostraram relacionamento genético com os genotipos “Connecticut” e “Arkansas”, situação resultante, provavelmente, da política correta do Ministério da Agricultura no que concerne à liberação de VBIGs vacinais vivos importados (apenas alguns do sorotipo “Massachusetts” foram autorizados para comercialização como vírus vivo – a partir de 2001, outros sorotipos podem ser comercializados inativados) para o controle do VBIg no Brasil (Resende, 1983; Villa, 1998). Isto ficou evidenciado com a polarização de nove dos 15 isolados brasileiros dentro do genotipo “Massachusetts” mas, infelizmente, esta situação, mesmo naquele momento (período entre 1972 e 1989), não poderia ser extrapolada para outras regiões do país naquela época, o mesmo valendo para a avicultura industrial brasileira atual, inclusive a instalada no estado de Minas Gerais. Embora não tenha sido o caso dos isolados utilizados neste trabalho, os quais foram

obtidos a partir de surtos da BIG em plantéis não vacinados contra o VBIG (Tabela 3), se outros VBIGs vacinais tivessem sido liberados para uso na avicultura industrial brasileira, a exemplo do ocorrido em alguns países (Tabela 4), VBIGs com outras características genóticas poderiam ter sido isolados.

Mesmo diante da situação aparentemente favorável, descrita anteriormente, os isolados diferentes ou variantes, os quais não têm relacionamento genotípico com os genótipos / sorotipos tradicionais ("Massachusetts", "Connecticut", "Arkansas", etc.), ocorreram naturalmente (283, 290, 297, 351, G e TII), além de outros descritos por Lunge *et al.* (1998) na região sul do Brasil. Embora a história dos isolados do sul não tenha sido descrita por Lunge *et al.* (1998) e, portanto, não se pode afirmar nada sobre eles, os isolados estudados neste trabalho poderiam, hipoteticamente, infectar frangos de corte / galinhas adequadamente vacinados com VBIGs vacinais (vivos / inativados) do genótipo / sorotipo "Massachusetts" e, até mesmo, de outros genótipos / sorotipos (Kwon *et al.*, 1993a), como por exemplo, "Connecticut", "Arkansas", "Gray / JMK", "Holte", "Iowa-97" e "SE-17", caso tivessem sido liberados. Estes isolados variantes poderão compor, individualmente ou em grupo, vacinas inativadas, preferencialmente, ou vacinas vivas atenuadas, para uso regional, após estudos gênicos (genes S1, N, etc.) e imunogênicos complementares, a exemplo de situações homólogas ocorridas em outros países [Tabela 4 - Bélgica (B-1648 - vacina inativada oleosa), Holanda (D-207 e D-274 - vacinas vivas atenuadas e/ou inativadas oleosas; D-1466 - vacina inativada oleosa), Inglaterra (UK/6-82 - vacina inativada oleosa) e Japão (C-78 - vacina viva atenuada)]. Obviamente, novos isolados oriundos de granjas com problemas

sugestivos da BIG tecnicamente terão preferência na composição das novas vacinas, caso os aqui estudados não estejam mais circulando nas regiões de origem ou em outras, devido à permanente variabilidade do VBIG na natureza sendo, portanto, necessária à atualização dos isolados prevalentes autóctones.

Paralelamente aos estudos gênicos e imunogênicos, estudos sobre a patogenicidade dos isolados antigos e novos, principalmente daqueles candidatos a se tornarem vacinas vivas atenuadas, devem ser realizados para uma melhor avaliação de suas potencialidades e limitações de uso, por exemplo, na questão fascinante da patogenicidade nas infecções sinérgicas e que são a realidade no ambiente (dinâmico e altamente estressante) da avicultura industrial (Albassam *et al.*, 1986; Animas *et al.*, 1994; Avellaneda *et al.*, 1994; Bhattacharjee & Jones, 1997; Butcher *et al.*, 1990; Cavanagh & Naqi, 1997; Collisson *et al.*, 1992; Cook & Huggins, 1986; Cook *et al.*, 1986; Crinion & Hofstad, 1972; Cumming & Chubb, 1988; Darbyshire *et al.*, 1976; De Wit *et al.*, 1998; Dhinakar Raj & Jones, 1997; Gough *et al.*, 1992; Ignjatovic, 1988; Lai & Cavanagh, 1997; Nakamura *et al.*, 1996; Ratanasethakul & Cumming, 1983; Resende, 1983; Resende *et al.*, 1989; Rosenberger & Gelb, 1987; Sander *et al.*, 1997; Sevoian & Levine, 1957; Smith *et al.*, 1985; Zanella, 1988; Winterfield & Albassam, 1984).

Finalmente, como acontecido em outros países (Cavanagh *et al.*, 1992a,b; Cook, 1984; Cubillos *et al.*, 1991; Davelaar *et al.*, 1984; Gelb *et al.*, 1991; Ignjatovic *et al.*, 1997; King, 1988; Kusters *et al.*, 1987; Kusters *et al.*, 1989a,b; Lin *et al.*, 1991a,b), em se tratando do VBIG, é importante

5. CONCLUSÕES

- A RT-PCR utilizada neste trabalho mostrou ser uma importante ferramenta na confirmação diagnóstica de isolados suspeitos de serem VBIGs e seu caráter universal foi confirmado para todos quinze VBIGs estudados, isolados no período entre 1972 e 1989, a partir de granjas com surtos da BIG na avicultura industrial das Regiões do Alto São Francisco e Metalúrgica do estado de Minas Gerais.
- A confirmação da presença de VBIGs variantes entre os isolados estudados foi preocupante mas previsível em função do fato deste problema ser inerente ao VBIG e à avicultura industrial, não sendo, portanto, só local, mas mundial. Esforços no sentido de verificar se estes variantes ainda permanecem nas regiões de origem e, também, visando isolar novos VBIGs, variantes ou não, devem ser implementados nas mesmas regiões e em outras contendo alta concentração avícola no estado de Minas Gerais.
- As informações da filogenia e da genotipificação, realizadas a partir de árvores filogenéticas sem raízes, sugeriram que os quinze isolados brasileiros divididos em dois troncos básicos (um envolvendo o genótipo “Massachusetts” e, outro, os genótipos que agrupam os variantes “283 / 290 / 297 / B-1648” e “351 / G / TII”) têm, provavelmente, uma “origem ancestral não comum”. A natureza evolucionária dos isolados brasileiros pertencentes aos dois genótipos que agrupam os variantes é totalmente desconhecida e necessita ser estudada mais profundamente.
- A constatação mais importante da genotipificação neste trabalho foi o não relacionamento genético dos 15 isolados brasileiros com os genótipos / sorótipos “Connecticut” e “Arkansas”, dentro do universo amostral / temporal / regional estudado, refletindo, talvez, a política correta de liberação oficial controlada de alguns VBIGs vacinais importados e apenas do genótipo / sorótipo “Massachusetts”.
- A utilização da análise por RFLP comparada da parte estudada do gene S2 de VBIGs disponibilizados em diferentes fontes de informação (GenBank + EMBL + DDBJ) permitiu uma maior amplitude analítica dos resultados obtidos com os VBIGs brasileiros e, conseqüentemente, sua inclusão em um estudo macro de relacionamento genético global inter-VBIGs, o que propiciou a montagem de árvores filogenéticas e o estabelecimento de uma classificação genotípica, ambas coerentes e respaldadas pela literatura científica.

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**. 2000. 51 f. Tese (Mestrado). Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

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.

ALTSCHUL, S. F.; GISH, W.; MILLER, W. et al. Basic local alignment search tool. **J. Mol. Biol.**, v. 215, n. 3, p. 403-410, 1990.

ANDRADE, I. F.; VILLEGAS, P.; FLETCHER, O. J. Vaccination of day-old broilers against infectious bronchitis: Effect of vaccine strain and route of administration. **Avian Dis.**, v. 27, n. 1, p. 178-187, 1983.

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.

ANIMAS, S. B.; OTSUKI, K.; TSUBOKURA, M. et al. Comparison of the susceptibility of chicks of different ages to infection with nephrosis-nephritis causing strain of infectious bronchitis virus. **J. Vet. Med. Sci.**, v. 56, n. 5, p. 449-453, 1994.

AVELLANEDA, G. E. Estructura del virus de bronquite infecciosa. **Avic. Profes.**, v. 10, n.1, p. 38-40, 1992.

AVELLANEDA, G. E.; VILLEGAS, P.; JACKWOOD, M. W. et al. *In vivo* evaluation of the pathogenicity of fields isolates of infectious bronchitis virus. **Avian Dis.**, v. 38, n. 4, p. 589-597, 1994.

AUSUBEL, F. M.; BRENT, R.; KINGSTON, R. E. et al. **Short protocols in molecular biology**, 2 ed. New York: Harvard Medical School, 1992. p. 4.2-4.3.

BELÁK, S.; BALLAGI-PORDÁNY, A. Application of the polymerase chain reaction (PCR) in veterinary diagnostic virology. **Vet. Res. Commun.**, v. 17, n. 1, p. 55-72, 1993.

BEISEL, C. E. Recent advances in PCR for diagnostic applications. In: SYMPOSIUM OF IMPROVED DIAGNOSIS OF AVIAN DISEASES USING MOLECULAR BIOLOGY. AMERICAN ASSOCIATION VETERINARY MEDICAL ASSOCIATION MEETING, 129., 1992, Boston. **Proceedings...** Boston: American Association of Avian Pathologists, 1992. p. 39-44.

BHATTACHARJEE, P. S.; JONES, R. C. Susceptibility of organ cultures from chicken tissues for strains of infectious bronchitis virus isolated from the intestine. **Avian Pathol.**, v. 26, n. 5, p. 553-563, 1997.

BIJLENGA, G. Het infectieuze bronchitis virus bij kuikens in Nederland aangetoond met behulp van ei-enting, dierexperimenteel onderzoek en serumneutralisatieproeven. **Tijdschr. Dierg.**, v. 81, n. 1, p. 43-54, 1956.

BINNS, M. M. The application of molecular biology to the study of veterinary infectious diseases. **Br. Vet. J.**, v. 149, n. 1, p. 21-30, 1993.

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. 3, p. 719-726, 1985.

- BINNS, M. M.; BOURSNEILL, M. E. G., TOMLEY, F. M. et al. Comparison of the spike precursor sequences of coronavirus IBV strains M41 and 6/82 with that of IBV Beaudette. **J. Gen. Virol.**, v. 67, n 11, p. 2825-2831, 1986.
- BOURSNEILL, M. E. G.; BROWN, T. D. K.; FOULDS, P. F. et al. Completion of the sequence of the genome of the coronavirus avian infectious bronchitis virus. **J. Gen. Virol.**, v. 68, n. 1, p. 57-77, 1987.
- BRL, Instruction manual GIBCO BRL - SuperScript preamplification system for first strand cDNA synthesis.** Bethesda: Life Technologies, 1993a. 33 p. (Cat. N° 18089-011).
- BRL, Instruction manual GIBCO BRL - TRIZOL LS reagent (Total RNA isolation reagent for liquid samples).** Bethesda: Life Technologies, 1993b. 12 p. (Cat. N° 10296-028).
- BROWN, T. D. K.; CAVANAGH, D.; BOURSNEILL, M. E. G. Confirmation of the presence of avian infectious bronchitis virus (IBV) using cloned DNA complementary to the 3' terminus of the IBV gene. **Avian Pathol.**, v. 13, n. 1, p. 109-117, 1984.
- BROWN, T. D. K.; BOURSNEILL, M. E. G. Avian infectious bronchitis virus genomic RNA contains sequences homologous at the intergenic boundaries. **Virus Res.**, v.1, n. 1, p. 15-24, 1984.
- BUMSTEAD, N.; HUGGINS, M. B.; COOK, J. K. A. Genetic differences in susceptibility to a mixture of avian infectious bronchitis virus and *Escherichia coli*. **Br. Poult. Sci.**, v. 30, n. 1, p. 39-48, 1989.
- BUTCHER, G. D.; WINTERFIELD, R. W.; SHAPIRO, D. P. Pathogenesis of H13 nephropathogenic infectious bronchitis virus. **Avian Dis.**, v. 34, p. 916-921, 1990.
- CALLISON, 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.
- CAVANAGH, D. Coronaviruses. In: ZUCKERMAN, A. Z.; BANATVALA, J. E.; PATTISON, J. R., eds. **Principles and practice of clinical virology**, 3 ed. Chichester: John Wiley and Sons, 1995. p. 325-336.
- CAVANAGH, D.; DAVIS, P. J.; DARBYSHIRE, J. H. et al. Coronavirus IBV: virus retaining spike glycoprotein 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. A. Amino acids within hypervariable region 1 of avian coronavirus IBV (Massachusetts serotype) spike glycoprotein are associated with neutralization epitopes. **Virus Res.**, v. 11, n. 1, p. 141-150, 1988.
- CAVANAGH, D.; DAVIS, P. J.; COOK, J. K. A. Infectious bronchitis virus: evidence for recombination within the Massachusetts serotype. **Avian Pathol.**, v. 21, n. 2, p. 401-408, 1992a.
- 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, 1992b.
- CAVANAGH, D.; BRIAN, D. A.; BRINTON, M. A. et al. Revision of the taxonomy of the Coronavirus, Torovirus e Arterivirus genera. **Arch. Virol.**, v. 135, n. 1, p. 227-237, 1994.
- CAVANAGH, D.; BRIAN, D. A.; BRINTON, M. A. et al. Coronaviridae. In: MURPHY, F. A. et al., (Eds). **Virus Taxonomy** (Sixth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses). Vienna; NY: Springer-Verlag, 1995. p. 407-411.
- CAVANAGH, D.; ELLIS, M. M.; COOK, J. K. A. Relationship between sequence variation in the 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.; DAVIS, P. J. Sequence analysis of strains of avian infectious bronchitis coronavirus isolated during the 1960's in the U.K. **Arch. Virol.**, v. 130, n. 2, p. 471-476, 1992.
- CAVANAGH, D.; NAQI, S. A. Infectious bronchitis. In: CALNEK, B. W. et al., eds. **Diseases of poultry**. 10. ed. Ames: Iowa State University, 1997. p. 511-526.
- 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.
- CHONG, K. T.; APOSTOLOV, K. The pathogenesis of nephritis in chickens induced by infectious bronchitis virus. **J. Comp. Pathol.**, v. 92, n. 1, p. 199-211, 1982.
- CHUBB, R. C. The detection of antibody to avian infectious bronchitis virus by the use of immunofluorescence with tissue sections of nephritic kidneys. **Aust. Vet. J.**, v. 63, n. 1, p. 131-132, 1986.
- COLLISSON, E. W.; PARR, R. L.; LI, W. et al. An overview of the molecular characteristics of avian infectious bronchitis virus. **Poult. Sci. Rev.**, v. 4, n. 1, p. 41-55, 1992.
- COOK, J. K. A. The classification of new serotypes of infectious bronchitis virus isolated from poultry flocks in Britain between 1981 and 1983. **Avian Pathol.**, v. 13, n. 4, p. 733-741, 1984.
- COOK, J. K. A.; 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.; 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. A.; SMITH, H. W.; HUGGINS, M. B. Infectious bronchitis immunity: Its study in chickens experimentally infected with mixtures of infectious bronchitis virus and *Escherichia coli*. **J. Gen. Virol.**, v. 67, n. 7, p. 1427-1434, 1986.
- COOK, J. K. A.; OTSUKI, K.; MARTINS, N. R. S. et al. The secretory antibody response of inbred lines of chickens to avian infectious bronchitis virus infection. **Avian Pathol.**, v. 21, n. 3, p. 681-692, 1992.
- COWEN, B. S.; WIDEMAN, R. F.; ROTHENBACHER, H. et al. A outbreak of avian urolithiasis on a large commercial egg farm. **Avian Dis.**, v. 31, n. 2, p. 392-397, 1987.
- 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.
- CSERMELYI, M.; THIJSEN, R.; ORTHEL, F. et al. Serological classification of recent infectious virus isolates by the neutralization of immunofluorescent foci. **Avian Pathol.**, v. 17, p. 139-148, 1988.
- CUBILLOS, A.; ULLOA, J.; CUBILLOS, V. et al. Characterisation of strains of infectious bronchitis virus isolated in Chile. **Avian Pathol.**, v. 20, n. 1, p. 85-99, 1991.
- CUMMING, R. B. Infectious avian nephrosis (uraemia) in Australia. **Aust. Vet. J.**, v. 39, n. 1, p. 145-147, 1963.
- CUMMING, R. B. The control of avian infectious bronchitis / nephrosis in Australia. **Aust. Vet. J.**, v. 45, n. 1, p. 200-203, 1969.
- CUMMING, R. B. & CHUBB, R. C. The pathogenesis of nephritis evoked by Australian IB viruses. In: FIRST INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON INFECTIOUS BRONCHITIS, 1988, Rauschholzhausen. **Proceedings...** Rauschholzhausen, Germany, 1988. p. 129-132.

- CUNNINGHAM, C. H. **A laboratory guide in virology**, 7 ed. Minneapolis: Burgess, 1973. 103 p.
- DALTON, K.; PÉNZES, Z.; WROE, C. et al. Sequence elements involved in the rescue of IBV defective RNA CD-91. **Adv. Exp. Med. Biol.**, v. 440, n. 1, p. 253-257, 1998.
- DARBYSHIRE, J. H.; COOK, J. K. A.; PETERS, R. W. Organ culture studies on efficiency of infection of chicken tissues with avian infectious bronchitis virus. **Brit. J. Experim. Pathol.**, v. 57, p. 443-454, 1976.
- DARBYSHIRE, J. H.; 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. 2, p. 227-238, 1979.
- DAVELAAR, F. G.; KOUWENHOVEN, 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. 1, p. 114-120, 1984.
- DEACON, N. J. & LAH, M. The potential of the polymerase chain reaction in veterinary research and diagnosis. **Aust. Vet. J.**, v. 66, n. 3, p. 442-444, 1989.
- DE WIT, J. J. Technical Review: Detection of infectious bronchitis virus. **Avian Pathol.**, v. 29, n. 1, p. 71-93, 2000.
- DE WIT, J. J.; MEKKES, D. R.; KOUWENHOVEN, B. et al. Sensivity and specificity of serological tests for infectious bronchitis virus antibodies in broilers. **Avian Pathol.**, v. 26, n. 1, p. 105-118, 1997.
- DE WIT, J. J.; JONG, M. C. M.; PIJPERS, A. et al. Transmission of infectious bronchitis virus within vaccinated and unvaccinated groups of chickens. **Avian Pathol.**, v. 27, n. 2, p. 464-471, 1998.
- DI FÁBIO, J. Bronquite infecciosa das galinhas: aspectos clínicos e controle da BIG no Brasil. In: CONFERÊNCIA APINCO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLAS, 1993, Santos. **Anais...** Santos: FACTA, 1993. p. 1-8.
- DHINAKAR-RAJ, G.; JONES, R. C. Infectious bronchitis virus: immunopathogenesis of infection in the chicken. **Avian Pathol.**, v. 26, n. 3, p. 677-706, 1997.
- DOI, M.; YAMAKAMI, T.; KOIMARU, H. et al. Serotypes of avian infectious bronchitis virus isolates from field cases in Japan. **Avian Dis.**, v. 26, n. 4, p. 946-956, 1982.
- EPIPHANIO, E. O. B. **Cultivos de anéis de traquéia para ensaios com o vírus da bronquite infecciosa das galinhas**. 1998. 73 f. Tese (Mestrado). Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- FIELDS, D. B. Arkansas 99, a new infectious bronchitis serotype. **Avian Dis.**, v. 17, n. 3, p. 659-661, 1973.
- GELB, J. Infectious bronchitis. In: PURCHASE, H. G. et al (Eds). **A laboratory manual for the isolation and identification of avian pathogens**, 3 ed. PA: American Association of Avian Pathologists, 1989. p. 124-127.
- GELB, J.; PERKINS, B.E.; ROSENBERGER, J.K. et al. Serologic and cross-protection studies with several infectious bronchitis virus isolates from Delmarva-reared broiler chickens. **Avian Dis.**, v. 25, n. 3, p. 655-666, 1981.
- GELB, J.; LEARY, J. H.; ROSENBERGER, J. K. Prevalence of Arkansas-type infectious bronchitis virus in Delmarva Peninsula chickens. **Avian Dis.**, v. 27, n. 3, p. 667-678, 1983.
- GELB, J.; FRIES, P. A.; CRARY, C. K. et al. Sentinel bird approach to isolating infectious bronchitis virus. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, v. 190, p. 16-28, 1987.

- GELB, J.; WOLFF, J. F.; MORAN, C. A. Variant serotypes of infectious bronchitis virus isolated from commercial layer and broiler chickens. **Avian Dis.**, v. 35, p. 82-87, 1991.
- GLAHN, R. P.; WIDEMAN, R. F.; COWEN, B. S. Order of exposure to high dietary calcium and Gray strain infectious bronchitis virus alters renal function and the incidence of urolithiasis. **Poult. Sci.**, v. 68, n. 6, p. 1193-1204, 1989.
- 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. Microbiol.**, v. 2, n. 1, p. 289-301, 1978.
- 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. 3, p. 493-494, 1992.
- GRAVITT, P. E.; MANOS, M. M. Nucleic acid hybridization methods to detect microorganisms. **Lab. Anim. Sci.**, v. 43, n. 1, p. 5-10, 1993.
- HAWKES, R. A.; DARBYSHIRE, J. H.; PETERS, R. W. et al. Presence of viral antigens and antibody in the trachea of chickens infected with avian infectious bronchitis virus. **Avian Pathol.**, v. 12, n. 2, p. 331-340, 1983.
- HERRING, A. J.; INGLIS, N. F.; OJEH, C. K. et al. Rapid diagnosis of rotavirus infection by direct detection of viral nucleic acid in silver-stained polyacrylamide gels. **J. Clin. Microbiol.**, v. 16, n. 2, p. 473-477, 1982.
- HIPÓLITO, O. Isolamento e identificação do vírus da bronquite infecciosa das galinhas no Brasil. **Arq. Esc. Superior Vet. UREMG**, v. 10, n. 1, p. 131-150, 1957.
- HIPÓLITO, O.; BOTTINO, J. A.; PINTO, A. A. Estudo de duas amostras de vírus isoladas de casos de aves com a "Síndrome nefrite-nefrose". **Ciênc. Cult.**, v. 25, n. 3, p. 609, 1973.
- HIPÓLITO, O.; SILVA, J. M. L.; HSIUNG, H. M. et al. **Bronquite infecciosa das galinhas - A doença no Brasil**. São Paulo, 1979. 72 p.
- HOEKSTRA, J.; RISPENS, B. Infectieuze bronchitis bij pluimvee. **Tijdschr. Dierg.**, v. 85, n. 2, p. 398-403, 1960.
- HOFSTAD, M. S. Antigenic differences among isolates of avian infectious bronchitis virus. **Am. J. Vet. Res.**, v. 19, n. 4, p. 740-743, 1958.
- HOFSTAD, M. S. Antigenic and immunological studies on several isolates of avian infectious bronchitis virus. **Avian Dis.**, v. 5, n. 1, p. 102-107, 1961.
- HOFSTAD, M. S. Avian infectious bronchitis. In: Hofstad, M. S. et al (Eds). **Diseases of poultry**. 6. ed. Ames: Iowa State University Press, 1972. p. 586-606.
- HOFSTAD, M. S.; YODER, H. W. Avian infectious bronchitis virus distribution in tissues of chicks. **Avian Dis.**, v. 10, p. 230-239, 1966.
- HOLMES, K. V. Coronaviridae and their replication. In: FIELDS, B. N. & KNIPE, D. M. (Eds). **Virology**. New York: Raven, 1990. p. 841-856.
- 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.
- HOPKINS, S. R. Serological comparisons of strains of infectious bronchitis virus using plaque-purified isolants. **Avian Dis.**, v. 18, n. 1, 231-239, 1974.
- IGNJATOVIC, J. Epidemiology of infectious bronchitis in Australia. In: FIRST INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON INFECTIOUS BRONCHITIS, 1988, Rauschholzhausen. **Proceedings...** Rauschholzhausen, Germany, 1988. p. 84-88.

- IGNJATOVIC, J.; SAPATS, S. I.; ASHTON, F. A long-term study of Australian infectious bronchitis viruses indicates a major antigenic change in recently isolated strains. **Avian Pathol.**, v. 26, n. 3, p. 535-552, 1997.
- 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, p. 117-134, 1994.
- IKUTA, N. Diagnóstico de doenças em aves através da biologia molecular. In: CONFERÊNCIA APINCO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLAS, 1999, Campinas. **Anais...** Campinas: FACTA, 1999. p. 103-114.
- JACKWOOD, M. W. Diagnosis of infectious bronchitis virus using the polymerase chain reaction. In: SYMPOSIUM OF IMPROVED DIAGNOSIS OF AVIAN DISEASES USING MOLECULAR BIOLOGY. AMERICAN ASSOCIATION VETERINARY MEDICAL ASSOCIATION MEETING, 129., 1992, Boston. **Proceedings...** Boston: American Association of Avian Pathologists, 1992. p. 33-34.
- JACKWOOD, M. W.; YOUSEF, N. M. H.; 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.
- JEONG, Y. S.; MAKINO, S. Mechanism of coronavirus transcription: Duration of primary transcription initiation activity and effects of subgenomic RNA transcription on RNA replication. **J. Virol.**, v. 66, p. 3339-3346, 1992.
- 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.
- JOHNSON, R. B.; MARQUARDT, W. M., 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.
- JOHNSON, R. B. & MARQUARDT, W. W. The neutralizing characteristics of strains of infectious bronchitis virus as measured by the constant virus variable serum method in chicken tracheal cultures. **Avian Dis.**, v. 19, n. 1, p. 82-90, 1975.
- JORGE, M. A.; RESENDE, J. S.; OLIVEIRA, R. L. Levantamento sorológico em frangos de Minas Gerais: Doença de Gumboro, bronquite infecciosa e doença de Newcastle. **Arq. Bras. Med. Vet. Zoot.**, v. 44, n. 3, p. 545-547, 1992.
- KANT, A.; KOCH, G.; ROOZELAAR, D. J. et al. Location of antigenic sites defined by neutralizing monoclonal antibodies on the S1 avian infectious bronchitis virus glycopolypeptide. **J. Gen. Virol.**, v. 73, p. 591-596, 1992.
- KARACA, K.; NAQI, S.; GELB, J. Production and characterization of monoclonal antibodies to three infectious bronchitis virus serotypes. **Avian Dis.**, v. 36, n. 4, p. 903-915, 1992.
- KARACA, K.; NAQI, S. A monoclonal antibody-based ELISA to detect serotype-specific infectious bronchitis virus antibodies. **Vet. Microbiol.**, v.34, n. 1, p. 249-257, 1993.
- KIM, K. H.; NARAYANAN, K.; MAKINO, S. Characterization of coronavirus DI RNA packaging. **Adv. Exp. Med. Biol.**, v. 440, n. 3, p. 347-353, 1998.
- KING, D. J. A comparison of infectious bronchitis virus hemagglutination-inhibition test procedures. **Avian Dis.**, v. 32, n. 2, p. 335-341, 1988.

- KOCH, G.; HARTOG, L.; KANT, A. et al. Antigenic domains on the peplomer protein of avian infectious bronchitis virus: correlation with biological functions. **J. Gen. Virol.**, v. 71, p. 1929-1935, 1990.
- KOTIER, S. A.; CAVANAGH, D.; BRITTON, P. Experimental evidence of recombination in coronavirus infectious bronchitis virus. **Virology**, v. 213, p. 569-580, 1995.
- KUSTERS, J. G.; NIESTERS, H. 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.; JAGER, E. J.; LENSTRA, J. A. et al. Analysis of an immunodominant region of infectious bronchitis virus. **J. Immunol.**, v. 143, n. 9, p. 2692-2698, 1989a.
- 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, 1989b.
- 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.
- KWON, H. M.; JACKWOOD, M. W.; GELB, J. Differentiation of infectious bronchitis virus serotypes using polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism analysis. **Avian Dis.**, v. 37, n. 1, p. 194-202, 1993a.
- KWON, H. M.; JACKWOOD, M.; BROWN, T. P. et al. Polymerase chain reaction and a biotin-labeled DNA probe for detection of infectious bronchitis virus in chickens. **Avian Dis.**, v. 37, n. 1, p. 149-156, 1993b.
- LAI, M. M. C. RNA recombination in Animal and plant viruses. **Microbiol. Rev.**, v. 56, p. 61-79, 1992.
- LAI, M. M.; LIAO, C. L.; LIN, Y. J. et al. Coronavirus: How a large RNA viral genome is replicated and transcribed. **Infect. Agents Dis.**, v. 3, n. 1, p. 98-105, 1994.
- LAI, M. M. C.; CAVANAGH, D. The molecular biology of coronaviruses. **Adv. Virus Res.**, v. 48, n. 1, p. 1-100, 1997.
- LI, D.; CAVANAGH, D. Coronavirus IBV-induced membrane fusion occurs at near-neutral pH. **Arch. Virol.**, v. 122, n. 2, p. 307-316, 1992.
- 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, 1991a.
- LIN, Z.; KATO, A.; KUDOU, Y. et al. Typing of recent infectious bronchitis virus isolates causing nephritis in chickens. **Arch. Virol.**, v. 120, n. 1, p. 145-149, 1991b.
- LINK, W.; DIXENS, C.; SINGH, M. et al. Genetic diversity in European and Mediterranean faba bean germ plasm revealed by RAPD markers. **Theor. Appl. Genet.**, v. 90, n. 1, p. 27-32, 1995.
- LIU, D.; INGLIS, S. C. Association of the infectious bronchitis virus 3c protein within the virion envelope. **Virology**, v. 185, n. 4, p. 911-917, 1991.
- LOMNICZI, B. Biological properties of avian coronavirus RNA. **J. Gen. Virol.**, v. 36, n. 3, p. 531-533, 1977.
- LUCIO, B.; FABRICANT, J. Tissue tropism of three cloacal isolates and Massachusetts strain of infectious bronchitis virus. **Avian Dis.**, v. 26, n. 2, p. 508-519, 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**. Ames: American Association of Avian Pathologists, 1975. p. 182-188.

- LUNGE, V. R.; IKUTA, N.; FONSECA, A. S. K. et al. Caracterização de variantes do vírus da bronquite infecciosa (IBV). In: CONFERÊNCIA APINCO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLAS, 1998, Campinas. **Anais...** Campinas: FACTA, 1998. p. 50.
- MARQUARDT, W. W.; SNYDER, D. B.; SCHLOTTHOBER, B. A. Detection and quantification of antibodies to infectious bronchitis virus by enzyme-linked immunosorbent assay. **Avian Dis.**, v. 25, n. 3, p. 713-722, 1981.
- MARTINS, N. R. S. **Studies of the immunoglobulin responses to viral infections of chickens.** 1990. 255 f. Tese (Doutorado) - University of Surrey, Inglaterra.
- MARTINS, N. R. S.; RESENDE, J. S.; SOUZA, M. B. et al. Avaliação rápida parcial de isolados do vírus da bronquite infecciosa das galinhas. In: CONFERÊNCIA APINCO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLAS, 1996, Campinas. **Anais...** Campinas: FACTA, 1996. p. 98.
- MACNAUGHTON, M. R.; DAVIES, H. A.; NERMUT, M. V. Ribonucleoprotein-like structures from coronavirus particles. **J. Gen. Virol.**, v. 39, n. 2, p. 545-549, 1978.
- McDOUGALL, J. S. Infectious bronchitis in laying fowls - Its effect upon egg production and subsequent egg quality. **Vet. Rec.**, v. 83, n. 1, p. 84-86, 1968.
- McMARTIN, D. A. Preliminary investigation of methods for evaluating inactivated vaccines for infectious bronchitis virus. **Brit. Vet. J.**, v. 124, n. 1, p. 36-42, 1968.
- 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.
- MEULEMANS, G.; CARLIER, M. C.; GONZE, M. et al. Incidence, characterisation and prophylaxis of nephropathogenic avian infectious bronchitis viruses. **Vet. Rec.**, v. 120, n. 1, p. 205-206, 1987.
- MOCKETT, A. P. A.; DARBYSHIRE, J. H. Comparative of the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), haemagglutination inhibition test and agar gel precipitation test for detection of antibodies to avian infectious bronchitis virus. **Avian Pathol.**, v. 10, n. 1, p. 1-10, 1981.
- MOCKETT, A. P. A.; COOK, J. K. A.; HUGGINS, M. B. Maternally-derived antibody to infectious bronchitis virus: Its detection in chick trachea and serum and its role in protection. **Avian Pathol.**, v. 16, n. 2, p. 407-416, 1987.
- MURRAY, P. R.; DREW, W. L.; KOBAYASHI, G. S. et al. Coronavírus. **Microbiologia médica.** RJ: Guanabara Koogan, 1992. p. 440-442.
- NAKAMURA, K.; IMAI, K.; TANIMURA, N. Comparison of the effects of infectious bronchitis and infectious laryngotracheitis on the chicken respiratory tract. **J. Comp. Pathol.**, v. 114, n. 1, p. 11-21, 1996.
- NAQI, S. A. A monoclonal antibody-based immunoperoxidase procedure for rapid detection of infectious bronchitis virus in infected tissues. **Avian Dis.**, v. 34, n. 3, p. 893-898, 1990.
- NAQI, S. A.; KARACA, K.; BAUMAN, B. A monoclonal antibody-based antigen capture enzyme-linked immunosorbent assay for identification of infectious bronchitis virus serotypes. **Avian Pathol.**, v. 22, n. 3, p. 555-564, 1993.
- NEWTON, C. R. Background to PCR and its application areas, Cap. 1; Setting up a PCR laboratory, Cap. 2; Contamination avoidance, Cap. 9. In: NEWTON, C. R. (Ed). **PCR - essential data.** Chichester/UK: John Wiley & Sons, 1995. Cap.1, p. 1-6; Cap. 2, p. 7-11; Cap. 9, p. 87-92.

- OSHIRO, L. S. Coronaviruses. In: DALTON, A.; HAGUENAU, F. (Eds). **Ultrastructure of animal viruses and bacteriophages: an atlas**. New York: Academic, 1973. Cap. 18, p. 331-343.
- OTSUKI, K.; HUGGINS, M. B.; COOK, J. K. A. Comparison of the susceptibility to infectious bronchitis virus infection of two inbred lines of White Leghorn chickens. **Avian Pathol.**, v. 19, n. 2, p. 467-475, 1990.
- PANIAGO, M. T. **Atividade hemaglutinante de amostras do vírus da bronquite infecciosa das galinhas isoladas no Estado de Minas Gerais**. 1994. 44 f. Tese (Mestrado). Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- PARR, R. L. & COLLISSON, E. W. Epitopes on the spike protein of a nephropathogenic strain of infectious bronchitis virus. **Arch. Virol.**, v. 133, n. 2, 369-383, 1993.
- PFEFFER, M.; WIEDMANN, M.; BATT, C. A. Applications of DNA amplification techniques in veterinary diagnostics. **Vet. Res. Commun.**, v. 19, n. 2, p. 375-407, 1995.
- PÉNZES, Z.; TIBBLES, K.; SHAW, K. et al. Characterization of a replicating and packaged defective RNA of avian coronavirus infectious bronchitis virus. **Virology**, v. 203, n. 1, p.286-293, 1994.
- PÉNZES, Z.; WROE, C.; BROWN, T. D. K. et al. Replication and packing of coronavirus infectious bronchitis virus defective RNAs lacking a long open reading frame. **J. Virol.**, v. 70, n. 12, p. 8660-8668, 1996.
- POWELL, S. J. Protocol optimization and reaction specificity In: NEWTON, C. R. (Ed). **PCR - Essential Data**. Chichester/UK: John Wiley & Sons, 1995. p. 72-86.
- PROMEGA, **Promega life science catalog 1999**. Enzymes for molecular biology – cap. 5. Amplification – cap. 10. Madison: PROMEGA (cat. CA010-1), 1998. Cap. 5, p. 5.1-5.66; Cap. 10, p. 10.1-10.24.
- RATANASETHAKUL, C. & CUMMING, R. B. The effect of route of infection and strain of virus on the pathology of Australian infectious bronchitis. **Aust. Vet. J.**, v. 60, n. 1, p. 209-213, 1983.
- 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)**. 1983. 74 f. Tese (Mestrado). Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte:
- RESENDE, J. S.; VIEIRA, E. C.; RESENDE, M. Comparative pathogenesis of infection of gnotobiotic and specific-pathogen-free chickens with two strains of infectious bronchitis virus. **Arq. Bras. Med. Vet. Zoot.**, v. 41, n. 1, p. 17-27, 1989.
- RESENDE, J. S.; FLATSCHART, A. V. F.; FLATSCHART, R. B. et al. Detecção do vírus da bronquite infecciosa das galinhas por RT-PCR. In: Encontro de Pesquisa da Escola de Veterinária da UFMG, XVI, 1998, Belo Horizonte. **Anais...** Belo Horizonte: UFMG, 1998. p. 58.
- RODRIGUEZ, M. & SCHUDEL, A. A. Nucleic acid hybridization and polymerase chain reaction in the diagnosis of infectious animal diseases. **Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.**, v. 12, n. 3, p. 405-423, 1993.
- ROSENBERGER, J. K. & GELB, J. Response of several avian respiratory viruses as affected by infectious bursal disease virus. **Avian Dis.**, v. 22, n. 1, p. 95-105, 1987.
- SAITOU, N.; NEI, M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. **Mol. Biol. Evol.**, v. 4, n. 2, p. 406-425, 1987.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 2. ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1989. v. 2, p. 1-47.

- SANDER, J. E.; JACKWOOD, M. W.; ROWLAND, G. N. Protection by a commercial Arkansas-type infectious bronchitis virus vaccine against a field isolate of the same serotype. **Avian Dis.**, v. 41, n. 4, p. 964-967, 1997.
- SANTIAGO, S. L. T.; RESENDE, J. S.; ABREU, J. T. et al. Vírus da bronquite infecciosa das galinhas - Caracterização molecular de isolados da avicultura industrial no Estado de Minas Gerais. **Rev. Bras. Ciênc. Avíc.**, v. 1, sup. 2, p. 100, 2000.
- SCHAFFER, H.E.; SEDEROFF, R.R. "Least squares fit of DNA fragment length to gel mobility" algorithm. **Analytical Biochem.**, v. 115, n. 1, p. 113 - 122, 1981.
- SCHOCHETMAN, G.; STEVENS, R. H.; SIMPSON, R. W. Presence of infectious polyadenylated RNA in the coronavirus avian infectious bronchitis virus. **Virology**, v. 77, n. 2, p. 772-782, 1977.
- SCHULTZE, B.; CAVANAGH, D.; HERRLER, G. Neuraminidase treatment of avian infectious bronchitis coronavirus reveals a hemagglutinating activity that is dependent on sialic acid-containing receptors on erythrocytes. **Virology**, v.189, n. 2, p. 792-794, 1992.
- SEVOIAN, M.; LEVINE, P. P. Effects of infectious bronchitis on the reproductive tracts, egg production and egg quality of laying chickens. **Avian Dis.**, v.1, n. 1, p. 136-164, 1957.
- SIDDELL, S. G. Coronavirus JHM: Coding assignments of subgenomic mRNAs. **J. Gen. Virol.**, v. 64, n. 1, p. 113-125, 1983.
- SIDDELL, S. G. The coronaviridae: An introduction. In: SIDDELL, S. G. (Ed). **The coronaviridae**. New York: Plenum, 1995. p. 1-10.
- SIDDELL, S. G.; WEGE, H.; MEULEN, V. The structure and replication of coronaviruses. **Curr. Top. Microbiol. Immunol.**, v. 99, n. 1, p. 131-163, 1982.
- SIDDELL, S. G.; WEGE, H.; MEULEN, V. The biology of coronaviruses. **J. Gen. Virol.**, v. 64, n. 2, p. 761-776, 1983.
- SILLER, W. G. Renal pathology of the fowl: a review. **Avian Pathol.**, v. 10, n. 1, p. 187-262, 1981.
- SILVA, J. M. L. Bronquite infecciosa das galinhas: como e quando introduzir novas vacinas. In: CONFERÊNCIA APINCO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLAS, 1989, Campinas. **Anais...** Campinas: FACTA, 1989. p. 75-79.
- SILVEIRA, R. M. & MARQUES, E. K. Otimização da detecção do vírus da bronquite infecciosa por RT-PCR. In: CONFERÊNCIA APINCO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLAS, 1995, Campinas. **Anais...** Campinas: FACTA, 1995. p. 177. (1995a)
- SILVEIRA, R. M. & MARQUES, E. K. Caracterização de isolados brasileiros de vírus da bronquite infecciosa. In: CONFERÊNCIA APINCO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLAS, 1995, Campinas. **Anais...** Campinas: FACTA, 1995. p. 179. (1995b)
- SMITH, H. W.; COOK, J. K. A.; PARSELI, Z. E. The experimental infection of chickens with mixtures of infectious bronchitis virus and *Escherichia coli*. **J. Gen. Virol.**, v. 66, n. 2, p. 777-786, 1985.
- 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. 2, 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**. 1999, 75 f. Tese, (Mestrado). Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

- SOUZA, C. M. **Produção de Anticorpos monoclonais contra os componentes conservados do vírus da bronquite infecciosa das galinhas.** 2000, 40 f. Tese, (Mestrado). Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- STERN, D. F.; SEFTON, B. M. Coronavirus multiplication: locations of genes of virion proteins on the avian infectious bronchitis virus genome. **J. Virol.**, v. 50, n. 1, p. 22-29, 1984.
- STIRRUPS, K.; SHAW, K.; EVANS, S. et al. Rescue of IBV D-RNA by heterologous helper virus strains. **Adv. Exp. Med. Biol.**, v. 440, p. 259-264, 1998.
- STRAUSS, E. G. & STRAUSS, J. H. Replication strategies of the single stranded RNA viruses of eukaryotes. **Curr. Top. Microbiol. Immunol.**, v. 105, n. 1, p. 1-98, 1983.
- STUDIER, J. A.; KEPPLER, K. J. A note on the neighbor-joining algorithm of Saitou and Nei. **Mol. Biol. Evol.**, v.5, n. 3, p. 729-731, 1988.
- STURMAN, L. S.; HOLMES, K. V. The molecular biology of coronaviruses. **Adv. Virus Res.**, v. 28, n. 1, p. 35-112, 1983.
- SUTOU, S.; SATO, S.; OKABE, T. et al. Cloning and sequencing of genes encoding structural proteins of avian infectious bronchitis virus. **Virology**, v. 165, n. 2, p. 589-595, 1988.
- SWOFFORD, D. L.; OLSEN, J. L.; WADDELL, P. J. et al. Phylogenetic inference. In: HILLIS, D. M. et al. (Eds). **Molecular systematics.** Sunderland: Sinauer Associates, 1996. p. 407-514.
- TOMLEY, F. M.; MOCKETT, A. P. A.; BOURSNEILL, M. E. G. et al. Expression of the infectious bronchitis virus spike protein by recombinant vaccinia virus and induction of neutralizing antibodies in vaccinated mice. **J. Gen. Virol.**, v. 68, n. 11, p. 2291-2298, 1987.
- 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, L.; JUNKER, D.; COLLISON, E. W. Evidence of natural recombination within the S1 gene of the infectious bronchitis virus. **Virology**, v. 192, n. 3, p. 710-716, 1993.
- WANG, L.; JUNKER, D.; HOCK, D. et al. Evolutionary implications of genetic variations in the S1 gene of infectious bronchitis virus. **Virus Res.**, v.34, n. 2, p. 327-338, 1994.
- WENTZ, I. Painei: Bronquite Infecciosa das Galinhas - Que cepa vacinal usar? In: CONFERÊNCIA APINCO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLAS, 1992, Santos. **Anais...** Santos: FACTA, 1992. p. 165-167.
- WILLIAMS, A.; WANG, L.; SNEED, L. W. et al. Comparative analysis of the nucleocapsid genes of several strains of infectious bronchitis virus and other coronaviruses. **Virus Res.**, v. 25, n. 2, p. 213-222, 1992.
- WINTERFIELD, R. W.; ALBASSAM, M. A. Nephropathogenicity of infectious bronchitis virus. **Poultry Sci.**, v. 63, n. 6, p. 2358-2363, 1984.
- WINTERFIELD, R. W.; HITCHNER, S. B. Etiology of an infectious nephritis-nephrosis syndrome of chickens. **Am. J. Vet. Res.**, v. 23, n. 5, 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.
- WINTERFIELD, R. W.; FADLY, A. M.; HANLEY, J. E. Characteristics of an isolate of infectious bronchitis virus from chickens in Florida. **Avian Dis.**, v. 15, n. 2, p. 305-311, 1971.

- WU, Z. Q.; YANG, Q. W.; FU, C. et al. Antigenic and immunogenic characterization of infectious bronchitis strains isolated in China between 1986 and 1995. **Avian Pathol.**, v. 27, p. 578-585, 1998.
- 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, n. 3, p. 569-570, 1994.
- VILLA, M. F. G. "Programa Nacional de Sanidade Avícola: de 1994 a 1998". In: CONFERÊNCIA APINCO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLAS – SÍMPOSIUM INTERNACIONAL SOBRE SANIDADE AVÍCOLA, 1998, Campinas. **Anais...** Campinas: FACTA, 1998. p. 33-45.
- VILLEGAS, P. **Laboratory manual of avian virus diseases**. Georgia/USA: College of Veterinary Medicine, 1985. 56 p.
- ZANELLA, A. Avian infectious bronchitis: properties and application of attenuated vaccine prepared with nephropathogenic strain AZ-23/74. In: FIRST INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON INFECTIOUS BRONCHITIS, 1988, Rauschholzhausen. **Proceedings...** Rauschholzhausen, Germany, 1988. p. 335-342.
- ZANOTTO, P. M. A.; GOULD, E. A.; HOLMES, E. C. The limits of molecular phylogeny: the case of the genus *Flavivirus* and the family *Flaviviridae*. **Virus Reviews & Res.**, v. 01, p. 29-38, 1996.
- ZWAAGSTRA, K. A.; VAN DER ZEIJST, B. A. M.; KUSTERS, J. G. Rapid detection and identification of avian infectious bronchitis virus. **J. Clin. Microbiol.**, v. 30, p. 79-84, 1992.
- 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.