

**UFRRJ**  
**INSTITUTO DE VETERINÁRIA**  
**CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

**DISSERTAÇÃO**

**Desenvolvimento de um RT-PCR RFLP para a detecção e diferenciação  
molecular das variantes vacinais e brasileiras do vírus da Bronquite  
Infecciosa das Galinhas**

**Débora Martins dos Santos**

**2017**



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO  
INSTITUTO DE VETERINÁRIA  
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

**DESENVOLVIMENTO DE UM RT-PCR RFLP PARA A DETECÇÃO  
E DIFERENCIAÇÃO MOLECULAR DAS VARIANTES VACINAIS E  
BRASILEIRAS DO VÍRUS DA BRONQUITE INFECCIOSA DAS  
GALINHAS**

**DÉBORA MARTINS DOS SANTOS**

*Sob a orientação do Professor*  
**Huarrisson Azevedo Santos**

*Coorientação*  
**Marcos Fábio de Lima**

Dissertação submetida como requisito parcial  
para obtenção do grau de **Mestre em**  
**Ciências**, no Curso de Pós-Graduação em  
Ciências Veterinárias.

Seropédica, RJ.  
Março de 2017

Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro  
Biblioteca Central / Seção de Processamento Técnico

Ficha catalográfica elaborada  
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

S194d Santos, Débora Martins dos , 1988-  
Desenvolvimento de um RT-PCR RFLP para a detecção e  
diferenciação molecular das variantes vacinais e  
brasileiras do vírus da Bronquite Infecciosa das  
Galinhas / Débora Martins dos Santos. - 2017.  
67 f.

Orientador: Huarrisson Azevedo Santos.  
Coorientador: Marcos Fábio de Lima.  
Dissertação(Mestrado). -- Universidade Federal  
Rural do Rio de Janeiro, INSTITUTO DE VETERINÁRIA,  
2017.

1. vBIG. 2. RT PCR RFLP. 3. Coronavirus. I.  
Santos, Huarrisson Azevedo , 1980-, orient. II. Lima,  
Marcos Fábio de, 1977-, coorient. III Universidade  
Federal Rural do Rio de Janeiro. INSTITUTO DE  
VETERINÁRIA. IV. Título.

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO**  
**INSTITUTO DE VETERINÁRIA**  
**CURSO DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

**DÉBORA MARTINS DOS SANTOS**

Dissertação submetida como requisito parcial para a obtenção do grau de **Mestre em Ciências Veterinárias**, no Curso de Pós Graduação em Ciências Veterinárias.

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 07/03/2017



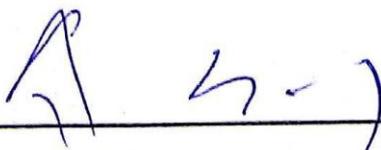
---

Huarrisson Azevedo Santos (DR.) UFRRJ



---

Daniel da Silva Guedes Junior (DR.) FIOCRUZ



---

Paulo Cesar Augusto de Souza (DR.) UFRRJ

*Dedico esta dissertação aos animais. A todos eles que me trouxeram até aqui, que me engrandeceram como ser humano e que sem perceber me transformaram em quem eu sou hoje.*

## AGRADECIMENTOS

Não existe trabalho solo, não tem como fazer uma dissertação sem ter uma lista extensa de agradecimentos, a começar pelo meu orientador Huarrisson Azevedo, pela confiança, pela oportunidade, e pelos ensinamentos. Agradeço também ao meu coorientador Marcos Fábio, por estar sempre disposto a nos ajudar e iluminar nosso caminho pela avicultura do Estado.

A minha mãe Carla Maria da Fonseca Martins por ser você, me motivar, e não me deixar desistir nunca. Obrigada pelo suporte e pelas comidas congeladas. Ao meu pai Sebastião dos Santos por ouvir as ligações chorosas e compreender minha ausência.

Aos meus irmãos Marcello Martins dos Santos e Bernardo Martins dos Santos. Marcello, por me mostrar a possibilidade de uma vida acadêmica- só cheguei à conclusão do mestrado, porque você me mostrou o caminho, não sei exprimir o orgulho de ter você como irmão-. Ao Bernardo, por acreditar em mim, por não permitir que o medo me paralisasse ou sabotasse, e, principalmente, pelos puxões de orelha que só você sabe dar.

A minha companheira de casa e amiga Jéssica D'avilla, por entender até os meus silêncios. A Thamyris Sampaio, pela companhia nas missões e por me trazer até aqui, sem seu apoio, e tudo isso que faz sempre eu não teria nem entrado na pós-graduação.

A Tays Araujo, o Patati do meu Patatá, o mestrado não seria o mesmo se não o enfrentássemos juntas. Obrigada por ser minha dupla, e por segurar a barra rindo quando a gente queria mesmo era chorar.

A Virgínia Tavares e Ricardo Fernandes, por sempre atenderem minhas ligações de madrugada. Ao Pedro José Gonçalves, pelo companheirismo e os desabafos mesmo a quilômetros de distância. A Fernanda Moreira por ter me dado a Sophia, e ter entendido minha ausência nesse período. A Daniela Coelho, por toda a disposição para nos ajudar. A Rih Sathler e a Rit Sathler, as irmãs mais lindas que me ajudaram a espairer quando as coisas simplesmente não funcionavam. A Anna Carolina Ferreira, por me ajudar a me encontrar nessa trajetória difícil que foram os últimos 2 anos. A Tatiana Gouvêa e a Cinthia Draia pela torcida silenciosa e eterna que vocês sempre fazem. Ao Fillipe Araújo, porque você acredita em mim mesmo quando eu só sei chorar e dizer que não consigo.

A toda a equipe do Laboratório de Hemoparasitos e Vetores e ao Laboratório de Sanidade Avícola por compartilharem comigo sua experiência, sem a ajuda de vocês, o laboratório possivelmente teria explodido antes do fim dessa dissertação.

Agradeço também o Gabriel Menezes, pelos açaís, as conversas e por me buscar na rodoviária as 23horas de um domingo. Ao Fernando Costa, por compartilhar seus conhecimentos em informática, e me salvar inúmeras vezes, quer seja com palavras de conforto, ou com as magias operacionais desse mundo tecnológico que só você entende.

Ao Josemar Gonçalves, nosso querido Jô, por sempre estar disposto a nos ajudar, por transformar nossas coletas em algo tão divertido, e pelo bolo de chocolate, nos dias difíceis.

A Letícia Isidoro por me abrigar na sua casa por mais de uma semana e comemorar comigo cada vitória.

Ao Professor Paulo César, por prontamente telefonar para seus amigos e nos ajudar a avançar quando queríamos desistir. Ao Professor José Piantino por gentilmente ceder à cepa de BR-I. Aos animais (os meus e aos utilizados nesse Estudo) que tanto me ensinaram, e que tanto me fizeram crescer e que sempre me recebem com amor incondicional.

Obrigada a cada pessoa que cruzou meu caminho e que de alguma forma me ajudou a enxergar mais adiante e seguir em frente.

Não foi um período fácil. Mas não existem dúvidas de que foi um período de muito aprendizado profissional, e principalmente de crescimento pessoal.

## **BIOGRAFIA**

Débora Martins dos Santos, filha de Carla Maria da Fonseca Martins e Sebastião dos Santos, nasceu em 13 de janeiro de 1988, no município de Barra do Piraí, estado do Rio de Janeiro. cursou o ensino fundamental no Instituto de Educação Nossa Senhora de Medianeira e o ensino médio no Colégio Comercial Candido Mendes em Barra do Piraí, Rio de Janeiro, concluindo em 2005. No ano de 2007 ingressou na Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro no curso de Medicina Veterinária. Durante a graduação realizou estágios na área de química fisiológica, no período compreendido entre março de 2008 e março de 2009, quando passou a ocupar a posição de monitora bolsista da mesma disciplina, onde atuou de abril de 2009 até dezembro de 2011. Estagiou no Centro de Triagem de Animais Silvestres (CETAS), em Seropédica durante o período de junho de 2008 até março de 2009. Posteriormente, estagiou na clínica de pequenos animais Alvorada situada em Campo Grande (RJ) no período de abril de 2012 até junho de 2012. Estagiou no setor de clínica médica de pequenos animais da UNESP campus de Botucatu durante o período de Julho do mesmo ano. Estagiou na Clínica West Care, especializada em animais de pequeno porte, no município de Campo Grande, Rio de Janeiro, de abril de 2013 a setembro de 2013. Estagiou no Centro de Intensivismo CIMVERJ, localizado no bairro Jardim Botânico, no período de agosto de 2013 a março de 2014. Seu trabalho de pesquisa foi desenvolvido sobre parâmetros hemogasométricos em cabras no setor de Caprinos da UFRRJ, de setembro de 2013 a março de 2014. Formou-se ao fim do primeiro semestre de 2014. Em 2015 ingressou no Curso de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, nível de Mestrado em Parasitologia Veterinária, na Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, sob orientação do professor Dr. Huarrisson Azevedo, sendo contemplada com bolsa CAPES. Ao longo do curso de mestrado, entre os anos de 2015 e 2016, desenvolveu trabalhos, juntamente com seus orientadores e a equipe de trabalho, e participou de alguns projetos do laboratório de Hemoparasitos e Vetores, localizado na Estação de Pesquisas Parasitológicas W.O. Neitz da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

## RESUMO

SANTOS, Débora Martins dos. **Desenvolvimento de um RT-PCR RFLP para a detecção e diferenciação molecular das variantes vacinais e brasileiras do vírus da Bronquite infecciosa das Galinhas**. 2017. 67p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias). Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2017.

A Bronquite Infecciosa das Galinhas (BIG) é uma doença causada por um vírus RNA de fita simples pertencente à Família Coronaviridae, do gênero *Gammacoronavirus*. A BIG é uma doença de alta importância econômica para a avicultura mundial, não só por causar prejuízos aos plantéis acometidos pela doença, como também, por ser diagnóstico diferencial de diversas patologias importantes na sanidade avícola. O objetivo da presente pesquisa foi desenvolver uma técnica de RT-PCR RFLP capaz de detectar e discriminar com segurança as cepas do vBIG do sorotipo Massachusetts e BR a partir de tecidos da traqueia, rim e intestino em granjas de frango de corte e postura, no Estado do Rio de Janeiro. Neste estudo, foram coletadas 117 amostras de intestino, rim e/ou traqueia de um total de 50 aves provenientes de quatro granjas (três granjas de corte e uma granja de postura), no estado do Rio de Janeiro. O RNA total foi extraído de todas as amostras e submetidos a uma reação de transcrição reversa, para realizar a síntese do cDNA. As amostras de cDNA foram submetidas à técnica de RT-qPCR. Desta maneira, constatou-se que 92% das aves ( $n = 46/50$ ) foram positivas em pelo menos um dos órgãos para o vírus da bronquite das galinhas (vBIG). A técnica de RT-PCR RFLP desenvolvido por esse trabalho foi capaz de detectar uma frequência de 94,64% ( $n = 53/56$ ) das amostras pertencentes ao sorotipo BR-I, 3,57% ( $n = 2/56$ ) das amostras apresentaram fragmentos com padrão semelhante ao esperado do sorotipo Massachusetts e 1,78% ( $1/56$ ) apresentou padrão para ambos os sorotipos (Massachusetts e BR). Não houve diferença significativa entre a frequência da detecção molecular do vBIG nos tecidos da traqueia, rim e intestino de frangos de corte e galinhas de postura de granjas no estado do Rio de Janeiro. A técnica de RT-PCR RFLP foi capaz de detectar e diferenciar com segurança os sorotipos Massachusetts e BR. A alta frequência do sorotipo BR demonstra que apesar de vacinadas, as aves desenvolveram a doença, sugerindo, que um novo protocolo vacinal deva ser abordado, já que a maioria das cepas encontradas pertence a um sorotipo geneticamente distinto.

**Palavras Chave:** vBIG; RT PCR RFLP; *Coronavirus*.

## ABSTRACT

SANTOS, Débora Martins dos. **Development of a RT-PCR RFLP for the detection and molecular differentiation of vaccine and Brazilian variants of the Infectious Bronchitis Virus of Chickens.** 2017.67p. Dissertation (Master in Veterinary Science). Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2017.

The avian infectious bronchitis (AIB) is a disease caused by a single-stranded RNA virus pertaining to the coronaviridae family of the *Gammacoronavirus* genera. AIB is a disease of great economic significance to aviculture worldwide, not only because of the injury it causes to the breeders, but also because it is a differential diagnosis for several important pathologies that may affect poultry. The goals of the present research were to develop a RT-PCR RFLP technique capable of safely detecting and discriminating the strains of the IBV of the Massachusetts and BR serotypes from the trachea, kidney and intestines tissues in poultry farms of broilers and layers in the estate of Rio de Janeiro. In this study, 117 samples of intestines, kidneys and/or tracheae were collected from a total of 50 birds originating from 4 farms (three broiler farms and one layer farm) in the estate of Rio de Janeiro. The total RNA was extracted from all the samples and subjected to a reverse transcription process for the cDNA synthesis. The cDNA samples were subjected to the RT-qPCR technique. It was found that 92% of the birds (n= 46/50) were positive in at least one of the organs for the chicken bronchitis virus (vBIG). The RT-PCR RFLP technique developed in this work was able to detect a frequency of 94,64% (n= 53/56) of the samples belonging to the BR-I serotype, 3,7% (n= 2/56) of the samples showed fragments with patterns similar to what is expected from the Massachusetts Serotype and 1,78% (n= 1/56) showed patterns from both serotypes (Massachusetts and BR). There was no significant difference in the frequency of molecular detection of vBIG in the tissues of the trachea, kidney and intestines of the broiler and layer poultries from farms in the estate of Rio de Janeiro. The RT-PCR RFLP technique was able to safely detect and distinguish the Massachusetts and BR serotypes. The high frequency of the BR serotype demonstrates that, although vaccinated, the birds developed the disease, indicating that a new vaccine protocol must be addressed, since the majority of the strains found belong to a genetically distinct serotype.

**Key-words:** IBV; RT-PCR RFLP; *Coronavirus*.

## LISTA DE ABREVIACOES

qPCR	reao em cadeia da polimerase em tempo real;
cDNA	ácido desoxirribonucleico complementar;
RNA	cido ribonucleico;
COT	cultura de rgo traqueais;
PCR	reao em cadeia da polimerase;
vBIG	vrus da bronquite infecciosa das galinhas;
BIG	bronquite infecciosa das galinhas;
RFLP	técnica de polimorfismo do comprimento do fragmento;
Lasave	Laboratório de Sanidade Avícola da UFRRJ;
PCR	reação em cadeia de polimerase convencional;
EDTA	cido etileno-diamino-tetracético;
<i>Cq</i>	<i>cycle quantification</i> ;
Tm	temperatura de dissociação;
DP	desvio padrão
Pb	pares de bases
C	Celsius
$\mu$ l	microlitros
COMEP/UFRRJ	- Comit de tica na Pesquisa da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro-UFRRJ;
E.E.P.P. W.O. Neitz	- Laboratório de Hemoparasitos e Vetores da Estação Experimental de Pesquisa Parasitológica W.O. Neitz

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Ilustração do Genoma do IBV (JACKWOOD,2012) .....	20
<b>Figura 2.</b> Desenho esquemático do IBV, destacando suas proteínas estruturais (COLLISSON, 2000).....	26
<b>Figura 3.</b> Figuras A e B das granjas de frango de corte (granja Vargem Alegre) em sistema de criação intensivo, e Figuras C e D correspondem a granja de galinhas de postura (Macaé) em sistema de criação semi-extensiva, ambas localizadas no estado do Rio de Janeiro, nas mesorregiões Sul e Norte Fluminense, respectivamente.....	26
<b>Figura 4.</b> Gráfico comparativo das médias e desvio padrão da concentração de RNA total em ng/ $\mu$ L extraído pelo método de Trizol das amostras do rim, traqueia e intestino de frangos de corte e galinha de postura de granjas do estado do Rio de Janeiro.. .....	37
<b>Figura 5.</b> Perfil eletroforético em gel de agarose a 1,5%, corado por brometo de etídeo. O RNA total extraído a partir de amostras do tecido renal de frangos de corte pertencentes a 4 animais da granja pertencente ao município de Lídice localizada no estado do Rio de Janeiro. As bandas visualizadas correspondem ao RNA total extraído a partir das amostras 55, 56, 57 e 58, respectivamente.. .....	37
<b>Figura 6.</b> Frequência do vírus da Bronquite Infecciosa das Galinhas através da técnica de RT-qPCR nos tecidos da traqueia, rim e intestino de frangos de corte e galinhas de postura de granjas do estado do Rio de Janeiro para triagem das amostras.....	38
<b>Figura 7.</b> Eletroforese em gel de agarose 2% corado com brometo de etídeo, mostrando a amplificação de 236 pares de base do gene S1 do vírus da Bronquite Infecciosa das Galinhas por RT-PCR a partir de tecidos da traqueia, rim e intestino de frangos de corte e galinhas de postura em granjas do estado do Rio de Janeiro. PM = Marcador de peso molecular de 1Kb (Invitrogen); Linhas 1-10 amostras positivas da traqueia, rim e intestino; Linha 11 – Controle Positivo (massachusetts); Linha 12 – Controle negativo de amplificação. ....	38
<b>Figura 8.</b> Perfil eletroforético em gel de agarose (3%) da reação realizada pelas endonucleases de restrição SspI e PvuII, com o intuito de diferenciar as amostras entre os sorotipos massachusetts e BR-I. Na ordem da esquerda para direita: CN é o controle negativo, CP é o controle positivo da cepa vacinal Massachusetts. As iniciais I (Intestino), R (Rim) e T (Traquéia) são utilizadas para determinar o órgão de origem de cada amostra. ....	40
<b>Figura 9.</b> Agrupamento filogenético baseado em 600 nucleotídeos do gene S1 do vBIG detectados por RT-qPCR em tecidos de aves naturalmente infectadas em granjas do estado do Rio de Janeiro. O conjunto de dados total foram de 4 sequências disponíveis no GenBank. Em sorotipo BR estão agrupadas as sequências classificadas como variantes virais Brasileiras (BR) e em sorotipo Massachusetts, as amostras classificadas como variantes da cepa do sorotipo Massachusetts. As iniciais I (Intestino), R (Rim) e T (Traqueia) são utilizadas para determinar o órgão de origem de cada amostra.....	41

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Relação de granjas de frangos de corte e de postura localizadas nas mesorregiões Sul e Norte fluminense do estado do Rio de Janeiro. Na tabela está detalhado o número de aves coletadas por granja, o tipo de criação e a idade das aves no momento da coleta.. .....	256
<b>Tabela 2.</b> Sequências utilizadas para a prospecção dos oligonucleotídeos iniciadores.....	29
<b>Tabela 3.</b> Banco de dados do gene s1 do vírus da bronquite infecciosa das galinhas contendo as cepas brasileiras utilizadas para a análise filogenética das amostras sequenciadas. Nesta tabela podem ser visualizados, o nome da cepa, o ano que foi isolada, o sorotipo e o número de acesso no Genbank.....	31
<b>Tabela 4.</b> Frequência do vírus da Bronquite Infecciosa da Galinhas detectados por RT-qPCR em tecido traqueal, renal e intestinal de frangos de corte de galinhas de postura em granjas no estado do Rio de Janeiro.....	39
<b>Tabela 5.</b> Volume de tampão RLT para células lisadas.....	58
<b>Tabela 4.</b> Volumes de Tampão RLT para lise celular direta de células cultivadas em uma monocamada.....	58

## SUMARIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>14</b>
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>16</b>
2.1 Histórico .....	16
2.2 Distribuição Geográfica.....	17
2.3 Taxonomia.....	17
2.4 Morfologia.....	17
2.5 Classificação das Cepas.....	19
2.6 Patogenia e Sintomatologia .....	20
2.7 Transmissão e Prevenção .....	21
2.8 Diagnóstico.....	22
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>24</b>
3.1 Local de Coleta, Amostragem e Coleta das Amostras .....	24
3.2 Extração do RNA Total do Tecido de Traquéia, Rim e Intestino de Frangos de Corte e Galinhas de Postura pelo Método de Trizol .....	25
3.3 Extração do RNA Total dos Controles Positivos .....	26
3.3.1 Extração do RNA total do vírus vivo atenuado da BIG a partir da vacina NOBILIS....	26
3.3.2 Extração do RNA total da cepa BR1 do vírus da BIG a partir de uma amostra conservada em cartão FTA.....	26
3.4 Reação de TRANSCRIÇÃO REVERSA para SÍNTESE de cDNA a partir do RNA Total Extraído do Tecido de Traquéia, Rim e Intestino .....	26
3.5 Reação de RT-qPCR para Detecção Molecular do vBIG a partir do Tecido de Traqueia, Rim e Intestino de Frangos de Corte e Galinhas de Postura .....	26
3.6 Análise <i>in silico</i> da Digestão por Endonucleases de Restrição para Identificação Diferencial das Cepas do vBIG Pertencentes ao Sorotipo Massachusetts e BR1 .....	27
3.6.1 Prospecção dos oligonucleotídeos iniciadores e seleção das endonucleases de restrição .....	27
3.6.2 Padronização da concentração ótima dos oligonucleotídeos iniciadores .....	29
3.7 Reação de RT- PCR para Detecção Molecular dos Vírus da BIG dos Sorotipos Massachusetts e BR.....	29
3.8 PCR- Polimorfismo do Comprimento de Fragmento de Restrição/ “Restriction Fragment Length Polymorphism” – (RT-PCR RFLP) .....	29
3.9 Seleção dos Tampões para Reação de Digestão Enzimática.....	30
3.10 Nested PCR e Sequenciamento para Confirmação da Genotipagem do vBIG Gerado pela Técnica da RT-PCR RFLP .....	30
3.11 Análise Filogenética do vBIG a partir da Sequência Parcial do Gene S1 .....	31
3.12 Análises Estatística.....	32
<b>4 RESULTADO E DISCUSSÃO.....</b>	<b>34</b>
4.1 Extração e Quantificação de RNA Total .....	34
4.2 Resultados da Reação de RT-qPCR para Detecção Molecular do vBIG .....	36
4.3 PCR - Resultados do Polimorfismo do Comprimento de Fragmento de Restrição/ “Restriction Fragment Length Polymorphism” – (RT-PCR RFLP).....	38
<b>5 CONCLUSÃO.....</b>	<b>45</b>
<b>6 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>46</b>
<b>7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>47</b>
<b>8 ANEXOS .....</b>	<b>55</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A bronquite infecciosa das Galinhas (BIG) é uma doença altamente infecciosa do trato respiratório superior em galinhas (CAVANAGH & NAQI, 2003). Além disso, o vírus da BIG (vBIG) também pode afetar os rins e o trato reprodutivo.

A doença é de suma importância para a indústria avícola devido à alta morbidade e perdas de produção associadas à doença. O vírus possui uma variedade de tipos antigênicos geneticamente distintos, tornando a prevenção e o controle deste importante agente patogênico complexo e desafiador. Embora o hospedeiro natural do vBIG seja o *Gallus gallus*, o coronavírus do tipo vBIG e outros coronavírus avícolas são capazes de infectar outros animais domésticos e selvagens (CAVANAGH, 2005, 2007).

O vBIG é um vírus RNA de sentido único, de cadeia simples, da família *Coronaviridae*, do gênero *Gammacoronavirus* (CAVANAGH & NAQI, 2003). Seu genoma viral compreende duas regiões não traduzidas (UTRs) nas extremidades 5' e 3' dois quadros de leitura aberta (ORFs) sobrepostos codificando as poliproteínas 1a e 1ab e regiões, que codificam as principais proteínas estruturais; espícula (S), envelope (E), membrana (M) e nucleocápsideo (N) (SPAAN et al., 1988; SUTOU et al., 1988).

Além disso, foram descritos dois genes acessórios, ORF3 e ORF5, que expressam as proteínas 3a e 3b, e 5a e 5b, respectivamente (LAI & CAVANAGH, 1997; CASAIS et al., 2005). A proteína S, localizada na superfície da membrana viral, é o principal indutor de anticorpos neutralizantes (CAVANAGH & NAQI, 1997; WINTER et al., 2008), e é responsável pela ligação do vírus e pela entrada nas células hospedeiras (CAVANAGH et al., 1986; NIESTERS et al., 1987; KOCH et al., 1990).

Os ensaios de diagnóstico atuais para o vBIG incluem o isolamento do vírus em ovos embrionados, cultura de órgãos traqueais ou imunoenaios de culturas de células, assim como ensaios moleculares que detectam o RNA viral (GELB & JACKWOOD, 1998).

O isolamento do vírus é considerado o padrão de referência; contudo, é caro e demorado porque podem ser necessárias várias passagens para detectar o vírus. Os imunoenaios utilizam anticorpos monoclonais específicos do vBIG para detectar o vírus de forma direta ou indireta através da técnica de ELISA (“Enzyme-Linked Immunosorbent Assay”).

No entanto, apesar de serem mais rápidos e simples quando comparado ao isolamento do vírus, os imunoenaios carecem de especificidade e sensibilidade e nenhum deles pode detectar todas as estirpes ou tipos do vBIG (KARACA & NAQI, 1993).

Assim, os ensaios moleculares para a detecção do vBIG são comumente utilizados porque eles fornecem resultados altamente específicos e sensíveis em tempo hábil. Estes ensaios utilizam a transcrição reversa seguida da reação em cadeia da polimerase (RT-PCR) para detectar diretamente o RNA viral a partir de uma amostra clínica ou de um vírus isolado em um sistema que utiliza hospedeiro de laboratório. Quando a RT-PCR é utilizada para amplificar o gene S que codificam para a glicoproteína da espícula do vBIG, pode ser associada com a técnica que avalia o polimorfismo de comprimento do fragmento de restrição (RT-PCR RFLP) ou sequenciamento de ácido nucleico para identificar o genótipo do vírus (KWON et al., 1993; JACKWOOD et al., 1997; KEELER et al., 1998).

Variantes do vBIG têm sido relatadas no Brasil (VILLARREAL et al., 2007, CHACÓN et al., 2009). Em um estudo realizado por Chacón et al. (2011), o vBIG foi isolado de diferentes tipos de aves, com diferentes doenças clínicas e de maior número de regiões geográficas. No mesmo trabalho, amostras de campo coletadas de nove estados brasileiros, foram avaliadas por RT-PCR e sequenciamento durante 7 anos para caracterização molecular do vBIG. O vBIG foi detectado em 212 granjas (84%) e 83% dos vBIGs detectados (175 vírus) não estava relacionada com o sorotipo Massachusetts. Os resultados desse trabalho

demonstram que apesar da vacinação ser realizada com as cepas do sorotipo Massachusetts, a variante viral predominante no campo pertence ao sorotipo BR.

Deste modo, o objetivo da presente pesquisa foi desenvolver uma técnica de RT-PCR RFLP capaz de detectar e discriminar com segurança as cepas do vBIG do sorotipo Massachusetts e BR, a partir de tecidos da traqueia, rim e intestino em granjas de frango de corte e postura no Estado do Rio de Janeiro.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

A Bronquite infecciosa das galinhas é uma doença de caráter agudo causado por um *Coronavirus* que acomete aves, principalmente a galinha doméstica (*Gallus*), de todas as idades e de ambos os sexos. Conhecida também como Coronavirose das galinhas domésticas (ETERRADOSSI & BRITTON, 2013), é uma doença de baixa mortalidade e elevada morbidade que acomete de forma mais agressiva aves jovens (LIMA, 2007; CAVANAGH & GELB, 2008; FRAGA et al., 2013).

Seus sinais clínicos incluem agonia respiratória, espirros, alterações renais ou intestinais dependendo do tropismo da estirpe que acomete o plantel. Em aves de corte podem ocorrer casos de miopatia (CAVANAGH & GELB, 2008) e em granjas de postura a principal preocupação são com problemas reprodutivos que podem surgir quando o oviduto é acometido, ocasionando queda da produção e produção de ovos defeituosos, reduzindo desta forma a produção em bandos comerciais de aves.

Além disso, a presença de coinfeções com bactérias como *Mycoplasma* ou *Escherichia coli* são responsáveis pela condenação de um grande número de carcaças em matadouros, gerando grande impacto econômico na indústria avícola.

Logo, o prejuízo econômico acontece principalmente porque as aves poedeiras afetadas possuem acentuada queda na produção e na qualidade dos ovos, enquanto as aves de corte possuem dificuldade de atingir o peso de abate, causando prejuízos ao produtor avícola (CAVANAGH & GELB, 2008).

### 2.1 Histórico

A bronquite infecciosa das galinhas foi observada pela primeira vez nos Estados Unidos, no estado de Dakota do Norte na década de 30. O primeiro relato aconteceu em 1931 por Shalk e Hawn quando se observou sinais clínicos respiratórios em aves jovens, devido a este fato a patologia foi denominada inicialmente por “Doença Infecciosa de pintos jovens”, porém posteriormente soube-se que a doença acometia também animais em faixas etárias superiores (BANDE et al., 2016). Em 1936 foi identificado o agente etiológico sendo este um vírus (BEACH & SCHALM, 1936).

Os sorotipos Massachusetts e Connecticut foram os primeiros isolados na década de 1940 e 1950, respectivamente, e desde seus isolamentos até 1956, apenas as cepas originais eram identificadas, até que Jungherr e colaboradores identificaram através do método de vírus neutralização, a primeira variante genética das cepas originais (DE WIT et al., 2011; COOK et al., 2012). E, a partir de então foram descritas várias cepas variantes, divergindo das originais e formando sublinhagens exclusivas de cada país (HEWSON et al., 2009).

Até a década de 40, acreditava-se que era uma doença que acometia apenas o trato respiratório, no entanto foram observadas outras manifestações clínicas, como queda na postura de ovos. Já na década de 60 foram observadas lesões renais que foram associadas com a infecção viral.

A prevalência da doença em 1941 resultou em enormes perdas econômicas e por consequência numa tentativa de minimizar os efeitos negativos e prevenir a doença utilizando uma técnica de exposição controladas das aves ao vírus durante o estágio de crescimento. Esse esforço inicial, realizado por Van Roekel foi o primeiro passo para o desenvolvimento de uma vacina e dos protocolos vacinais utilizados nos dias de hoje (CAVANAGH & GELB 2008; COOK et al., 2012).

No Brasil, o vBI do sorotipo Massachusetts foi originalmente identificado em 1957, por Hipólito, em Minas Gerais e nas três décadas seguintes, os isolados de vBI de pelo menos

5 tipos antigênicos diferentes já tinham sido identificados em produções comerciais em todo o Brasil (DI FABIO et al., 2000).

## 2.2 Distribuição Geográfica

O vírus da Bronquite Infecciosa (vBIG) possui distribuição cosmopolita com crescente aumento da variabilidade das cepas desde o momento inicial da sua identificação. As cepas tipo Massachusetts foram identificadas, além dos Estados Unidos, em outros países da Ásia e Europa. (CAVANAGH & GELB, 2008).

O vBIG está presente na maioria das regiões onde as aves são criadas em confinamento e possui alta morbidade em aves não protegidas. A ocorrência de surtos é frequente até mesmo em planteis vacinados, uma vez que a vacina imuniza o plantel apenas para determinadas cepas, podendo este ser acometido por uma cepa diferente ocasionando surtos e a manifestações clínicas da doença (CAVANAGH & GELB, 2008).

Isto é, a frequência de mutações genéticas e eventos de recombinação contribuem para o surgimento de novas cepas e sorotipos do vírus. A maioria das cepas de vBIGs permanece confinada em uma determinada região, enquanto outras poucas estirpes como, Massachusetts e QX possuem uma maior mobilidade gerando um comportamento de caráter cosmopolita (FRAGA et al., 2013).

## 2.3 Taxonomia

O vBIG é o agente etiológico da bronquite infecciosa (BI), sendo conhecido por ocasionar a maior parte das afecções por Coronavíruses em aves (MONTASSIER, 2008). Este taxonomicamente pertence à família *Coronaviridae*, ordem *Nidovirales*, gênero *Gammacoronavirus* (GONZALEZ et al., 2003). A família se subdivide em outros quatro gêneros de coronavírus: Alpha, Beta, Gama e Delta.

Estudos atuais indicam que os morcegos são a fonte ancestral dos *Betacoronavirus* e aves a fonte de Gama e *Deltacoronavirus* (WOO et al., 2012). Os *Alphacoronavirus* e os *Betacoronavirus* infectam mamíferos, sendo o primeiro comum em animais como suínos, gatos, cães e seres humanos, e o segundo gênero mais frequência em outros mamíferos como morcegos, humanos, roedores e ungulados (ABOLNIK, 2015).

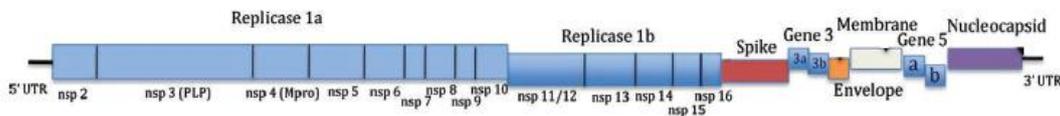
Estes gêneros se diferenciam extensivamente do vírus BIG no que diz respeito a organização do genoma e as sequências genéticas. O gênero *Gammacoronavirus* inclui estirpes que infectam aves e baleias (WOO et al., 2012; BORUCKI et al., 2013; MCBRIDE et al. 2014) e *Deltacoronavirus* têm ocasionado doença em aves, suínos e gatos (WOO et al., 2012). Já o vírus da Bronquite Infecciosa pertence ao gênero *Gammacoronavirus*, juntamente com outras coronavíruses aviárias, este grupo era anteriormente nomeado como grupo 3, lembrando que os grupos 1, 2 e 4 são pertencentes aos mamíferos (CAVANAGH & GELB, 2008; FELLAHI et al., 2015).

## 2.4 Morfologia

O vBI é um *Coronavirus* do tipo pleomórfico, que possui um envelope de aproximadamente 120 nm de diâmetro, com projeções espinhosas em sua superfície de aproximadamente 20 nm de comprimento, (CAVANAGH & GELB, 2008).

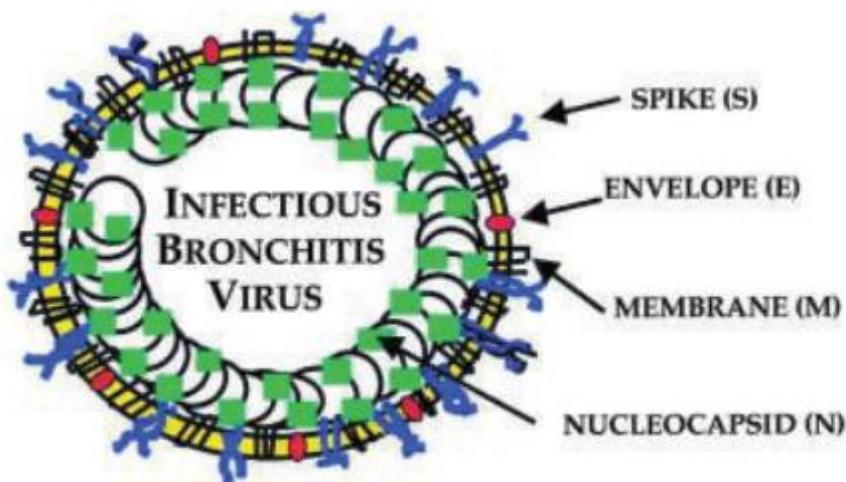
Seu genoma é linear, com RNA de fita simples, de polaridade positiva, com aproximadamente 27 Kb – 32 Kb de comprimento, conforme demonstrado na Figura 1, e produz vírions envelopados (BANDE et al. 2016). Uma parte do seu genoma consiste de

cinco genes codificando as proteínas estruturais, na seguinte ordem: 5'- ORF1 a / b - S - E- M - N -3'.



**Figura 1.** Ilustração do Genoma do IBV (JACKWOOD, 2012).

O vBI possui quatro proteínas estruturais principais, são elas: glicoproteína de espícula (S), glicoproteína integral de membrana (M), proteína fosforilada de nucleocapsídeo (N) e a proteína de envelopagem (E) (Figura 2) (FELLAHI et al., 2015).



**Figura 2.** Desenho esquemático do IBV, destacando suas proteínas estruturais (COLLISSON, 2000).

A proteína S é composta pela clivagem de dois polipeptídios separados S1 e S2 com aproximadamente 535 e 625 aminoácidos, respectivamente, sendo altamente polimórfica e considerada uma das principais responsáveis pela variação antigênica do vírus (MONTASSIER, 2008; JACKWOOD et al., 2012).

A subunidade S1 é a responsável pela adsorção ao receptor celular e entrada do vírus na célula hospedeira, ou seja, pela infectividade viral, além de induzir anticorpos neutralizantes responsáveis pela resposta imunológica (FRAGA et al., 2013). Aliás, esta é caracterizada por possuir regiões específicas com sequências de aminoácidos, também denominadas de regiões hipervariáveis, que variam com grande frequência e estão diretamente relacionadas à diversidade de sorotipos de vBIG.

Logo a evolução dos genótipos do vBIG está associada com mudanças nas sequências de aminoácidos do gene S1, essa caracterização evolucionária do vBIG é principalmente baseada na análise da região variável do gene S1 ou na expressão da proteína (FELLAHI et al., 2015), desta forma, a variação da glicoproteína S1 determina em parte o tropismo e a virulência (BANDE et al., 2016).

A proteína M é a proteína transmembrana mais abundante e atua na montagem do *Coronavirus* entre o nucleocapsídeo viral e a proteína S (BANDE, 2016). A subunidade da proteína de espícula (S1) e a proteína de nucleocapsídeo (N) são consideradas as proteínas

mais importantes para o vírus da bronquite, visto que possui variabilidade dos seus genes codificadores e propriedades fenotípicas relacionadas a patogenia e a imunidade gerada pela interação parasito-hospedeiro (MONTASSIER, 2008).

Já, a proteína N está ligada ao RNA genômico viral e participa dos processos de replicação viral, apresentando epítomos para células T citotóxicas, ou seja, participa efetivamente do processo de resposta imunológica do hospedeiro (MONTASSIER, 2008).

A proteína E é a proteína menos frequente se comparada às demais. Alguns estudos demonstraram que a proteína E fica localizada no complexo de Golgi das células infectadas e está integralmente associada com a formação dos envelopes virais, com a montagem, a construção com a atividade dos canais de íons e a apoptose celular (BANDE, 2016).

## 2.5 Classificação das Cepas

Diferentes estirpes do vírus da bronquite estão distribuídas globalmente (FELLAHI et al., 2015). Porém, outras tendem a se localizar em países restritos. Já foram identificados mais de 20 sorotipos diferentes de vBIG no mundo, envolvendo mutações do gene S1 que as tornam estirpes distintas das originais ambiental e vacinal, distintas ainda entre si (FRAGA et al., 2013).

Esse constante aparecimento de um grande número de variantes em diferentes regiões é uma grande restrição para a aplicação prática da sorotipagem (DE WIT et al., 2011). A sorotipagem de estirpes de vBIG é geralmente realizada baseada em epítomos específicos de sorotipo induzido por galinha (KOCH et al., 1990).

Assim, como muitos métodos são usados para diferenciar e classificar os isolados de vBIG e sorotipos, mais recentemente genótipos baseados na proteína S são utilizados para classificar estas cepas. A genotipagem é baseada na amplificação da região altamente variável do gene S1 por reação em cadeia de polimerase de transcriptase reversa (RT-PCR), seguida por sequenciamento (JACKWOOD et al., 1992).

Após a identificação das cepas iniciais e posterior surgimento de novas estirpes a partir das cepas iniciais, diversas variantes de campo foram detectadas e associadas a diferentes sinais clínicos da BIG em regiões produtoras de aves do mundo.

Na América do Sul, de 2001 a 2008, dois estudos mostraram a ocorrência de Massachusetts e Connecticut, além de algumas variantes locais na Argentina (RIMONDI et al., 2009) e na Colômbia (ALVARADO et al., 2005). A predominância de variantes locais também foi demonstrada no Brasil (FELLIPE et al., 2010; CHACÓN et al., 2011; TORRES et al., 2013; BALESTRIN et al., 2014).

As variantes brasileiras (denominadas genótipos BR) estão presentes em todas as regiões produtoras de aves de capoeira importantes (Centro-Oeste, Nordeste, Sul e Sudeste). Contudo, o genótipo Massachusetts também é encontrado nestas regiões, uma vez que a vacinação para prevenir IB em aves de capoeira industriais e rebanhos é intensa (CHACÓN et al., 2011; TORRES et al., 2013). Outros genótipos europeus e norte-americanos previamente identificados (D274, Arkansas, Conn e 4/91) são raramente encontrados em amostras de campo (FELIPPE et al., 2010; VILARREAL, 2010; FRAGA et al., 2016).

Recentemente dois estudos demonstraram que a grande maioria das cepas vBIG de rebanhos comerciais com sinais clínicos do BI em diferentes estados do Brasil em um período de sete anos (2003 a 2009) foram variantes com alta similaridade no gene da glicoproteína S1, sugerindo a prevalência de um genótipo único chamado Brasil ou BR-I (VILARREAL et al., 2010; CHACON et al., 2011; FRAGA et al., 2013; BALESTRIN et al., 2014).

A maioria das estirpes difere uma da outra por 20 a 25% de aminoácidos S1 e os polipeptídeos S2 diferem em menos de 10%, assim como as proteínas estruturais que diferem entre si em torno de 10 a 15%. Deste modo, as altas taxas de mutações nos aminoácidos

conferem uma vantagem seletiva ao vírus da bronquite, uma vez que mutações de até 3% nos aminoácidos podem diferenciar uma cepa de outra e tornar o animal susceptível a doença mesmo vacinada. Em geral, a imunidade induzida pela inoculação com um sorotipo mal protege contra infecção com sorotipos heterólogos (CAVANAGH, 2005).

## 2.6 Patogenia e Sintomatologia

No hospedeiro, o vírus replica principalmente no trato respiratório superior, precisamente nos epitélios da glândula de Harder, da traqueia, dos pulmões e dos sacos aéreos onde gera uma viremia. O vírus se move então para outros órgãos a fim de estabelecer uma infecção sistêmica (RAJ & JONES, 1997).

O prognóstico e as características clínicas da BIG dependem do órgão ou sistema envolvido, uma vez que o vírus possui tropismo por diferentes tipos de células aviárias (DI FABIO & BUITRAGO, 2009; BALESTRIN et al., 2014).

As aves infectadas geralmente desenvolvem sinais clínicos dentro de 36 a 48 horas (ABRO, 2013). A infecção do sistema respiratório pode resultar em sinais tais como angústia respiratória, espirros, estertores traqueais, apatia e descargas nasais. As aves afetadas podem aparentar-se apáticas com perda de peso e amontoamento de pássaros sob uma fonte de calor comum, nefrite intersticial e redução da produção de ovos também podem ser observados (CAVANAGH, 2005; ABOLNIK, 2015).

Enquanto que, os ovos de aves doentes podem apresentar-se desgastados, com casca áspera levando ao declínio na produção de ovos, fato este que contribui para uma substancial perda econômica (CAVANAGH & GELB, 2008; COOK et al., 2012; BANDE et al., 2016). Outros sintomas podem incluir conjuntivite espumosa, lacrimejamento profuso, edema e celulite dos tecidos periorbitários (COOK et al., 2012).

As cepas nefro patogênicas de vBIG são mais descritas em frangos de corte e seus sinais clínicos incluem depressão, miopatia, perda de peso, excrementos molhados e ingestão excessiva de água. A infecção do trato reprodutivo está associada a lesões do oviduto, levando à diminuição da produção e qualidade do ovo.

Galinhas de todas as idades e tipos de raça são suscetíveis à infecção por vBIG, mas a extensão e a gravidade da doença é evidenciada em aves mais jovens, cerca de 20-30% dos animais acometidos entre cinco a seis semanas de idade vão à óbito (IGNJATOVIC et al., 2002; SEIFI et al., 2010). Da mesma forma, a resistência à infecção aumenta com o aumento da idade.

Após a infecção, o vírus pode ser excretado via muco, secreções conjuntival e, ou, nasal por um período superior a quatro semanas. As fezes também se caracterizam como uma via de disseminação do agente. (KING & CAVANAGH, 1991; DI FÁBIO, 1992) O vBIG foi isolado das fezes de aves até 20 semanas após a infecção (BANDE et al., 2016).

Animais imunossuprimidos ou com coinfeções como *Escherichia coli*, *Ornithobacterium rhinotracheale* e *Bordetella avium* (HOPKINS & YODER, 1984; MATTHIJS et al., 2003; CAVANAGH & GELB, 2008) podem aumentar a taxa de mortalidade em um plantel, entretanto a taxa de mortalidade pode ser variável também dependendo da virulência da estirpe que está ocasionando a infecção no plantel (CAVANAGH & GELB, 2008).

Os achados de necropsia incluem traqueíte, inflamação e hiperplasia dos pulmões, alterações em sacos aéreos. Achados de histopatologia em estudos realizados após infecção experimental por Jungherr e colaboradores demonstraram efeitos primários sobre o epitélio das vias aéreas respiratórias e perda de células epiteliais ciliadas acompanhadas de infiltração de camadas subepiteliais com linfócitos e heterófilos. Nos pulmões e na traqueia foi relatado presença de infiltração difusa (COOK et al., 2012).

## 2.7 Transmissão e Prevenção

A transmissão do vBIG é horizontal, podendo ser do tipo direta através do contato entre aves doentes, principalmente através das secreções respiratórias, e a indireta através de fômites contaminados (CAVANAGH et al., 2002).

A resistência do vírus no ambiente ainda não está totalmente elucidada na literatura, entretanto estudos já isolaram o vírus nas tonsilas cecais com até 14 semanas e nas fezes com 20 semanas. O período de incubação é curto variando com a dose infecciosa e a via de infecção (BANDE et al., 2016).

As aves domésticas (*Gallus gallus*) e faisão (*Phasianus spp.*) são consideradas hospedeiras naturais para o vBIG, porém outros coronavírus foram identificados em uma ampla variedade de hospedeiros aviários, especialmente aquelas criadas perto de aves domesticadas, como perdizes, gansos, pombo, cerceta, pato, peru, pinguins, codornas e papagaio da Amazônia (CAVANAGH, 2005). Estudos demonstram semelhanças antigênicas entre o coronavírus que acomete os perus (TCoV) e o vírus da bronquite infecciosa aviária (vBIG) (GUY, 2000).

Em seres humanos com contato próximo às aves já foi observado a presença de anticorpos para o vBIG, porém ainda não foi relatado manifestações clínicas da doença em humanos, ou seja, o vírus ainda não foi relatado como causador da doença clínica humana (BANDE et al., 2016).

Não existe tratamento para a doença, no entanto, devido a sua alta morbidade e por medidas de biossegurança sozinhas não serem sempre capazes de controlar a doença, a vacinação torna-se a medida de controle da doença de eleição e largamente implementada pelos produtores avícolas (HEWSON et al., 2009).

A prevenção é realizada com o uso de vacinas vivas atenuadas, contudo, esta medida de controle pode não ser eficaz quando no campo as estirpes forem diferentes da vacina (CAVANAGH, 2007), além disso, novas variantes antigênicas emergem devido às novas mutações gênicas (JACKWOOD et al., 2012).

No Brasil a imunização dos rebanhos é realizada utilizando apenas vacinas do sorotipo Massachusetts (RESENDE, 2003; BERNARDINO, 2004) por proporcionar um amplo espectro antigênico, motivo este que justifica a maioria dos programas vacinais incluir esse sorotipo como base principal (VILLEGAS, 1997), no entanto, há evidências de que a vacinação com o sorotipo Massachusetts fornece proteção inadequada contra as cepas variantes que circulam na região (FRAGA et al., 2013).

Entretanto, apesar da vacinação cuidadosa, existem situações em que as vacinas licenciadas existentes não proporcionam proteção adequada contra desafios de novos sorotipos (COOK, 1997; PENA et al., 2005).

Estudos realizados por Villegas (1997), afirmam que o uso de outros sorotipos associados ao Massachusetts, como o Connecticut, amplia o espectro antigênico, resultando no desenvolvimento de anticorpos contra outros sorotipos de vBIG.

Assim, as vacinas atenuadas de sorotipos variantes somente devem ser utilizadas em áreas onde este tipo de vírus for responsável por grandes perdas econômicas e, após a sua completa caracterização, pois há o risco de se introduzir um novo sorotipo na região, bem como a ocorrência de recombinação genética entre os diferentes sorotipos, gerando uma nova variante, que pode ter consequências desastrosas para a avicultura (ROCHA, 2000; RESENDE, 2003; DI FÁBIO, 2004; CALLISON et al., 2006; PENA et al., 2005).

Ademais, apesar dos programas de vacinação, os surtos da doença continuam ocorrendo em plantéis vacinados em vários países, inclusive no Brasil, devido a vários fatores que podem estar diretamente relacionados à vacina: como hipervariabilidade viral, alta ou

baixa atenuação do vírus vacinal; ou ainda relacionados ao hospedeiro, como processos imunossupressores (PENA et al., 2005).

## 2.8 Diagnóstico

Vários métodos de diagnóstico são utilizados para detecção do vBIG. O padrão ouro de diagnóstico da doença inclui isolamento e identificação do vírus em ovos “specific pathogen free” (SPF) embrionados e posterior identificação por neutralização sérica. Porém, a técnica de cultivo do vírus, além disso, são necessários cuidados especiais para o transporte das amostras em swab, a fim de evitar a degradação do material coletado (DE WIT, 2000; CAVANAGH & GELB, 2008).

Os swabs das amostras podem ser coletados de diversos tecidos como traqueia, rim, pro ventrículo, amígdala e oviduto e devem ser colhidas assepticamente a partir de frangos imediatamente após o abate (GELB et al., 1998). Inocula-se macerado de órgãos em cavidade alantoide de ovos SPF, com idade entre nove e 11 dias de incubação e posteriormente procuram-se alterações morfológicas, como nanismo, enrolamento, depósito de urato nos mesonefros e mortalidade embrionária (DI FABIO & ROSSINI, 2000; MENDONÇA, 2009).

A cultura de anéis traqueais é o método que mais mimetiza as condições *in vivo*, é preparada a partir de anéis traqueais de embriões de galinha de 20 dias de idade e pode ser usada para propagar tanto as estirpes de vBIG adaptadas a embriões como não adaptadas a embriões. Assim, esta cultura é observada microscopicamente para evidência do comprometimento da atividade ciliar, um completo comprometimento normalmente é indicativo de uma cultura positiva (JONES & HENNION, 2008).

No entanto, a suscetibilidade desses órgãos ao vBIG pode ser influenciada pela presença de vírus na amostra. Mas este método apresenta como vantagem a fácil titulação e sorotipagem do vBIG, uma vez que não é necessária adaptação do vírus (ARMESTO et al., 2011; BANDE et al., 2016).

Métodos sorológicos também são utilizados para a detecção e sorotipagem das cepas vírus. Esta técnica tem se mostrado mais sensível e de fácil execução até mesmo para uso em campo. O método também permite o monitoramento da resposta de anticorpos após a vacinação ou exposição, entretanto com a alta taxa de mutação e variabilidade do vírus tornam testes sorológicos menos eficientes quando se refere a novos sorotipos, diminuindo dessa forma a eficácia da técnica. (CAVANAGH, 2005; BANDE et al., 2016).

A microscopia eletrônica fornece um meio direto de detectar o vírus através da identificação morfológica direta. Culturas positivas possuem estruturas pleomórfico tipo coronavírus com projeções de espículas. A microscopia eletrônica de transmissão (MET) também é uma ferramenta útil que permite a visualização de partículas semelhantes a vírus em células infectadas (BANDE et al., 2016).

A imunoperoxidase e a imunofluorescência são dois importantes métodos de histoquímica para a detecção e confirmação do antígeno de vBIG a partir de tecidos infectados. Esses métodos funcionam com base nas reações antígeno-anticorpo. Métodos de imunoperoxidase têm sido utilizados com sucesso para localizar o antígeno de vBIG em amostras de tecido. Do mesmo modo, o ensaio de imunofluorescência indireta é a técnica fluorescente mais utilizada (ABDEL-MONEIM et al., 2009).

Com o avanço dos diagnósticos moleculares, o método de detecção que vem demonstrando maior eficiência atualmente, envolve o sequenciamento do gene S1, porém, não é um método de detecção rápido, tornando-se ineficiente quando se refere a surtos da doença, principalmente devido ao curso da infecção ser relativamente rápido cerca de 8 a 10 dias, enquanto a realização deste método dura em torno de semanas (HEWSON et al., 2009).

Outros métodos moleculares, como Reação em Cadeia de Polimerase Transcriptase Reversa (RT-PCR), PCR em Tempo Real, Polimorfismo de Comprimento de Fragmento de Restrição (RFLP) e sequenciamento do genoma, têm quase substituído à sorologia convencional (ADHZAR et al., 1997). Pois, são métodos rápidos e altamente sensíveis para detecção em amostras clínicas (KWON et al., 1993; CALLISON et al., 2006).

Além disso, ensaios moleculares foram desenvolvidos para detectar cepas de IBV. Alguns destes ensaios incluem uma detecção genérica por RT-PCR e caracterização subsequente por outros ensaios tais como o polimorfismo de comprimento de fragmento de restrição (RFLP) e sequenciamento (LIN et al., 1991; KWON et al., 1993; FRAGA et al., 2016).

As técnicas moleculares, tais como RT PCR, não requerem isolamento prévio e, portanto, têm sido amplamente utilizados detecção e genotipagem do vírus (CAVANAGH & GELB, 2008).

Os principais tecidos utilizados para análises moleculares são traqueia, considerado o primeiro local de replicação no início da infecção, as amígdalas e cloaca. (CAVANAGH & GELB, 2008; BALESTRIN et al., 2014).

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Local de Coleta, Amostragem e Coleta das Amostras

As análises moleculares foram realizadas nas instalações do Laboratório de Sanidade Avícola localizado no Instituto de Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio Janeiro.

Com o objetivo de coletar amostras de tecidos para diagnóstico laboratorial realizou-se a visita em quatro granjas de frangos com suspeita de Bronquite Infecciosa das Galinhas (BIG), nas quais três se localizam na Mesorregião Sul Fluminense do Rio de Janeiro, nos distritos de Lídice, Vargem Alegre e Passa Três, cuja finalidade é produção de frangos de corte no sistema intensivo. Já, a quarta granja selecionada para a realização das coletas localiza-se na Mesorregião Norte Fluminense, em Macaé, de criação de poedeiras de forma semi-extensiva.



**Figura 3.** Figuras A e B das granjas de frango de corte (granja Vargem Alegre) em sistema de criação intensivo, e Figuras C e D correspondem a granja de galinhas de postura (Macaé) em sistema de criação semi-extensiva, ambas localizadas no estado do Rio de Janeiro, nas mesorregiões Sul e Norte Fluminense, respectivamente.

Nas granjas de Lídice e Passa Três foram selecionadas ao acaso 10 aves com idade aproximada de cinco semanas, e na granja de Vargem Alegre foram selecionadas 17 aves com idade semelhante a das aves das granjas de Lídice e Passa Três. Na granja de poedeiras (Macaé) foram amostradas aleatoriamente 13 aves com idade superior a 16 semanas (Tabela 1).

**Tabela 1.** Relação de granjas de frangos de corte e de postura localizadas nas mesorregiões Sul e Norte fluminense do estado do Rio de Janeiro. Na tabela está detalhado o número de aves coletadas por granja, o tipo de criação e a idade das aves no momento da coleta.

<b>Granja</b>	<b>Nº de aves</b>	<b>Tipo de Criação</b>	<b>Idade</b>
Lídice	10	Corte/intensiva	4-5 semanas
Vargem Alegre	17	Corte/Intensiva	4-5 semanas
Passa Três	10	Corte/Intensiva	4-5 semanas
Macaé	13	Poedeira/semi-extensiva	> 16 semanas

Essas aves foram doadas com a autorização do responsável técnico pelas granjas e um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido foi assinado durante a coleta.

As aves foram submetidas à eutanásia, através da administração do barbitúrico Tiopental na dosagem de 80 mg kg<sup>-1</sup> através de acesso venoso a partir da veia braquial (Asa), conforme as diretrizes prevista pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) para eutanásia de animais com a finalidade de pesquisa.

Após a realização da eutanásia foi realizada a necropsia, onde foram coletadas amostras de traqueia, rins e intestino (tonsila cecal) destas aves. As amostras foram dispostas individualmente em micro tubos de polipropileno de 2 ml, contendo 1 mL de solução estabilizadora de ácidos nucleicos (RNA Later<sup>®</sup>, ThermoFisher Scientific). Os micro tubos foram armazenados a -80°C até o momento de extração do RNA total das amostras.

### **3.2 Extração do RNA Total do Tecido de Traquéia, Rim e Intestino de Frangos de Corte e Galinhas de Postura pelo Método de Trizol**

As amostras foram retiradas do freezer à temperatura de -80°C e descongeladas vagarosamente sob refrigeração. Um fragmento de 30 gramas de cada órgão (traqueia, rim e intestino) foi pesado em balança analítica de precisão. Esse fragmento de amostra foi lavado com água DEPC por duas vezes e, posteriormente, foram submetidas ao congelamento com nitrogênio líquido e maceradas em gral e pistilo.

Ao tecido macerado foi adicionado 1ml do reagente Trizol (Trizol<sup>®</sup> Reagent, ThermoFisher Scientific, Carlsbad, CA), que foi o reagente selecionado para extração do RNA total. Em seguida, o conteúdo foi transferido para um microtubo de polipropileno de 1,5 mL, que foi mantido em gelo durante sete minutos.

Depois se acrescentou 200 µL de clorofórmio e o tubo foi agitado por 15 segundos em vórtex. As amostras foram incubadas por 3 minutos em gelo, e logo após foram centrifugadas a 12000 g por 15 minutos a 4 °C. Sucessivamente retirou-se cerca de 450 µL da fase aquosa da amostra e a transferiu para um microtubo de 1,5 µL, onde foram acrescentados 500 µL de Isopropanol 100% gelado. As amostras foram então agitadas por inversão, incubadas por 10 minutos em gelo e centrifugadas a 12000 g por 10 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi retirado por inversão e descartado. No tubo foi acrescentado de 950 µL de etanol 75% (diluído em água DEPC) gelado e agitado em vórtex. 15 segundos. As amostras foram centrifugadas a 7400 x g por 5 minutos a 4 °C. E, novamente o sobrenadante foi retirado de cada tubo com auxílio da pipeta. Os tubos foram invertidos e mantidos em temperatura ambiente por aproximadamente 45 minutos para evaporação total do etanol.

O RNA foi eluído em 100  $\mu\text{L}$  de água ultrapura para PCR tratada com DEPC. A concentração e a pureza de RNA total das amostras foram mensuradas por espectrofotometria no equipamento Nanodrop 2000<sup>®</sup> (ThermoFisher Scientific, Carlsbad, CA). As amostras foram alíquotadas em triplicadas em concentrações de 100  $\text{ng } \mu\text{L}^{-1}$  e armazenadas a  $-80^{\circ}\text{C}$  até o momento das análises moleculares por qPCR e RT-PCR.

### **3.3 Extração do RNA Total dos Controles Positivos**

#### **3.3.1 Extração do RNA total do vírus vivo atenuado da BIG a partir da vacina NOBILIS**

Foi pesado 50 mg da vacina de vírus vivo atenuado contendo a cepa purificada Ma5 (sorotipo Massachusetts) liofilizada na concentração de  $3.0 \log^{10} \text{EID}_{50}$  (NOBILIS<sup>®</sup> IB Ma5). Para a extração do RNA total foi utilizado o kit da RNeasy<sup>®</sup> mini kit (Qiagen), de acordo com as instruções do fabricante (Anexo A).

As concentrações de RNA total das amostras foram mensuradas por espectrofotometria no equipamento NANODROP<sup>®</sup> 2000 (ThermoFisher Scientific) e foram alíquotadas em triplicada na concentração de 100  $\text{ng } \mu\text{L}^{-1}$  e armazenadas em freezer na temperatura de  $-80^{\circ}\text{C}$ .

#### **3.3.2 Extração do RNA total da cepa BR1 do vírus da BIG a partir de uma amostra conservada em cartão FTA**

A cepa BR1 utilizada neste trabalho como controle positivo das reações de RT-PCR foi cedida gentilmente pelo Professor Dr. José Piantino, da Universidade do Estado de São Paulo. Um fragmento com cerca de 1/6 do disco contendo a cepa BR-1 foi cortado e utilizado no procedimento de extração. Este fragmento foi picotado em pequenos pedaços de 2mm e o RNA foi extraído utilizando o kit RNeasy<sup>®</sup> mini kit (Qiagen), conforme as instruções do fabricante (Anexo A).

As concentrações foram mensuradas por espectrofotometria utilizando o equipamento NANODROP 2000<sup>®</sup> (ThermoFisher Scientific). As amostras de RNA total foram alíquotadas em triplicata na concentração de 100  $\text{ng } \mu\text{L}^{-1}$  e armazenadas em freezer na temperatura de  $-80^{\circ}\text{C}$ .

### **3.4 Reação de TRANSCRIÇÃO REVERSA para SÍNTESE de cDNA a partir do RNA Total Extraído do Tecido de Traquéia, Rim e Intestino**

As amostras de RNA total extraídas dos tecidos das aves, bem como as amostras de RNA total obtidas a partir da cepa vacinal Ma5 e da cepa BR1 foram submetidos a uma reação de transcrição reversa utilizando o Kit High Capacity cDNA Reverse Transcription<sup>®</sup> (APPLIED BIOSYSTEMS), conforme as instruções do fabricante.

O RT Master Mix foi preparado em fluxo laminar, com volume final da reação de 20  $\mu\text{L}$ . A reação foi preparada utilizando 2  $\mu\text{L}$  do RT Buffer, 0,8  $\mu\text{L}$  de dNTP mix (100mM), 2  $\mu\text{L}$  RT Randon Iniciadores, 1  $\mu\text{L}$  da enzima MultiScribe Reverse Transcriptase, 3,2  $\mu\text{L}$  de água livre de nucleasse e 10  $\mu\text{L}$  de RNA total na concentração de 100  $\text{ng } \mu\text{L}^{-1}$ .

Após o preparo do mix a reação de transcrição reversa foi realizada em termociclador (Eppendorf<sup>®</sup>) sob as seguintes condições: etapa 1)  $25^{\circ}\text{C}$  por 10 minutos; etapa 2)  $37^{\circ}\text{C}$  por 120 minutos; etapa 3)  $85^{\circ}\text{C}$  por 5 minutos. Após o término das reações as amostras foram acondicionadas em freezer a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

### **3.5 Reação de RT-qPCR para Detecção Molecular do vBIG a partir do Tecido de Traqueia, Rim e Intestino de Frangos de Corte e Galinhas de Postura**

Todas as amostras foram submetidas à técnica de RT-qPCR seguindo as recomendações de Callison. Os iniciadores utilizados foram IBVS'GU391 – (5'-GCTTTTGAGCCTAGCGTT – 3') e IBVS'GL533 – (5'GCCATGTTGTCAGTGTCTATTG – 3'). O ensaio amplifica um produto de 143 pb da região 5'-UTR do genoma do vírus da BIG.

As reações foram realizadas em volume final de 20 µL, onde foram utilizados 1x de HOT FIREPol EvaGreen® qPCR Mix 5x, 0,5 µM de oligonucleotídeos iniciadores senso e anti-senso, 12 µL de água para PCR e 3µL de cDNA da amostra.

As condições de termociclagem foram as seguintes: 50°C por 2 minutos, 95°C por 10 minutos, 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por um minuto. Foi adicionada uma curva de melting gerada a partir de um ciclo de 95°C por 15 segundos, 60°C por um minuto e, gradativamente, sucessivas leituras a cada incremento 0,3°C até atingir a temperatura de 95°C.

Um total de 50 aves foram testadas visando verificar a presença do RNA viral nos tecidos do rim, traqueia e intestino (tonsila cecal), com exceção das amostras da granja de Lídice, onde foram testadas apenas amostras de rim e de traqueia. No total foram testadas 117 amostras.

As amostras que apresentaram temperatura de dissociação igual a dos controles positivos e com Cq inferior a 35 ciclos foram consideradas positivas. Um total de 25 aves consideradas positivas em pelo menos um dos sistemas fisiológicos foram selecionadas para a realização da técnica de RFLP RT-PCR.

### **3.6 Análise *in silico* da Digestão por Endonucleases de Restrição para Identificação Diferencial das Cepas do vBIG Pertencentes ao Sorotipo Massachusetts e BR1**

#### **3.6.1 Prospecção dos oligonucleotídeos iniciadores e seleção das endonucleases de restrição**

As sequências completas ou parciais de nucleotídeos que codificam para a porção S1 da proteína da espícula do vírus da BIG dos sorotipos Massachusetts e BR foram baixadas em formato fasta do banco de dados GenBank<sup>1</sup>.

As sequências foram então alinhadas utilizando o algoritmo Clustal W disponível no software CLC Main Workbench v.7.2 (Qiagen Corporation) com a finalidade de identificar regiões consenso onde os oligos iniciadores pudessem ser prospectados e capazes de amplificar tanto as variantes virais do sorotipo Massachusetts quanto do sorotipo BR. A especificidade das sequências de oligonucleotídeos iniciadores foi avaliada *in silico* no banco de dados do Genbank usando a análise do algoritmo Primer-Blast<sup>2</sup>. Os oligonucleotídeos iniciadores foram sintetizados pela Invitrogen LTDA.

O alinhamento foi utilizado juntamente com os iniciadores prospectados para gerar “amplicons” virtuais utilizando o programa CLC Main Workbench® v.7.2 (Qiagen, Corporation). Os produtos de amplificação resultantes foram então submetidos a uma análise *in silico* do perfil de digestão com uma série de endonucleases de restrição, através do Programa CLC Main Workbench® v.7.2 (Qiagen, Corporation). As endonucleases de restrição que geraram perfis de restrição distintos em relação às variantes virais do sorotipo Massachusetts e BR foram selecionadas para a análise *in vitro*. A tabela com as Sequências utilizadas podem ser observadas abaixo (Tabela 2).

<sup>1</sup> Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/> >

<sup>2</sup> Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/> >

**Tabela 2.** Sequências utilizadas para a prospecção dos oligonucleotídeos iniciadores.

<b>Sequência</b>	<b>Sorotipo</b>
GU383070	BR
GU383071	BR
GU383072	BR
GU383073	BR
GU383074	BR
GU383075	BR
GU383076	BR
GU383077	BR
GU383078	BR
GU383079	BR
GU383080	BR
GU383081	BR
GU383082	BR
GU383083	BR
GU383084	BR
GU383085	BR
GU383086	BR
GU383087	BR
JX559784	BR
JX559786	BR
JX559787	BR
JX559788	BR
JX559789	BR
JX559791	BR
JX559792	BR
JX559830	BR
JX559785	Massachussets
JX559790	Massachussets
JX559798	Massachussets
JX559799	Massachussets
JX559815	Massachussets
JX559824	Massachussets
JX559825	Massachussets
JX559826	Massachussets
JX559827	Massachussets
JX559828	Massachussets
JX559829	Massachussets
FJ888351.1 cepa H120, vacina	Massachussets
KU736747.1 cepa Ma5, vacina	Massachussets

### 3.6.2 Padronização da concentração ótima dos oligonucleotídeos iniciadores

A concentração ótima dos oligonucleotídeos iniciadores foi padronizada a partir das concentrações 0,2  $\mu\text{M}$ , 0,4  $\mu\text{M}$ , 0,6  $\mu\text{M}$  e 0,8  $\mu\text{M}$  de cada primer senso e anti-senso em 16 combinações diferentes entre si. Todas as amostras foram testadas em triplicada.

### 3.7 Reação de RT- PCR para Detecção Molecular dos Vírus da BIG dos Sorotipos Massachusetts e BR

Para a realização do RT-PCR foram utilizados a sequência senso do oligonucleotídeo iniciadores IBV-F (5'-TGACTCTTTTGTGTGCACTATG-3') e anti-senso IBV-R (5'-CGGTGCYGTACATAGCTA-3'), desenhados para amplificar um fragmento de 242pb do gene S1 do vBIG. A reação foi realizada em volume final de 25 $\mu\text{L}$ , contendo: 3 mM de  $\text{MgCl}_2$ , 1x do tampão de PCR, 0,4 mM de dNTP Mix, 0,6  $\mu\text{M}$  de cada oligonucleotídeo iniciador, 1 U de Taq Platinum DNA Polimerase, 3 $\mu\text{L}$  de cDNA.

A reação gerou um fragmento de 236 pares de base do gene S1 do vBIG. A amplificação ocorreu no equipamento Veriti<sup>®</sup> (Life Technologies, ThermoFisher Scientific) com as seguintes condições de termociclagem: desnaturação inicial a 95°C/5 minutos, seguidos de 40 ciclos a 95 °C/30 segundos, 60 °C/30 segundos e 72°C/30 segundos e um passo de extensão final a 72 °C/2 minutos.

Ao final da reação os produtos amplificados foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 2% a uma tensão elétrica constante de 5 V  $\text{cm}^{-1}$  durante 90 minutos. Em seguida, os géis foram corados em brometo de etídeo na concentração de 5 mg  $\text{L}^{-1}$ . O perfil eletroforético foi visualizado sob luz ultravioleta e fotografado em sistema de foto documentação E-gel Image (Life Technologies, ThermoFisher Scientific).

### 3.8 PCR- Polimorfismo do Comprimento de Fragmento de Restrição/ “Restriction Fragment Length Polymorphism” – (RT-PCR RFLP)

As sequências anteriormente citadas para o desenho dos iniciadores foram analisadas no programa CLC Main Workbench (Quiagen, Valencia, CA) e duas endonucleases de restrição foram selecionadas para a diferenciação das variantes virais brasileiras, sendo estas SspI (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA) que gera um padrão de restrição de 124pb e 112pb clivando o genótipo massachusetts e PvuII (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA) que gera um padrão de restrição de 173pb e 63pb clivando o genótipo BR-I. As reações de digestão pelas endonucleases de restrição foram realizadas seguindo os protocolos recomendados pelos fornecedores das enzimas utilizando como controle as amostras do sorotipo massachusetts e BR. As reações foram executadas em volume final de 12  $\mu\text{L}$ , que continham 5  $\mu\text{L}$  do produto de amplificação (aproximadamente 1  $\mu\text{g}$  - calculado por espectrofotometria utilizando no aparelho NanoDrop 2000), 0,5  $\mu\text{L}$  (10unidades/  $\mu\text{L}$ ) da enzima, 1,2  $\mu\text{L}$  de tampão de reação apropriado, e 5,3  $\mu\text{L}$  de água. Em seguida as amostras foram incubadas a 37°C durante 2 horas e imediatamente a 65°C durante 20 minutos. As amostras foram submetidas à eletroforese em géis de agarose (3,0%), a uma tensão elétrica constante de 5V/cm durante 90 minutos, e em seguida os géis foram corados em brometo de etídeo na concentração de 0,5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .

Os padrões de bandas foram analisados através de comparação entre as amostras e com um marcador de peso molecular de DNA (GeneRuler 1kb plus DNA Ladder, Thermo Scientific), junto com os controles positivos. As imagens resultantes foram analisadas utilizando o software Gel Capture (Life Technologies, ThermoFisher Scientific), para determinar com precisão os tamanhos dos fragmentos de restrição individuais.

### 3.9 Seleção dos Tampões para Reação de Digestão Enzimática

Tendo em vista a otimização do tempo e dos resultados da digestão enzimática, foi realizado um teste para identificar qual melhor tampão para a utilização de ambas as enzimas numa mesma reação. Os produtos de amplificação da PCR convencional dos controles positivos da cepa BR-I e da Cepa vacinal Massachusetts foram submetidos à digestão pelas endonucleases de restrição utilizando cinco condições variando o tampão da reação, porém utilizando as mesmas condições de reação já descritas no item anterior.

A primeira reação continha 1  $\mu$ L da enzima SspI e foi realizada utilizando o tampão fornecido com a enzima (Tampão G - 10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 mM NaCl). A segunda reação foi realizada com 1  $\mu$ L da enzima PvuII utilizando o tampão fornecido com enzima (Tampão G- 10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 mM NaCl). A terceira reação tinha como objetivo observar se a enzima PvuII era capaz de digerir o produto gerado pela PCR, utilizando o tampão da Platinum Taq DNA Polimerase (Tris-HCl 200 mM, pH 8,4, KCl 500 mM) como o tampão da reação. A quarta reação foi realizada visando observar se a enzima SspI era capaz de digerir o produto gerado pela PCR convencional utilizando o tampão da Platinum Taq DNA Polimerase (Tris-HCl 200 mM, pH 8,4, KCl 500 mM) como o tampão da reação. Assim, com o intuito de dar maior agilidade e rapidez a reação a quinta e última reação foi realizada utilizando 1  $\mu$ L das duas enzimas ao mesmo tempo na presença do tampão da enzima Platinum Taq DNA Polimerase (Tris-HCl 200 mM, pH 8,4, KCl 500 mM).

### 3.10 Nested PCR e Sequenciamento para Confirmação da Genotipagem do vBIG Gerado pela Técnica da RT-PCR RFLP

Uma nova reação de RT-nPCR foi realizada a partir de sete amostras previamente genotipadas pela técnica de RT-PCR RFLP desenvolvida neste trabalho. A RT-nPCR foi realizada de acordo com o protocolo proposto por Fraga et al. (2014), ou seja, baseado na detecção de um fragmento de aproximadamente 600pb do gene S1 do vBIG.

A primeira reação foi realizada em um volume final de 25  $\mu$ L, contendo: 1x do tampão da Platinum Taq DNA Polymerase (Tris-HCl 200 mM, pH 8,4, KCl 500 mM), 3 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,4 mM de dNTP mix, 0,4  $\mu$ M de cada oligo nucleotídeo iniciador, gerando um fragmento de 580 pares de base, 1 U da Platinum Taq DNA Polimerase, 3 $\mu$ L de cDNA.

A reação foi executada em um termociclador Eppendorf® utilizando as seguintes condições de termociclagem: desnaturação inicial de 95 °C/2 minutos, seguidos de 35 ciclos a 95 °C/ 40 segundos, 50 °C/40 segundos e 72 °C/60 segundos e um passo de extensão final de 72°C/ 5 minutos.

O “amplicon” gerado pela primeira reação foi submetido como molde a uma segunda reação, conforme descrito por Fraga et al. (2014). As reações foram realizadas em um volume final de 25  $\mu$ L, contendo: 2  $\mu$ L do produto da primeira reação, 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,4nM de cada primer IBVS1-1F (5'-TTR TTR RTWAGA GAT GTT GG-3') e IBVS1-3R (59-GCT TTR AAR TRA ACA CCT GC-3'), 0,4 mM de dNTP mix, 1x do tampão da enzima Platinum Taq DNA Polimerase, 1 U da Platinum Taq DNA polimerase.

As reações ocorreram com as seguintes condições de termociclagem : desnaturação inicial de 95 °C/3 minutos, seguidos de 35 ciclos a 95 °C/ 20 segundos, 55 °C/40 segundos e 72 °C/60 segundos e um passo de extensão final de 72°C/ 5 minutos.

Os produtos finais gerados por essa segunda reação foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1,5%. A corrida eletroforética foi realizada durante 60 minutos numa voltagem de 75 volts (5 V cm<sup>-1</sup>). Posteriormente, o gel foi corado com brometo de etídio (0,4

$\mu\text{g mL}^{-1}$ ) e visualizado sob luz ultravioleta no foto documentador sistema E-Gel® ImagerCamera (Life Technology – ThermoFisherScientific)

As amostras que apresentaram bandas de forte intensidade no gel compatível com o controle positivo foram selecionadas e purificadas. As amostras que apresentaram banda dupla foram cortadas de um gel de 1% e purificadas logo em seguida, e as amostras com banda única foram purificadas diretamente do produto amplificado. A purificação foi realizada através do kit Wizard® SV Gel e PCR Clean-Up System (Promega), seguindo os procedimentos descritos pelo fabricante (Anexo B).

Os produtos de PCR foram sequenciados em ambas as direções utilizando os mesmos iniciadores da segunda reação do RT-nPCR. O sequenciamento foi realizado no Centro de Estudos do Genoma Humano da Universidade de São Paulo (USP), utilizando o equipamento ABI 3730 DNA Analyser (Applied Biosystems/Perkin Elmer, CA, USA).

### 3.11 Análise Filogenética do vBIG a partir da Sequência Parcial do Gene S1

A qualidade dos eletroferogramas das amostras sequenciadas foi analisada no software CLC Main Workbench Version 7.2 (Qiagen: CLC bio). As sequências consensu “contigs” foram montadas no mesmo programa e a similaridade de cada sequência foi obtida através de uma busca inicial por meio da ferramenta BLAST<sup>3</sup>.

Para validar o resultado obtido pelo RT-PCR RFLP, uma análise de agrupamento filogenético foi realizado a partir de um fragmento do gene S1 do vBIG. Um alinhamento entre as sequências obtidas foi realizado localmente utilizando o algoritmo Clustal W disponível no software CLC Main Workbench Version 7.2 (Qiagen: CLC bio) tomando como referência a cepa vacinal Ma5, disponível no Genbank sob número de acesso KU736747 (PEREIRA et al., 2016).

Um banco de dados do gene S1 foi montado a partir das 7 sequências obtidas neste estudo e 53 sequências obtidas de isolados brasileiros e outras sequências de referência de diversos sorotipos do vBIG todas disponíveis no Genbank (Tabela 3). O banco de dados final totalizou 60 sequências. As 60 sequências foram alinhadas utilizando o algoritmo Clustal W obedecendo à configuração padrão do software Mega 7.0 (THOMPSON et al., 1994).

Os agrupamentos genéticos foram formados através do método de Maximum Likelihood implementado no software Mega 7.0. Para analisar a confiança dos agrupamentos formados foi utilizado o teste de Bootstrap com 1000 réplicas. O modelo de substituição de nucleotídeos utilizado foi Kimura-2-parâmetros. Todas as análises de agrupamento foram realizadas no software Mega 7.0.

**Tabela 3.** Banco de dados do gene s1 do vírus da bronquite infecciosa das galinhas contendo as cepas brasileiras utilizadas para a análise filogenética das amostras sequenciadas. Nesta tabela podem ser visualizados, o nome da cepa, o ano que foi isolada, o sorotipo e o número de acesso no Genbank.

Nome da cepa	Tecido isolado	Ano que foi isolado	Sorotipo	Acesso Genbank
4/91 attenuated			793/B	AF093793.1
4/91 pathogenic			793/B	AF093794.1
AR03BA06		2003	BR	FJ167386.1
AR06BA13		2006	BR	FJ167376.1
AR06BA14		2006	BR	FJ167375.1
Ark/15C/96			ARK	AF169859.1
SB-A2398	caecal tonsil	2010	BR2	JX559817.1
SB-A2401	caecal tonsil	2010		JX559819.1
Ark99				L10384.1

<sup>3</sup> Disponível em: < <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> >

A2			AY043312.1
Beandette		Massachusetts	X02342.1
Connecticut		Massachusetts	L18990.1
D1466	1989		M21971.1
D274			X15832.1
DE/072/92			U77298.1
JX/99/01			AF210735.1
Egypt/F/03		Massachusetts	DQ487085.1
Florida 18288		Massachusetts	AF027512.1
FR/L-1450L/05	2005	QX IBV	EF079117.1
GA/2787/98			AF274438.1
GRAY			L14069.1
h120			M21883.1
H52		Massachusetts	AF352315.1
Holte			L18988.1
ISRAEL/720/99			AY091552.2
ITALY-02			AJ457137.1
JMK			L14070.1
K43			AF151958.1
K507-01			AY257064.1
K774-01			AY257065.1
M41			X04722.1
N1/62			U29522.1
QU16			AF349620.1
Qu_mv			AF349621.1
QXIBV			af193423.1
RF/01/99			AJ440783.1
SPAIN/99/316			DQ064809.1
AY775779.1		Rim	AY775779.1
UK/7/91		Nephropathogenic 793/B	Z83975.1
IBV/BRASIL/2005/USP-01	2005	BR1	DQ335995.1
IBV/BRASIL/2004/USP-02	2005	BR1	DQ448273.1
IBV/BRASIL/2005/USP-03	2005	BR1	DQ448277.1
IBV/BRASIL/2005/USP-04	2005	BR1	DQ492307.1
IBV/BRASIL/2005/USP-05	2005	BR1	DQ492308.1
IBV/BRASIL/2005/USP-06	2005	BR1	DQ492309.1
IBV/BRASIL/2004/USP-07	2004	BR1	DQ448274.1
IBV/BRASIL/2005/USP-08	2005	BR1	DQ492310.1
IBV/BRASIL/2005/USP-09	2005	BR1	DQ3492311.1
IBV/BRASIL/2005/USP-10	2005	BR1	DQ448275.1
IBV/BRASIL/2005/USP-11	2005	BR1	DQ492312.1
IBV/BRASIL/2005/USP-12	2005	BR1	DQ448276.1
Vic S			U29519.1

### 3.12 Análises Estatística

No sentido de analisar a capacidade de detecção molecular do vBIG pelas técnicas de RT-qPCR e RT-PCR nos tecidos da Traquéia, Rim e Intestino de frangos de corte e galinha de postura o teste de Qui-Quadrado foi utilizado admitindo um nível de significância de 5%. A análise estatística foi realizada através do software de análises estatísticas Biostat 5.3(SANTOS et al., 2007).

## 4 RESULTADO E DISCUSSÃO

### 4.1 Extração e Quantificação de RNA Total

As amostras extraídas de cada órgão foram quantificadas por espectrofotometria no equipamento Nanodrop® 2000 (Anexo C) (ThermoFisher Scientific), obtendo uma média de  $314,40 \pm 162,25 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$  de RNA total extraídos a partir do tecido renal. Para avaliar com precisão a qualidade pureza das amostras extraídas a relação 260/280 nm e 260/230 nm foram avaliadas.

As amostras com pureza satisfatória são aquelas na qual o valor da relação fica em torno de 1,8. Assim, relações de pureza significativamente diferentes podem indicar a presença de proteínas, fenol ou outros contaminantes que absorvem fortemente em ou perto de 280 nm (DESJARDINS & CONKLIN, 2010).

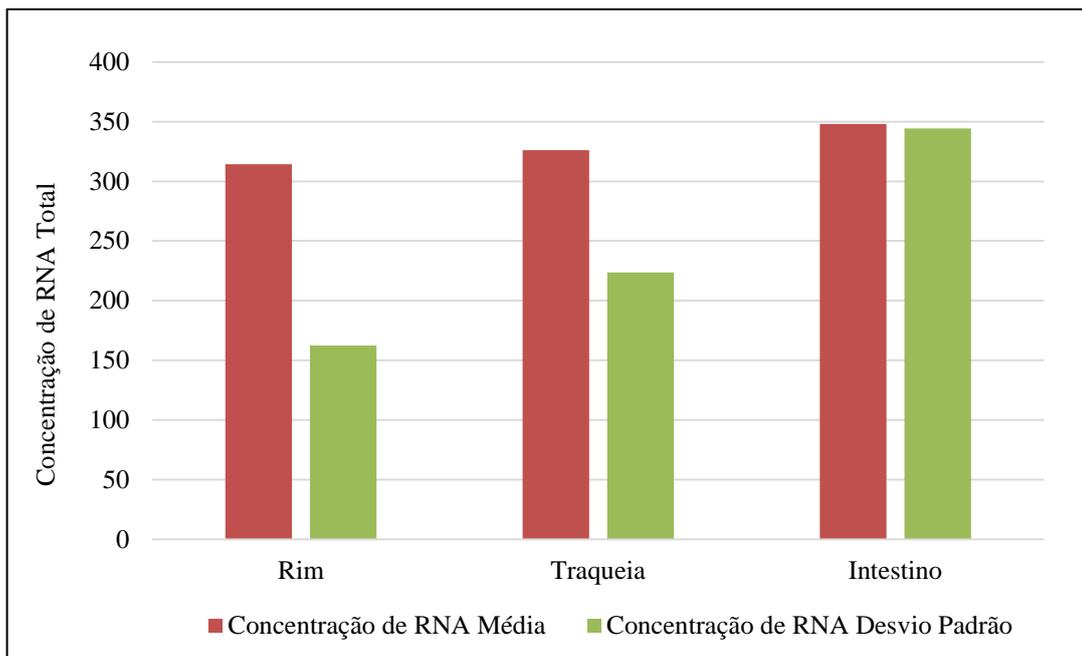
Na relação 260/280 nm as amostras de RNA total extraídas do tecido renal apresentou um valor médio de  $1,9 \pm 0,6 \text{ nm}$ . Dessa forma, pode-se afirmar que o protocolo utilizado para a extração de RNA total de tecido renal de *Gallus gallus* foi eficiente na remoção de compostos de natureza proteica.

O grau de pureza de 260/230 é uma segunda medida de pureza do RNA com os valores de um ácido nucléico "puro" em geral na faixa de 1,8-2,2. No que se refere a essa relação observou-se nas amostras extraídas de tecido renal um valor médio de  $1,15 \pm 0,44 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$ . Com isso, as relações de pureza que são significativamente inferiores aos valores esperados podem indicar que a técnica de isolamento de RNA total utilizada pode exigir maior otimização.

As amostras de RNA total extraídas da traqueia obtiveram uma média de  $326,12 \pm 223,59 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$ . A determinação do grau de pureza 260/280 e 260/230 obtiveram uma média de  $1,94 \pm 0,03 \text{ nm}$  e  $0,93 \pm 0,34 \text{ nm}$ , respectivamente.

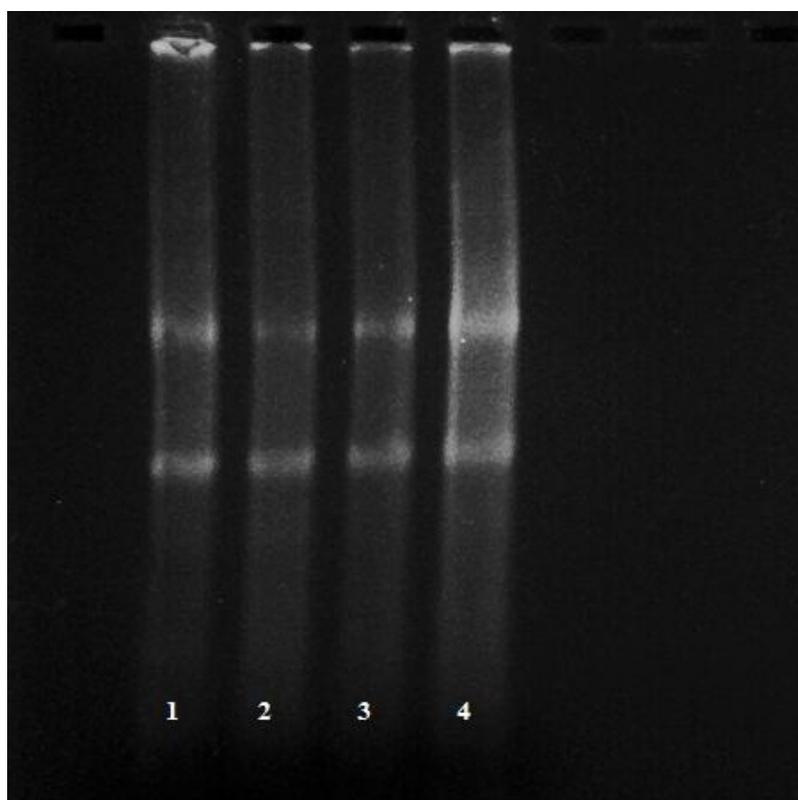
Já, as amostras de RNA total extraída do intestino, obtiveram uma média de  $347,97 \pm 344,22 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$ . A determinação do grau de pureza avaliado pelas relações 260/280 e 260/230 apresentaram valores médios de  $1,96 \pm 0,06 \text{ nm}$  e  $0,94 \pm 0,48 \text{ nm}$ , respectivamente.

Nessa conjuntura, um gráfico comparativo (Figura 4) foi criado para facilitar a visualização das médias obtidas e o respectivo desvio padrão de cada grupo de órgãos. A tabela contendo todas as leituras das amostras pode ser encontrada no Anexo B. Em todos os tecidos avaliados a relação 260/230 nm foi inferior ao valor desejado indicando a contaminação dos extratos de RNA total por carboidratos.



**Figura 4.** Gráfico comparativo das médias e desvio padrão da concentração de RNA total em ng/μL extraído pelo método de Trizol das amostras do rim, traqueia e intestino de frangos de corte e galinha de postura de granjas do estado do Rio de Janeiro.

Para verificar a integridade do RNA as amostras foram submetidas a eletroforese em géis de agarose (1,5%) onde foram observadas as bandas de RNA integras (Figura 5).



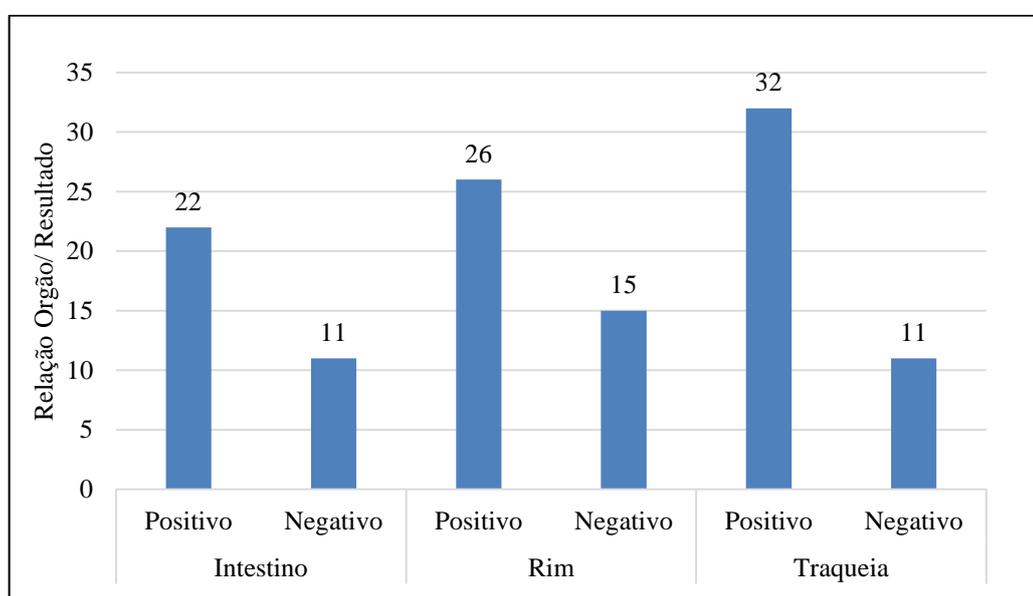
**Figura 5.** Perfil eletroforético em gel de agarose a 1,5%, corado por brometo de etídeo. O RNA total extraído a partir de amostras do tecido renal de frangos de corte pertencentes a 4 animais da granja pertencente ao município de Lídice localizada no estado do Rio de Janeiro. As bandas visualizadas correspondem ao RNA total extraído a partir das amostras 55, 56, 57 e 58, respectivamente.

## 4.2 Resultados da Reação de RT-qPCR para Detecção Molecular do vBIG

Um total de 50 animais foram avaliados para a presença do RNA do vBIG através da técnica de RT-qPCR, a partir de amostras de tecido traqueal, renal e intestinal, totalizando 117 amostras. A ave foi considerada positiva quando o RNA vBIG fosse detectado em pelo menos um dos tecidos avaliados.

Dessa forma, uma frequência de 92% ( $n = 46/50$ ) das aves foi considerada positiva quando esse critério foi aplicado. Quando a frequência do vBIG foi avaliada em função do tecido utilizado verificou-se que na traqueia o percentual de amostras positivas foram de 74,42% ( $n = 32/43$ ), 63,41% ( $n = 26/41$ ) no rim e 66,66% ( $N = 22/33$ ) no intestino.

Apesar de se observar uma maior frequência do vBIG na traqueia não houve associação significativa ( $p > 0,53$ ) entre o resultado positivo na RT-qPCR com o tecido utilizado para realização da técnica. Das 117 amostras testadas 68,37% ( $n = 80/117$ ) obtiveram resultado positivo para o vBIG. A Figura 6 representa a relação entre as amostras positivas e negativas com o tecido utilizado para detecção molecular do vBIG.



**Figura 5.** Frequência do vírus da Bronquite Infecciosa das Galinhas através da técnica de RT-qPCR nos tecidos da traqueia, rim e intestino de frangos de corte e galinhas de postura de granjas do estado do Rio de Janeiro para triagem das amostras.

Quando a frequência de aves positivas para o vBIG foi avaliada em função da granja, verificou-se uma frequência de 90% ( $n = 9/10$ ) nas granjas de frangos de corte de Lidice, 94,12% ( $n = 16/17$ ) na granja de Vargem Alegre e 100% ( $n = 10/10$ ) na granja de Passa Três. Na granja de galinha de postura em Macaé a frequência do vBIG foi de 76, 92% ( $n = 10/13$ ) (Tabela 4).

Apesar da frequência do vBIG na granja de postura em Macaé ser nitidamente inferior as frequências observadas nas granjas de frango de corte não houve diferença significativa ( $p > 0,23$ ) entre os percentuais observados quando a ave foi considerada positiva em pelo menos um dos tecidos avaliados.

As frequências de amostras positivas para o vBIG também foram avaliadas em função do resultado da RT-qPCR em cada órgão de aves de uma mesma granja. Assim, foi possível observar na granja de Lidice uma frequência de 80% ( $n = 8/10$ ) do tecido traqueal infectado pelo vBIG e 50% ( $n = 5/10$ ) no tecido renal. Nessa granja não foi avaliado o tecido intestinal das aves. Nas granjas de frangos de corte de Vargem Alegre e na Passa Três observou-se uma mesma frequência em todos os tecidos analisados com 100% ( $n = 9/9$ ) de positividade na

traqueia, 80% (n = 8/10) no rim e 90% (n=9/10) no intestino. Finalmente, na granja de galinhas de postura a frequência do vBIG obtido por RT-PCR no tecido traqueal foi consideravelmente inferior aos valores observados nas granjas de frangos de corte, com um percentual de 38,46% (n = 5/13). Nos demais tecidos a frequência foi de 45,45% (n = 5/11) e 30,77% (n = 4/13) no tecido renal e intestinal, respectivamente.

Uma das possibilidades para este resultado, é que o número de amostras utilizadas não seja grande o suficiente para representar de maneira genuína uma população, e por conta disso com o resultado do teste, não seja possível aceitar a hipótese de que existe diferenças entre o melhor sistema fisiológico para detectar o vírus.

Balestrin et al. (2014) realizaram um estudo sobre o vBIG em diferentes sistemas fisiológicos e observou que o vírus da bronquite é capaz de ser eliminado pelo aparelho gastrointestinal durante semanas, enquanto o título viral na traqueia cai rapidamente após alguns dias, sendo encontrado em concentrações maiores principalmente nas fases iniciais da infecção (DE WIT, 2000). Esse tipo de achado difere dos resultados encontrados nesse estudo.

No entanto, uma outra provável justificativa para esse resultado é que a maioria das aves utilizadas para a amostragem, eram muito jovens com aproximadamente 4 semanas de idade. Desta forma, as aves poderiam estar passando pelo período de multiplicação após a vacinação, ou em caso de contágio por cepas de campo, o tempo de vida do animal foi muito pequeno para que os títulos virais nos diferentes órgãos tenham diminuído o suficiente a ponto de gerar uma diferença na frequência de detecção molecular do vBIG nos tecidos analisados.

Balestrin et al. (2014) também fizeram essa observação alegando que o vírus pode ser encontrado nas mais variadas idades, no entanto a aptidão da ave (corte ou postura) pode influenciar na frequência de detecção do vBIG, já que as aves de postura tem um ciclo de vida produtiva maior. Os resultados obtidos por Balestrin et al. (2014) mostram que as aves mais jovens obtiveram um percentual maior do sorotipo vacinal quando comparadas as aves de idades mais avançadas, onde foram identificados um percentual maior do sorotipo BR-I.

Bande et al.(2016) também relataram que a eliminação do vírus pode acontecer por até 20 semanas através do aparelho gastrointestinal sugerindo que existem sim, diferenças na detecção entre os sistemas fisiológicos afetados pelo vBIG.

Assim, podemos dizer que o sucesso na detecção molecular do vBIG nos diferentes sistemas fisiológicos pode variar em função da idade e do tipo de criação. No entanto, em lotes vacinados o médico veterinário deve ficar atento à replicação viral no tecido traqueal nas primeiras semanas de vida. Outros experimentos nesse sentido devem ser realizados a fim de elucidar melhor, qual o principal órgão para a detecção do vBIG.

Das 50 aves testadas para o vírus da Bronquite através do RT-qPCR cerca de 50% (25/50) foram completamente positivas, ou seja, foram positivas em todas as amostras de órgãos testadas. Enquanto que, cerca de 42% (21/50) obtiveram divergência nos resultados sendo positiva em um sistema fisiológico e negativa em outros.

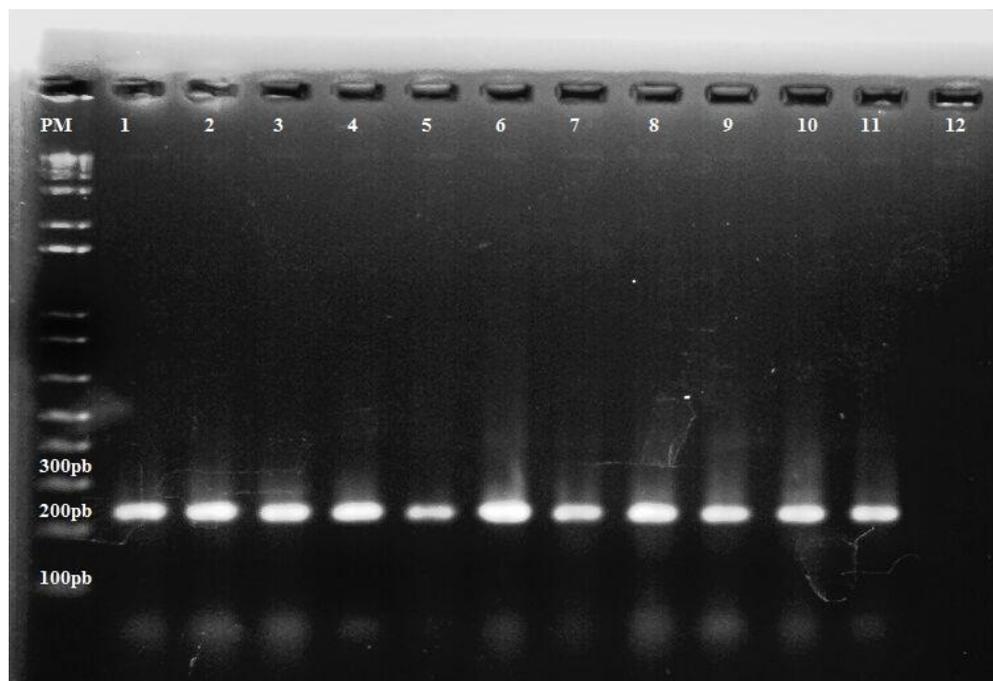
Esse resultado pode estar relacionado com o número de alvos encontrados em cada amostra, já que amostras com concentrações de RNA viral em quantidades muito pequenas podem não conseguir emitir fluorescência suficiente para ser detectada pelo aparelho. Na Tabela 4 podemos observar os resultados do RT-qPCR, divididos por granja, ave, órgão e o número vinculado à amostra (Anexo D), onde podemos observar os resultados divididos por amostra.

**Tabela 4.** Frequência do vírus da Bronquite Infecciosa da Galinhas detectados por RT-qPCR em tecido traqueal, renal e intestinal de frangos de corte de galinhas de postura em granjas no estado do Rio de Janeiro.

Granja	Nº total de aves	Frequência de aves Positivas*	Frequência de positividade/tecidos (%)		
			Traquéia n = 43	Rim n = 41	Intestino n = 33
Lídice	10	90%	80% (n=8/10)	50% (n=5/10)	-
Vargem Alegre	17	94,12%	100% (n=9/9)	80% (n=8/10)	90% (n=9/10)
Passa Três	10	100%	100% (n=10/10)	80% (n=8/10)	90% (n=9/10)
Macaé	13	76,92%	38,46% (n=5/13)	45,45% (n=5/11)	30,77% (n=4/13)
<b>Total</b>	50		74,42%	63,41%	66,66%

### 4.3 PCR - Resultados do Polimorfismo do Comprimento de Fragmento de Restrição/ “Restriction Fragment Length Polymorphism” – (RT-PCR RFLP)

O RT-qPCR foi utilizado para selecionar um total de 25 aves positivas em pelo menos um dos tecidos. Dessas aves, foram selecionadas um total de 56 amostras, sendo 22 de traqueia, 19 de rim e 15 de intestino. Essas amostras foram submetidas à reação de RT-PCR com alvo na amplificação de 236 pb do gene S1 do vBIG. Do total de amostras analisadas 100% foram consideradas positivas (Figura 7), inclusive amostras que foram consideradas negativas no RT-qPCR.



**Figura 6.** Eletroforese em gel de agarose 2% corado com brometo de etídeo, mostrando a amplificação de 236 pares de base do gene S1 do vírus da Bronquite Infecciosa das Galinhas por RT-PCR a partir de tecidos da traqueia, rim e intestino de frangos de corte e galinhas de postura em granjas do estado do Rio de Janeiro. PM = Marcador de peso molecular de 1Kb (Invitrogen); Linhas 1-10 amostras positivas da traqueia, rim e intestino; Linha 11 – Controle Positivo (massachusetts); Linha 12 – Controle negativo de amplificação.

Possivelmente a sensibilidade mais elevada da RT-PCR desenvolvida nesse estudo pode ser atribuída as sequências do gene S1 de vBIG utilizadas para prospecção dos

oligonucleotídeos iniciadores da RT-PCR. Essas sequências são mais semelhantes aos genótipos normalmente detectados no território Brasileiro.

Outro aspecto que também pode ter influenciado na sensibilidade da reação foi a região alvo do genoma do vBIG utilizada nas diferentes reações. A reação de RT-qPCR desenvolvida por Callison et al. (2006) é baseada em seis sequências de genótipos próximos geneticamente do sorotipo vacinal Massachusetts incluindo a Cepa M41, que é difundida no mundo inteiro inclusive no Brasil.

O alvo utilizado por Callison et al (2006) foi a região conservada 5'-UTR do genoma do vBIG. Enquanto nosso primer foi desenhado com um alvo na região conservada do gene que codifica para proteína S1 de cepas BR e Massachusetts. A utilização de cepas brasileiras para desenhar os pares de oligonucleotídeos iniciadores em nosso trabalho podem ter influenciado a sensibilidade de nosso experimento em comparação ao RT-qPCR de Callison et al. (2006). Uma análise comparativa entre as regiões 5'UTR do sorotipo Massachusetts e do sorotipo BR deve ser realizada para comprovar essa suspeita.

Segundo Ballestrin et al. (2014) o sorotipo BR foi encontrado em uma maior frequência no Brasil, quando comparada a frequência do sorotipo Massachusetts. Uma frequência elevada de amostras positivas para o sorotipo BR na presente pesquisa também ajudam a levantar essa hipótese.

Existem mais de 20 sorotipos diferentes geneticamente no mundo. Essas divergências vão desde pequenas substituições, inserções genômicas, mutações e recombinações de RNA no gene S1 (FELLAHI et al., 2015). A criação de variantes a partir de recombinações parece ser o mecanismo principal da diversidade dos sorotipos.

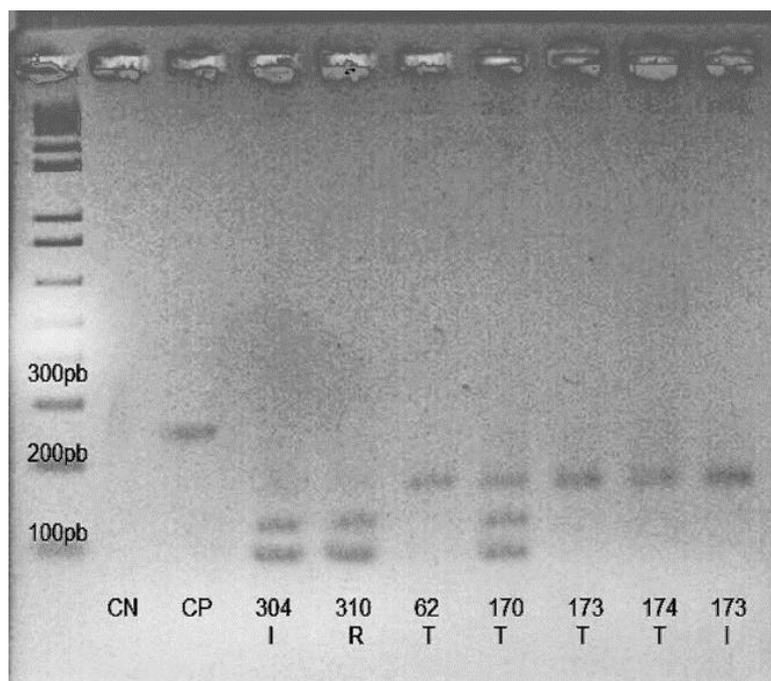
A alta frequência de recombinação nas coronavírus provavelmente é causada pelo seu mecanismo único de síntese de RNA, que envolve transcrição descontínua e pulos da polimerase (JEONG et al., 1996; ABOLNIK, 2016). A subunidade S1 é uma das regiões genéticas de maior variabilidade e nossos iniciadores foram desenhados na região mais conservada desse gene, sendo capaz de amplificar a região hipervariável 1.

O uso das endonucleases de restrição SspI e PvuII foi bem sucedido, considerando o objetivo de diferenciar as amostras dos sorotipos Massachusetts e BR-I através do uso das enzimas de restrição como pode ser visualizado na Figura 8.

A enzima de restrição SspI foi capaz de cortar a sequência do sorotipo Massachusetts em 2 fragmentos de 124pb e 112 pb, enquanto a enzima PvuII gerou um padrão de fragmentos de 173pb e 63pb. O RT-PCR RFLP desenvolvido por esse trabalho obteve uma frequência de 94,64% (n = 53/56) das amostras pertencentes ao sorotipo BR-I, 3,57% (n = 2/56) das amostras apresentaram fragmentos com padrão semelhante ao esperado do Sorotipo Massachusetts e 1,78% (1/56) apresentaram padrão para ambos os sorotipos (Massachusetts e BR).

O método baseado na RT-PCR-RFLP se baseia na digestão de fragmentos amplificados por RT-PCR através endonucleases de restrição, que geram uma série de fragmentos de diferentes tamanhos, que ocorrem como resultado de mutações em sequências dos sítios de restrição, a aquisição ou a deleção dos sítios de reconhecimento, ou inserções e exclusões nas sequências entre os sítios de reconhecimento (RAMESH KUMAR et al., 2012).

Nesse método o DNA digerido é separado por eletroforese em gel (agarose ou poliacrilamida) e a imagem do gel é gravada digitalmente para posterior análise dos padrões de bandas (RAMESH KUMAR et al., 2012).



**Figura 7.** Perfil eletroforético em gel de agarose (3%) da reação realizada pelas endonucleases de restrição SspI e PvuII, com o intuito de diferenciar as amostras entre os sorotipos massachusetts e BR-I. Na ordem da esquerda para direita: CN é o controle negativo, CP é o controle positivo da cepa vacinal Massachusetts. As iniciais I (Intestino), R (Rim) e T (Traquéia) são utilizadas para determinar o órgão de origem de cada amostra.

Uma série de protocolos de RT-PCR-RFLP foram relatados para distinguir diferentes genótipos do vBIG (KWON et al., 1993; MONTASSIER et al., 2008, LIN et al., 1991; MARDANI et al., 2006), mas nenhum desses protocolos permitiu a identificação diferencial dos sorotipos BR e dos sorotipos Massachusetts que são utilizados como vacinas tanto de frangos de corte quanto em galinhas de postura no Brasil.

O desenvolvimento de técnicas mais rentáveis que possibilitem sua aplicação em estudos que envolvem grandes tamanhos amostrais, como inquéritos que objetivam a compreensão dos aspectos relacionados a virulência, patogenicidade e tropismo do vBIG em galinhas são necessários, já que apesar dos progressos significativos nos últimos anos, ainda existem inúmeras lacunas em sua compreensão (PEREIRA et al., 2016; CHHABRA et al., 2016; BALESTRIN et al., 2014). Assim, para preencher essas lacunas, há uma necessidade permanente de se realizar vigilância de extensas populações do vBIG (CHACÓN et al., 2011; FRAGA et al., 2013).

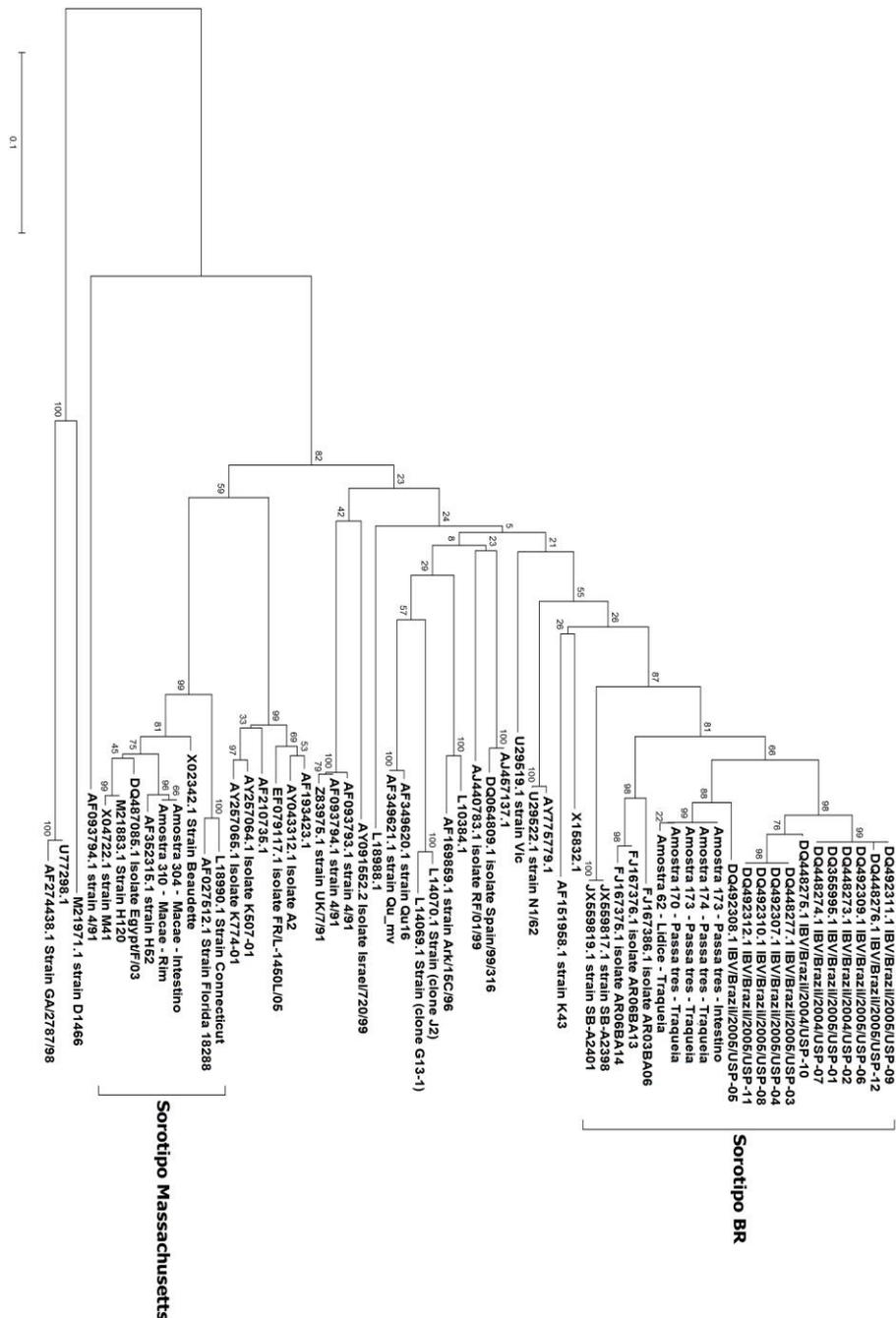
Por um lado, isso pode ser simplesmente e facilmente conseguido, pelo menos em termos de taxas de detecção, por meio do rastreamento baseado na PCR, com os iniciadores específicos, como os empregados no presente estudo.

Por outro lado, a identificação precisa do vBIG ou ainda ao nível sorotipo (como exigido para investigações epidemiológicas detalhadas, identificação de cepas, ou estudos filogenéticos), requer uma análise pós-amplificação na forma de sequenciamento dos produtos da PCR (VALASTRO et al., 2016).

Infelizmente, apesar da redução contínua do custo de metodologias de sequenciamento, a aplicação rotineira dessa metodologia como uma técnica para a identificação viral ainda não é financeiramente viável ou prática para muitos laboratórios, devido às complexidades técnicas e treinamento, necessários para realizar uma análise eficiente da grande quantidade de dados gerados pelo sequenciamento.

Diante dessas limitações, a aplicação de métodos alternativos e mais baratos para análise dos produtos da PCR deve ser priorizada na análise molecular preliminar de isolados e, assim selecionar os grupos representativos de “amplicons” derivados dos vBIG para o sequenciamento.

Os resultados da diferenciação dos sorotipos Massachusetts e BR por RT-PCR RFLP foram confirmados através de sequenciamento e análise filogenética de uma região de aproximadamente 590pb do gene S1 do vBIG (FRAGA et al., 2013) (Figura 9).



**Figura 8.** Agrupamento filogenético baseado em 600 nucleotídeos do gene S1 do vBIG detectados por RT-qPCR em tecidos de aves naturalmente infectadas em granjas do estado do Rio de Janeiro. O conjunto de dados total foram de 4 seqüências disponíveis no GenBank. Em sorotipo BR estão agrupadas as seqüências classificadas como variantes virais Brasileiras (BR) e em sorotipo Massachusetts, as amostras classificadas como variantes da cepa do sorotipo Massachusetts. As iniciais I (Intestino), R (Rim) e T (Traqueia) são utilizadas para determinar o órgão de origem de cada amostra.

Um total de sete amostras foram sequenciadas, duas pertencentes ao sorotipo Massachusetts e cinco ao sorotipo BR. A amostra 170T apresentou perfis de digestão pelas endonucleases de restrição SspI e PvuII durante o processo de genotipagem através do RT-PCR RFLP compatível com os sorotipos BR e Massachusetts.

No entanto, no sequenciamento a cepa foi classificada no lado onde se agruparam as cepas pertencentes ao sorotipo BR. Esse resultado pode ser explicado baseando-se na hipótese de que a ave poderia estar infectada com mais de um sorotipo do vírus. A seguinte situação poderia justificar a coinfeção pelos sorotipos Massachusetts e BR. Possivelmente, essa ave se infectou com o vírus vacinal (sorotipo Massachusetts), porém o desafio pelas cepas de campo foi capaz de vencer a barreira de proteção e infectar a ave.

Inúmeros oligonucleotídeos iniciadores já foram desenhados com o intuito de amplificar as regiões hipervariáveis da subunidade S1 proteína S e com isso identificar o vírus diretamente de amostras do campo, sem que haja necessidade de inocular o vírus em ovos embrionados e posteriormente identificá-lo através de soro neutralização. Essa técnica apesar de bastante sensível, leva dias para a obtenção dos resultados, porque muitas das vezes com isolados de campo é necessário que se realize múltiplas passagens para cultivar o vírus nos ovos embrionados. Tornando-se uma metodologia pouco prática no dia-a-dia da produção avícola (BALESTRIN et al., 2014; CHACÓN, 2011; FELLAHI, et al., 2016).

Enquanto isso os ensaios imunológicos que usam anticorpos monoclonais específicos para detectar o vírus direta ou indiretamente, ou testes sorológicos do tipo ELISA, apesar de mais práticos e rápidos carecem quanto à especificidade e a sensibilidade nos resultados. Muitas vezes os isolados podem ser misturas de diferentes sorotipos e desta forma, gerar confusão no momento de interpretar os resultados (FELLAHI et al., 2016).

As análises moleculares tornaram-se assim mais frequentemente usadas, por serem mais rápidas, práticas, específicas e sensíveis para detecção do agente etiológico (CHACÓN et al., 2011), podendo avaliar o RNA viral diretamente após a extração dos isolados do campo (FELLAHI, et al. 2016).

Muitas formas para detecção e caracterização molecular do vBIG foram desenvolvidas nos últimos anos, entre elas estão o multiplex-PCR, o nested-PCR e o sequenciamento, bem como o RT-qPCR e o High Resolution Melting (HRM), no entanto apesar de serem mais sensíveis elas também são mais caras do que o RT-PCR (BANDE et al., 2016).

Chacón et al. (2011) observaram que o sequenciamento é melhor que o RFLP, pois pequenas divergências genéticas podem gerar diferentes padrões no RFLP e tornar a interpretação mais difícil. Ademais, este é considerado a melhor forma de diferenciar o vBIG, inclusive vários laboratórios pelo mundo, utilizam o sequenciamento como ferramenta diagnóstica para distinguir as cepas do vBIG. No entanto, ele possui um elevado custo financeiro e de tempo, mão de obra, e equipamentos especializados, o que aumenta mais os custos dessa metodologia.

Segundo Fellahi et al. (2016) o uso de técnicas moleculares mais avançadas e elaboradas como o uso de sondas no RT-qPCR ou o próprio sequenciamento tornam-se inviáveis para o diagnóstico comercial em granjas de países em desenvolvimento como é o caso do Marrocos.

Essa mesma conclusão pode ser observada em alguns casos do Brasil, especialmente, no que se diz respeito a plantéis de granjas de médio porte que atendem comercialmente apenas pequenas regiões ou um único estado. Visto que estas se tornam técnicas inviáveis para produtores que ainda estão se estabelecendo na avicultura nacional.

Know et al (1993) salientam que o RFLP serve para a análise e identificação de genótipos variantes, bem como identificar cepas virais que sejam antigenicamente diferentes (Massachusetts e BR), sendo assim, um método de rotina adotado nos diagnósticos laboratoriais de sanidade avícola, pois é barato e pode ser realizado em pouco tempo. Desta

maneira, a elaboração do PCR convencional associada à análise de RFLP é uma alternativa mais realista para o produtor em suas granjas.

A combinação de diagnóstico e caracterização genética podem ser ferramentas valiosas para as organizações governamentais autorizarem a introdução de novas vacinas e no desenvolvimento de novos conceitos de vacinas e de protocolos vacinais (MARANDINO et al., 2016; UMAR et al., 2016). Pois, uma genotipagem através do RFLP é capaz de distinguir as principais cepas circulantes numa determinada região e garantir a realização de um protocolo vacinal adequado.

A evolução do vírus da Bronquite parece ser influenciada por muitos fatores, como o status imunológico do animal hospedeiro, densidade populacional das aves, e o uso de vacinações com múltiplas cepas, além disso, o RNA genômico do vBIG possui elevada taxa de erros em sua transcrição (JANG et al., 2007).

Contudo, apesar do programa de vacinação com o sorotipo Massachusetts ser o mais comumente utilizado no mundo a presença da doença nos grupos vacinados é constantemente observada (UMAR et al., 2016).

Visto que, o uso indiscriminado de várias vacinas feitas por vírus heterólogos de vBIG no campo podem aumentar a pressão de seleção, resultando em um aumento de novas variantes genéticas (JANG et al., 2007).

Assim, como o uso de vacinas que diferem dos genótipos circulantes podem gerar consequências negativas, pois também podem atuar no aumento da pressão de seleção e promover a emergência de cepas de campo divergente (MARANDINO et al., 2016).

A Cepa BR-I foi encontrada em 94,64% das amostras analisadas, o que sugere que o protocolo vacinal abordado para a Bronquite infecciosa das galinhas no Brasil, possivelmente não é eficaz para prevenção do vírus nas granjas avícolas do estado.

Nesse ínterim, Chacón et al. (2011) demonstraram que as variantes brasileiras são marcadamente diferentes de qualquer outro tipo de vBIG conhecido no mundo, o que indica que a utilização de vacinas estrangeiras não é recomendada.

O sequenciamento da região demonstrou previamente que o grupo das variantes virais brasileiras do vBIG formam um grupo filogenético separado, se tornando distante geneticamente da vacina utilizada como referência no Brasil (Figura 9). Por isso, o Ministério da Agricultura e Pecuária e Abastecimento (MAPA) permite no Brasil apenas a vacinação para a cepa Massachusetts e derivadas desta cepa (BALESTRIN et al., 2014).

No entanto, esse tipo de abordagem, pode não funcionar se as cepas de campo forem diferentes das cepas utilizadas para a vacina (CAVANAGH et al., 2007). Como é o caso, nos resultados obtidos pela análise do RT-PCR RFLP, as amostras são significativamente divergentes do protocolo vacinal autorizado pelo MAPA. E para isso seria necessário à instituição de uma nova vacina, como por exemplo, uma que promova imunidade para as cepas dos sorotipos brasileiros.

Além disso, é necessária também uma avaliação dos genótipos regionais antes de introduzir uma nova vacina nos plantéis. Desse modo, o RFLP desenvolvido nesse trabalho, poderia ser uma ferramenta útil na diferenciação do genótipo vacinal e do genótipo brasileiro.

Kwon et al. (1993) obtiveram dificuldade em diferenciar as cepas Gray e JMK uma da outra através da RT-PCR RFLP, o que mostra que apesar de ser uma boa técnica, nem sempre ela poderá ser utilizada para diferenciar as cepas. Outro problema, é que as enzimas de restrição só podem ser utilizadas em genótipos já classificados.

Do contrário, não há como saber o padrão dos fragmentos gerados, ou seja, o RFLP será capaz de identificar uma nova cepa, mas não será capaz de classificá-la até que essa sequência seja analisada e seus padrões no gel de agarose sejam conhecidos (CAVANAGH & GELB, 2008).

Esta é uma técnica muito simples de ser executada por um baixo custo quando comparada as demais técnicas moleculares, sendo então considerada uma técnica importante para triar as amostras e garantir uma genotipagem em campo.

No trabalho, foi realizado um sequenciamento de 7 amostras para compararmos a eficácia do RFLP como ferramenta diagnóstica. Todas as 7 amostras sequenciadas obtiveram resultados semelhantes ao do RFLP. Não existindo divergências entre os resultados em ambas as técnicas.

## 5 CONCLUSÃO

O RT-PCR-RFLP desenvolvido na presente pesquisa é capaz de detectar e diferenciar o sorotipo Massachusetts (cepa vacinal) das cepas pertencentes ao sorotipo BR.

Utilizando a técnica de RT-PCR RFLP as variantes virais do vBIG circulante em maior frequência no estado do Rio de Janeiro pertencem ao sorotipo BR-I.

A elevada frequência de amostras positivas para bronquite no sorotipo BR-I sugere que o protocolo vacinal adotado no Rio de Janeiro não está sendo eficaz para prevenir a doença no estado do Rio de Janeiro.

O RT-PCR RFLP é uma ferramenta para detecção molecular de baixo custo e fácil execução, sendo uma excelente alternativa para diferenciar os genótipos circulantes do vBIG pertencentes aos sorotipos BR e Massachusetts.

## 6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Existem muitas lacunas para serem estudadas e aprofundadas no que se diz respeito ao diagnóstico molecular do vBIG. Abolnik (2016) especula que se pretendemos que existam avanços no controle da doença, outras proteínas virais devem ser entendidas e estudadas já que em outras coronaviruses já se foi comprovada que também existem relações significativas entre essas proteínas e a resposta imunológica do hospedeiro.

O Brasil é um dos maiores produtores de carne de frango do mundo, e a necessidade da utilização de um protocolo vacinal adequado para bronquite já está mais do que fundamentada para o controle e a prevenção do vBiG.

No entanto, em tempos de crise financeira no país para que os produtores avícolas sintam-se inclinados a realização de uma genotipagem e posteriormente a adequação do protocolo vacinal, é necessário, que a metodologia de diagnóstico, possua apelo comercial, ou seja, seja rápida, eficiente e de um custo relativamente baixo. Com isso, acreditamos que o RT-PCR RFLP seja uma excelente ferramenta diagnóstica para a produção avícola.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABOLNIK, C. Genomic and single nucleotide polymorphism analysis of infectious bronchitis coronavirus. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 32, p. 416–424, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.meegid.2015.03.033>>. Acesso em: 25 jan. 2017.

ABDEL-MONEIM, A.S.; ZLOTOWSKI P.; VEITS, J.; KEIL G.M.; TEIFKE, J.P. Immunohistochemistry for detection of avian infectious bronchitis virus strain M41 in the proventriculus and nervous system of experimentally infected chicken embryos. **Virology Journal**, v. 6, n. 15, 2009.

ABRO, S.H. **Molecular characterization and detection of infectious bronchitis virus**. 2013. 54f. Thesis (Doctoral Biomedical Sciences and Veterinary Public Health) - Faculty of Veterinary Medicine and Animal Science, Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala, 2013.

ALVARADO, I.R.; VILLEGAS, P.; MOSSOS, N.; JACKWOOD, M.W. Molecular characterization of avian infectious bronchitis virus strains isolated in Colombia during 2003. **Avian diseases**, v. 49, n. 4. p. 494-499, 2005.

ARMESTO, M.; EVANS, S.; CAVANAGH, D.; ABU-MEDIAN, A.B.; KEEP, S.; BRITTON, P. A recombinant avian infectious bronchitis virus expressing a heterologous spike gene belonging to the 4/91 serotype. **PLoS ONE**, v. 6, n. 8, 2011.

BANDE, F.; ARSHAD, S.S.; OMAR, A.R.; BEJO, M.H.; ABUBAKAR, M.S.; ABBA, Y. Pathogenesis and diagnostic approaches of avian infectious bronchitis. **Advance in Virology**, v. 2016, 11p. 2016.

BALESTRIN, E.; FRAGA, A.P.; IKUTA, N.; CANAL, C.W.; FONSECA, A.S.K.; LUNGE, V.R. Infectious bronchitis virus: dissemination and main circulating genotypes in different avian physiological systems from Brazilian poultry commercial flocks. **Poultry Science**, v. 93, n. 8, p. 1922–1929, 2014.

BEACH, J.R.; SCHALM, O.W. A filterable virus, distinct from that of laryngotracheitis, the cause of a respiratory disease of chicks. **Poultry Science**, v. 15, n. 3, p. 199-206, 1936.

BERNARDINO, A. Programas de vacinação. In: MENDES, A.A.; NAAS, I.A.; MACARI, M. **Produção de Frangos de Corte**. Campinas: FACTA, p 179-202, 2004.

BORUCKI, M.K.; ALLEN, J.E.; CHEN-HARRIS, H.; ZEMLA, A.; VANIER, G.; MABERY, S.; TORRES, C.; HULLINGER, P.; SLEZAK, T. The role of viral population diversity in adaptation of bovine coronavirus to new host environments. **PloS ONE**, v. 8, n. 1, 11p. 2013.

CALLISON, S.A.; HILT, D.A.; BOYNTON, T.O.; SAMPLE, B. F.; ROBISON, R.; SWAYNE, D. E.; JACKWOOD, M.W. Development and evaluation of a real-time Taqman RT-PCR assay for the detection of infectious bronchitis virus from infected chickens. **Journal of Virological Methods**, v. 138, n. 1, p. 60-65, 2006.

CASAI, R.; DAVIES, M.; CAVANAGH, D.; BRITTON, P. Gene 5 of the avian coronavirus infectious bronchitis virus is not essential for replication. **Journal of Virology**, v. 79, n. 13, p. 8065-8078, 2005.

CAVANAGH, D. Coronavirus avian infectious bronchitis virus. **Veterinary Research**, v. 38, n. 2, p. 281–297, 2007.

CAVANAGH, D. Coronaviruses in poultry and other birds. **Avian Pathology**. v. 34, n. 6, p. 439–448, 2005.

CAVANAGH, D.; DAVIS, P. J.; DARBYSHIRE, J. H.; PETERS, R. W. Coronavirus IBV: virus retaining spike glycopolypeptide S2 but not S1 is unable to induce virus-neutralizing or haemagglutination-inhibiting antibody, or induce chicken tracheal protection. **Journal of General Virology**, v. 67, n. 7, p. 1435-1442, 1986.

CAVANAGH, D.; ELUS, M.M.; COOK, J.K.A. Relationship between sequence variation in the S1 spike protein of infectious bronchitis virus and the extent of cross-protection in vivo. **Avian Pathology**, v. 26, n. 1, p. 63-74, 1997.

CAVANAGH, D.; GELB, J. Infectious bronchitis. In: SAIF, Y.M.; FADLY, A.M.; GLISSON, J.R.; MCDOUGALD, L.R.; NOLAN, L.K.; SWAYNE, D.E. **Diseases of Poultry**. 12<sup>th</sup> ed. Ames: Blackwell Publishing, p.117-135, 2008.

CAVANAGH, D.; MAWDITT, K.; WELCHMAN, D.B.; BRITTON, P.; GOUGH, R.E. Coronaviruses from pheasants (*Phasianus colchicus*) are genetically closely related to coronaviruses of domestic fowl (infectious bronchitis virus) and turkeys. **Avian Pathology**, v. 31, p. 81-93, 2002.

CAVANAGH, D.; NAQI, S.A. Infectious bronchitis. In: SAIF, Y.M.; BARNES, H.J.; GLISSON, J.R.; FADLY, A.M.; MCDOUGALD, L.R.; SWAYNE, D.E. **Diseases of Poultry**. 11<sup>th</sup> ed. Ames: Iowa State Press; p. 101-119. 2003.

CHACÓN, J.L.; ASSAYAG, M.S.; REVOLLEDO, L.; IVO, M.; VEJARANO, M.P.; PEDROSO, A.C.; FERREIRA, A. Pathogenic patterns in chicken challenged with variant strains of infectious bronchitis virus isolated from chicken flocks with different clinical manifestations. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON AVIAN CORONA-AND PNEUMOVIRUSES AND COMPLICATING PATHOGENS, 6., 2009, Germany, **Anais...** Germany: VVB Laufersweiler, 2009, p. 138-142.

CHACÓN, J.L.; RODRIGUES, J.N.; ASSAYAG JUNIOR, M.S.; PELOSO, C.; PEDROSO, A.C.; FERREIRA, A.J.P. Epidemiological survey and molecular characterization of avian infectious bronchitis virus in Brazil between 2003 and 2009. **Avian Pathology**, v. 40, n. 2, p. 153-162, 2011.

CHHABRA, A.; RING, A.M.; WEISKOPF, K.; SCHNORR, P.J.; GORDON, S.; LE, A.C.; KWON, H.S.; RING, N.G.; VOLKME, J.; HO, P.Y.; TSENG, S.; WEISSMAN, I.L.; SHIZURU, J.A. Hematopoietic stem cell transplantation in immunocompetent hosts without radiation or chemotherapy. **Science Translational Medicine**, v. 10, n. 8, 2016.

COLLISSON, E.W.; PEI, J.; DZIELAWA, J.; SEO, S.H. Cytotoxic T lymphocytes are critical in the control of infectious bronchitis virus in poultry. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 24, n. 2, p. 187-200, 2000.

COOK, J.K.A. Bronquite infecciosa aviária. In: SIMPÓSIO SOBRE SANIDADE AVÍCOLA, 1997, São Paulo. **Anais...** São Paulo: FACTA, 1997. p. 13-27.

COOK, J.K.A.; JACKWOOD, M.; JONES, R.C. The long view: 40 years of infectious bronchitis research. **Avian Pathology**, v. 41, n. 3, p. 239-250, 2012.

DE WIT, J.J. Detection of infectious bronchitis virus. **Avian Pathology**, v. 29, p. 71-93, 2000.

DE WIT, J.J.S.; COOK, J.K.A.; VAN DER HEIJDEN, H.M.J. Infectious bronchitis virus variants: a review of the history, current situation and control measures. **Avian Pathology**, v. 40, p. 223-235, 2011.

DI FÁBIO, J. Bronquite infecciosa das galinhas: vacinar frangos. In: CONFERÊNCIA APINCO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLAS, 1992, Santos. **Anais...** Santos: FACTA, 1992. p.151-164.

DI FÁBIO, J. Classificação viral x variantes brasileiras. **Aveworld**, v. 2, n. 12, p. 20-25, 2004.

DI FÁBIO, J.; BUITRAGO, L.Y.V. Bronquite infecciosa das galinhas. In: BERCHIERI JÚNIOR, A.; SILVA, E.N.; DI FÁBIO, J.; SESTI, L.; ZUANAZE, M.A.F. **Doenças das aves**, 2 ed. Campinas: FACTA, 2009.

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

DI FABIO, J.; ROSSINI, L.I.; ORBELL, S.J.; PAUL, G.; HUGGENS, M.B.; MALO, A.; SILVA, B.G.M.; COOK, J.K.A. Characterization of infectious bronchitis viruses isolated from outbreaks of disease in commercial flocks in Brazil. **Avian Diseases**, v.44, p.582-589, 2000.

DESJARDINS, P.; CONKLIN, D. NanoDrop microvolume quantitation of nucleic acids. **Journal of Visualized Experiments**. v. 45, nov. 2010.

ETERRADOSSI, N.; BRITTON, P. Avian infectious bronchitis. In: ETERRADOSSI, N.; BRITTON, P. (Ed.). **Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals**. Paris: World Organisation for Animal Health, 2013.

FELLAHI, S.; EL HARRAK, M.; DUCATEZ, M.; LOUTFI, C.; KORAICHI, S.I.S.; KUHN, J.H.; KHAYI, S.; EL HOUADFI, M.; ENNAJI, M.M. Phylogenetic analysis of avian infectious bronchitis virus S1 glycoprotein regions reveals emergence of a new genotype in Moroccan broiler chicken flocks. **Virology Journal**, v. 12, n. 1, p. 116, 2015.

FELLAHI, S.; EL HARRAK, M.; KUHN, J.H.; SEBBAR, G.; BOUAITI, E.A.; KHATABY, K.; FIHRI, O.F.; EL HOUADFI, M.; ENNAJI, M.M. Comparison of SYBR green I real-time

RT-PCR with conventional agarose gel-based RT-PCR for the diagnosis of infectious bronchitis virus infection in chickens in Morocco. **BMC Research Notes**, v. 9, n. 1, p. 231, 2016.

FELIPPE, P.A.N.; SILVA, L.H.A.; SANTOS, M.M.A.; SPILKI, F.R.; ARNS, C.W. Genetic diversity of avian infectious bronchitis virus isolated from domestic chicken flocks and coronaviruses from feral pigeons in Brazil between 2003 and 2009. **Avian Diseases**, v. 54, p.1191–1196, 2010.

FRAGA, A.P.; IKUTA, N.; FONSECA, A.S.K.; SPILKI, F.R.; BALESTRIN, E.; RODRIGUES, C.D.; CANAL, C.W.; LUNGE, V.R. A Real-Time Reverse-Transcription Polymerase Chain Reaction for Differentiation of Massachusetts Vaccine and Brazilian Field Genotypes of Avian Infectious Bronchitis Virus. **Avian Diseases**, v. 60, n. 1, p. 16–21, 2016.

FRAGA, A. P.; BALESTRIN, E.; IKUTA, N.; FONSECA, A. S. K.; SPILKI, F. R.; CANAL, C. W.; LUNGE, V. R. Emergence of a new genotype of avian infectious bronchitis virus in Brazil. **Avian Diseases**, v. 57, n. 2, p. 225–32, 2013.

GELB, J.; NIX, W.A.; GELLMAN, S.D. Infectious bronchitis virus antibodies in tears and their relationship to immunity. **Avian Diseases**, v.42, p.364-374, 1998.

GONZALEZ, J.M.; GOMEZ-PUERTAS, P.; CAVANAGH, D.; GORBALENYA, A.E.; ENJUANES, L. A comparative sequence analysis to revise the current taxonomy of the family Coronaviridae. **Archives of Virology**, v. 148, n. 11, p. 2207-2235, 2003.

GELB, J.; JACKWOOD, M. W. Infectious bronchitis. A laboratory manual for the isolation and identification of avian pathogens. In: SWAYNE , D.E.; GLISSON, J.R.; JACKWOOD, M.W.; PEARSON, J.E.; REED, W.M. (Eds). **A Laboratory Manual for the Isolation and Identification of Avian Pathogens**. 4 th. United State: Association of Avian Pathologists, p.169-174, 1998.

GUY, J.S. Turkey coronavirus is more closely related to avian infectious bronchitis virus than to mammalian coronaviruses: a review. **Avian Pathology**, v. 29, p. 207-212, 2000.

HEWSON, K.; NOORMOHAMMADI, A.H.; DEVLIN, J.M.; MARDANI, K.; IGNJATOVIC, J. Rapid detection and non-subjective characterisation of infectious bronchitis virus isolates using high-resolution melt curve analysis and a mathematical model. **Archives of Virology**, v. 154, n. 4, p. 649–660, 2009.

HOPKINS, S.R.; YODER JR, H.W. Increased incidence of airsacculitis in broilers infected with *Mycoplasma synoviae* and chicken-passaged infectious bronchitis vaccine virus. **Avian Diseases**, v. 28, n. 2, p. 386-396, 1984.

IGNJATOVIC, J; ASHTON, D.F.; REECE, R.; SCOTT, P.; HOOPER, P. Pathogenicity of Australian strains of avian infectious bronchitis virus. **Journal of Comparative Pathology**, v. 126, p. 115-123, 2002.

JACKWOOD, M.W. Review of infectious bronchitis virus around the world. **Avian Diseases**, v. 56, n. 4, p. 634–641, 2012.

JACKWOOD, M.W.; HALL, D.; HANDEL, A. Molecular evolution and emergence of avian *Gammacoronaviruses*. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 12, p. 1305-1311, 2012.

JACKWOOD, M.W.; KWON, H.M.; HILT, D.A. Infectious bronchitis virus detection in allantoic fluid using the polymerase chain reaction and a DNA probe. **Avian Diseases**, v. 36, n. 2, p. 403-409, 1992.

JACKWOOD, M.W.; YOUSEF, N.M.; HILT, D.A. Further development and use of a molecular serotype identification test for infectious bronchitis virus. **Avian Diseases**, v. 41, n. 1, p. 105-110, 1997.

JANG, J.H.; SUNG, H.W.; SONG, C.S.; KWON, H.M. Sequence analysis of the S1 glycoprotein gene of infectious bronchitis viruses: identification of a novel phylogenetic group in Korea. **Journal of Veterinary Science**, v. 8, n. 4, p. 401-407, 2007

JEONG, Y.S.; REPASS, J.F.; KIM, Y.N.; HWANG, S.M.; MAKINO, S. Coronavirus transcription mediated by sequences flanking the transcription consensus sequence. **Virology**, v. 217, n. 1, p. 311-322, 1996.

JONES, B.V.; HENNION, R.M. The preparation of chicken tracheal organ cultures for virus isolation, propagation, and titration. **Methods in Molecular Biology**, v. 454, p. 103–107, 2008.

KARACA, K.; NAQI, S.A. Monoclonal antibody-based ELISA to detect serotypespecific infectious bronchitis virus antibodies. **Veterinary Microbiology**, n. 34, p. 249- 257, 1993.

KEELER, C.L.JR.; REED, K.L.; NIX, W.A.; GELB, J.JR. Serotype identification of avian infectious bronchitis virus by RT-PCR of the peplomer (S-1) gene. **Avian Diseases**, v. 42, n. 2, p. 275-284, 1998.

KING, D.J; CAVANAGH, D. Infectious bronchitis. **Diseases of Poultry**. 9.ed. Ames: Iowa State University Press, p.471-484. 1991.

KOCH, G.; HARTOG, L.; KANT, A.; ROOZELAAR, D. J. van. Antigenic domains on the peplomer protein of avian infectious bronchitis virus: correlation with biological functions. **Journal of General Virology**, v. 71, n. 9, p. 1929-1935, 1990.

KWON, H.M.; JACKWOOD, M.W.; BROWN, T.P.; HILT, D.A. Polymerase chain reaction and biotin-labeled DNA probe for detection of infectious bronchitis virus in chicken. **Avian Diseases**, v.37, n.1, p.149-156, 1993.

LAI, M.M.C.; CAVANAGH, D. The molecular biology of coronaviruses. **Advances in Virus Research**, v. 48, p. 1-100, 1997.

LIMA, E.T. Bronquite infecciosa de galinhas. In: ANDREATTI FILHO, R.L. **Saúde Aviárias e Doenças**. São Paulo: Roca, 2007.

LIN, Z.; KATO, A.; KUDOU, Y.; UEDA, S. A new typing method for the avian infectious bronchitis virus using polymerase chain reaction and restriction enzyme fragment length polymorphism. **Archives of Virology**, v. 116, n. 1-4, p. 19-31, 1991.

MARANDINO, A.; TOMÁS, G., HERNÁNDEZ, M.; PANZERA, Y.; CRAIG, M. I.; VAGNOZZI, A.; HERNÁNDEZ, D. Development of RT-qPCR assays for the specific identification of two major genotypes of avian infectious bronchitis virus. **Journal of Virological Methods**, v. 235, p. 21-25.2016.

MARDANI, K.; NOORMOHAMMADI, A.H.; IGNATOVIC, J.; BROWNING, G.F. Typing infectious bronchitis virus strains using reverse transcription-polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism analysis to compare the 3' 7.5 kb of their genomes. **Avian Pathology**, v. 35, n. 1, p. 63-69, 2006.

MATTHIJS; M.G.R, VAN ECK, J.H.H.; LANDMAN, W.J.M.; STEGEMAN, J.A. Ability of massachusetts-type infectious bronchitis virus to increase colibacillosis susceptibility in commercial broilers: a comparison between vaccine and virulent field virus. **Avian Pathology**, v. 32, n. 5, p. 473-481, 2003.

MCBRIDE, R.; VAN ZYL, M.; FIELDING, B.C. The coronavirus nucleocapsid is a multifunctional protein. **Viruses**, v. 6, n. 8, p. 2991-3018, 2014.

MENDONÇA, J.F.P.; MARTINS, N.R.D.S.; CARVALHO, L.B.D.; SÁ, M.E.P.D.; MELO, C.B.D. Infectious bronchitis of chickens: current knowledge, strains and vaccines in Brazil. **Ciência Rural**, v. 39, n. 8, p. 2559-2566, 2009.

MONTASSIER, M.F.S. **Diversidade genética de amostras brasileiras do vírus da bronquite infecciosa determinada pelo sequenciamento de nucleotídeos dos genes N e S1**. 2008. 105 f. Tese (Doutorado em Microbiologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

MONTASSIER, M.F.S.; BRENTANO, L.; MONTASSIER, H. J.; RICHTZENHAIN, L.J. Genetic grouping of avian infectious bronchitis virus isolated in Brazil based on RT-PCR/RFLP analysis of the S1 gene1. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.28, n.3, p.190-194, mar. 2008.

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

PENA, L.J.; SANTOS, B. M. dos; ROBERTI, R.P.; MARIN, S.Y. Bronquite infecciosa das galinhas (Revisão). **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 72, n. 3, p. 397-404, 2005.

PEREIRA, N.A.; ALESSI, A.C.; AKINO, C.H.; MONTASSIER, M.F.S.; SANTOS, I.L.; MONTASSIER, H.J.; RICHTZENHAIN, L.J. Uma nova estirpe brasileira do vírus da bronquite infecciosa causadora de lesões gonadais e a proteção cruzada induzida pela vacina comercial atenuada. In: REUNIÃO ANUAL DO INSTITUTO BIOLÓGICO, 19., 2006, São Paulo. **Anais...** São Paulo: RAIB, v.68, Suplemento, p.241-248, 2006.

RAJ, G.D.; JONES, R.C. Infectious bronchitis virus: immunopathogenesis of infection in the chicken. **Avian Pathology**, v 26, p.677-706, 1997.

RAMESH KUMAR, D.; KUMAR, P.S.; GANDHI, M.R.; AL-DHABI, N.A.; PAULRAJ,

M.G.; IGNACIMUTHU, S. Delivery of chitosan/dsRNA nanoparticles for silencing of wing development vestigial (vg) gene in *Aedes aegypti* mosquitoes. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 86, p. 89-95, 2016.

RESENDE, J.S. **Genotipificação e filogenia de isolados de vírus oriundos de surtos de bronquite infecciosa das galinhas na avicultura industrial do Estado de Minas gerais, Brasil, no período entre 1972 e 1989. 2003.** 163p. Tese (Doutorado em Ciência Animal) - Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2003.

RIMONDI, A., CRAIG, M. I., VAGNOZZI, A., KÖNIG, G., DELAMER, M., & PEREDA, A. Molecular characterization of avian infectious bronchitis virus strains from outbreaks in Argentina (2001–2008). **Avian Pathology**, v. 38, n. 2, p. 149-153, 2009.

ROCHA, F. R. T. **Produção e caracterização de anticorpos monoclonais contra a glicoproteína S1 do vírus da bronquite infecciosa das galinhas.** 2000. 31p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária Preventiva) - Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2000.

SANTOS, A.A.; AYRES, M.; AYRES, M.J. Aplicações estatísticas nas áreas das Ciências Biomédicas. **IEEE Transactions on Engineering Management**, v. 4, p. 1–380, 2007.

SPAAN, W.; CAVANAGH, D.; HORZINEK, M.C. Coronaviruses: structure and genome expression. **Journal of General Virology**, v. 69, n. 12, p. 2939-2952, 1988.

SEIFI, S.; ASASI, K.; MOHAMMADI, A. Natural co-infection caused by avian influenza H9 subtype and infectious bronchitis viruses in broiler chicken farms. **Veterinarski Arhiv**, v. 80, n. 2, p. 269-281, 2010.

SUTOU, S.; SATO, S.; OKABE, T.; NAKAI, M.; SASAKI, N. Cloning and sequencing of genes encoding structural proteins of avian infectious bronchitis virus. **Virology**, v. 165, n. 2, p. 589-595, 1988.

THOMPSON, J.D.; HIGGINS, D.G.; GIBSON, T.J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Research**, v. 22, n. 22, p. 4673–80, nov. 1994.

TORRES, C.A.; VILLARREAL, L.Y.; AYRES, G.R.; RICHTZENHAIN, L.J.; BRANDÃO, P.E. An avian coronavirus in quail with respiratory and reproductive signs. **Avian Diseases**, v. 57, p. 295–299, 2013.

UMAR, S.; SHAH, M. A. A.; MUNIR, M. T.; AHSAN, U.; KABOUDI, K. Infectious bronchitis virus: evolution and vaccination. **World Poultry Science Journal**, v. 72, n. 1, p. 49–60, 2016.

VALASTRO, V.; HOLMES, E.C.; BRITTON, P.; FUSARO, A.; JACKWOOD, M.W., CATTOLI, G.; MONNE, I. S1 gene-based phylogeny of infectious bronchitis virus: an attempt to harmonize virus classification. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 39, p. 349-364, 2016.

VILARREAL, L.Y.B. Diagnosis of infectious bronchitis: na overview of concepts and tools. **Brazilian Journal of Poultry Science**, v. 12, n. 2 p. 111-114, 2010.

VILLARREAL, L.Y.B.; SANDRI, T.L. SOUZA, S.P.; RICHTZENHAIN, L.J.; WIT, J.J.; BRANDÃO, P.E. Molecular epidemiology of avian infectious bronchitis in Brazil from 2007 to 2008 in Breeders, broilers, and layers. **Avian Diseases**, v. 54, p. 894-898, 2010.

VILLEGAS, P. Control de reacciones respiratorias. In: CONGRESO LATINO AMERICANO DE AVICULTURA, 16, 1997, México. **Anais...** México: 1997. p.388-391.

WINTER, C.; HERRLER, G.; NEUMANN, U. Infection of the tracheal epithelium by infectious bronchitis virus is sialic acid dependent. **Microbes Infection**, v. 10, n. 4, p. 367-73, 2008.

WOO, P.C.; LAU, S.K.; LAM, C.S.; LAU, C.C.; TSANG, A.K.; LAU, J.H.; BAI, R.; TENG, J.L.; TSANG, C.C.; WANG, M.; ZHENG, B.J.; CHAN, K.H.; YUEN, K.Y. Discovery of seven novel mammalian and avian coronaviruses in *Deltacoronavirus* supports bat coronaviruses as the gene source of *Alphacoronavirus* and *Betacoronavirus* and avian coronaviruses as the gene source of *Gammacoronavirus* and *Deltacoronavirus*. **Journal of Virology**, v. 86, n. 7, p. 3995-4008, 2012.

## 8 ANEXOS

### Anexo A Protocolo: Purificação do RNA Total de Células Animais Usando Tecnologia Spin

Este protocolo requer o RNeasy Mini Kit.

#### A) Determinação da quantidade correta de material inicial

É essencial utilizar a quantidade correta de material inicial para obter um rendimento de RNA ótimo e pureza nas amostras. A quantidade mínima é geralmente de 100 células, enquanto a quantidade máxima depende de:

- O teor de RNA do tipo de célula.
- A capacidade de ligação do RNA da coluna de spin RNeasy (100 µg de RNA).
- O volume de Tampão RLT necessário para lise eficiente (o volume máximo de Tampão RLT que pode ser usado limita a quantidade máxima de material inicial a  $1 \times 10^7$  células).

O conteúdo de ARN pode variar muito entre os tipos de células.

Os exemplos a seguir ilustram como determinar a quantidade máxima de material de partida:

- As células COS têm elevado teor de RNA (aproximadamente 35 µg de RNA por  $10^6$  células). Não utilizar mais de  $3 \times 10^6$  células, caso contrário a capacidade de ligação do RNA da Coluna de rotação RNeasy será excedida.

- As células HeLa tem um teor médio de RNA (aproximadamente 15 µg de RNA por  $10^6$  células). Não utilizar mais do que  $7 \times 10^6$  células, caso contrário, a capacidade da coluna de rotação RNeasy será excedida.

- As células NIH/3T3 tem baixo teor de RNA (aproximadamente 10 µg de RNA por  $10^6$  células). Pode utilizar-se a quantidade máxima de material de partida ( $1 \times 10^7$  células).

Sobre o seu conteúdo de RNA, recomendamos começar com não mais de  $3-4 \times 10^6$  células.

Dependendo do rendimento e pureza do RNA, pode ser possível aumentar o número de células das preparações subsequentes.

**Não sobrecarregue a coluna de rotação RNeasy, pois isso reduzirá significativamente o rendimento de RNA e pureza.**

#### B) Pontos importantes antes de iniciar

- As pastilhas celulares podem ser armazenadas a  $-70^\circ \text{C}$  para utilização posterior ou utilizadas directamente no procedimento.
- Determine o número de células antes de congelar. As pastilhas de células congeladas devem ser descongeladas ligeiramente para que possam ser deslocados por agitação do tubo na etapa 2.
- Os lisados celulares homogeneizados do passo 3 podem ser armazenados a  $-70^\circ \text{C}$  durante vários meses.
- Os lisados congelados devem ser incubados a  $37^\circ \text{C}$  num banho de água até serem descongelados e os sais são dissolvidos. Evitar a incubação prolongada, que pode comprometer a integridade do RNA. Se qualquer material insolúvel for visível, centrifugar durante 5 min a  $3000-5000 \times g$ . Transferir o sobrenadante para um novo vidro isento de RNase ou tubo de polipropileno, e continue com o passo 4.

- O tampão RLT pode formar um precipitado durante o armazenamento. Se necessário redissolver por aquecimento e, em seguida, colocar à temperatura ambiente (15-25 ° C).
- O tampão RLT e o tampão RW1 contêm um sal de guanidina e não compatível com reagentes desinfetantes contendo branqueador. Consulte a página 6 para obter informações sobre segurança
- Execute todas as etapas do procedimento à temperatura ambiente. Durante o procedimento, trabalhar rapidamente.
- Realizar todos os passos de centrifugação a 20-25 ° C em uma microcentrífuga padrão. Garantir que a centrífuga não arrefeça abaixo de 20 ° C.

## C) Procedimento

### Passo 01.

Coletar células de acordo com o passo 1a ou 1b:

#### 1a) Células cultivadas em suspensão (não utilizar mais de $1 \times 10^7$ células):

Determine o número de células. Separe o número apropriado de células por centrifugação durante 5 min a 300 x g num tubo de centrífuga (não fornecido). Cuidadosamente remova todo o sobrenadante por aspiração e prosseguir para o passo 2.

Nota: A remoção incompleta do meio de cultura celular inibirá a lise e o lisado, afetando as condições de ligação do RNA à membrana RNeasy. Ambos os efeitos podem reduzir o rendimento de RNA.

#### 1b) As células cultivadas numa monocamada (não utilizar mais de $1 \times 10^7$ células):

As células podem ser lisadas diretamente no vaso de cultura celular (até 10 cm de diâmetro) ou serem tripsinizadas e serem recolhidas como um sedimento celular antes da lise.

As células cultivadas em cultura celular devem ser sempre tripsinizados.

##### 1.1 Para lisar células diretamente:

Determine o número de células. Aspirar completamente o meio de cultura celular e prossiga imediatamente para o passo 2.

Nota: A remoção incompleta do meio de cultura celular inibirá a lise e o Lisado, afetando as condições de ligação do RNA à membrana RNeasy. Ambos os efeitos podem reduzir o rendimento de RNA.

##### 1.2 Para tripsinizar e recolher células:

Determinar o número de células. Aspirar o meio e lavar as células com PBS. Aspirar o PBS, e adicionar 0,1-0,25% de tripsina em PBS.

Depois que as células forem lisadas adicione o meio (contendo soro para inativar a tripsina), e transfira as células para um tubo de centrifugação de vidro ou polipropileno sem RNase (não fornecido), centrifugar a 300 x g durante 5 min. Aspirar completamente o sobrenadante e Avance para o passo 2.

Nota: A remoção incompleta do meio de cultura celular inibirá a lise e Lisado, afetando as condições de ligação do RNA à membrana RNeasy. Ambos os efeitos podem reduzir o rendimento de RNA.

### Passo 02.

Rompa as células adicionando Buffer RLT.

Para as células peletizadas, solte a pastilha de células cuidadosamente, movendo o tubo. Adicione o Volume apropriado de Tampão RLT (ver Tabela 5). Vórtex ou pipeta para misturar, e proceder para o passo 3.

Nota: O afrouxamento incompleto do sedimento celular pode levar a lise ineficiente e Rendimentos reduzidos de RNA.

**Tabela 5.** Volume de tampão RLT para células lisadas.

Número de Células	Volume do tampão RLT (uL)
$5 \times 10^6$	350
$5 \times 10^{-1} \times 10^7$	600

Para a lise direta de células cultivadas em uma monocamada, adicionar o volume apropriado de Tampão RLT (ver Tabela 6) ao disco de cultura celular. Pipetar o lisado num tubo de microcentrífuga (não fornecido). Vórtex ou pipeta para misturar e certifique-se de que nenhum agrupamento de células esteja visível antes de prosseguir para o passo 3.

**Tabela 6.** Volumes de Tampão RLT para lise celular direta de células cultivadas em uma monocamada.

Diametro do prato(cm)	Volume do tampão RLT (uL)
<6	350
6 – 10	600

\* Independentemente do número de células, use os volumes de tampão indicados para cobrir completamente a superfície do prato.

### Passo 03.

Homogeneizar o lisado de acordo com o passo 3a, 3b ou 3c.

3a) Pipetar o lisado diretamente em uma coluna de centrifugação QIAshredder colocada em um tubo coletor de 2 ml, e centrifugue por 2 min em velocidade máxima. Prossiga para o passo 4.

3b) Homogeneizar o lisado durante 30 s utilizando um homogeneizador rotor-estator. Continuar para Passo 4.

3c) Passar o lisado pelo menos 5 vezes através de uma agulha romba de calibre 20 (0,9 mm de diâmetro) ajustado a uma seringa sem RNase. Prossiga para o passo 4.

Se o processamento  $\leq 1 \times 10^5$  células, homogeneizar por vórtex durante 1 min. Após homogeneização, prossiga para o passo 4.

Nota: A homogeneização incompleta pode causar o entupimento da coluna de rotação Rneasy, o que compromete a quantidade de RNA extraído. Portanto, a homogeneização com um rotor-estator ou homogeneizador QIAshredder geralmente resulta em melhores rendimentos com uma seringa e uma agulha.

### Passo 04.

Adicionar 1 volume de etanol a 70% ao lisado homogeneizado e misturar bem por pipetagem. Não centrifugar.

Nota 01: O volume de lisado pode ser inferior a 350  $\mu$ l ou 600  $\mu$ l devido à perda durante a homogeneização.

Nota 02: Quando se purifica o RNA de certas linhas celulares, os precipitados podem ser visíveis durante a adição de etanol. Isso não afeta o procedimento.

**Passo 05.**

Transferir até 700 µl da amostra, incluindo qualquer precipitado que possa ter formado, a uma coluna de rotação RNeasy colocada num tubo coletor de 2 ml (fornecido). Fechar ligeiramente a tampa e centrifugue durante 15 s a  $\geq 8000$  xg ( $\geq 10\ 000$  rpm). Descarte o sobrenadante.

Nota: Reutilize o tubo coletor na etapa 6. Se o volume da amostra exceder 700 µl, centrifugar as alíquotas sucessivas na coluna de rotação RNeasy. Rejeitar o sobrenadante após cada centrifugação.

**Passo 06.**

Adicionar 700 µl de Tampão RW1 à coluna de rotação RNeasy. Feche cuidadosamente a tampa e centrifugue durante 15 s a  $\geq 8000$  xg ( $\geq 10\ 000$  rpm) para lavar a coluna de rotação membrana. Descarte o sobrenadante.

\* Reutilizar o tubo coletor no passo 7.

Nota: Após centrifugação, retire cuidadosamente a coluna de rotação RNeasy do tubo coletor de modo que a coluna não tenha contato com o fluxo. Tenha certeza de esvaziar completamente o tubo coletor.

**Passo 07.**

Adicionar 500 µl de Tampão RPE à coluna de rotação RNeasy. Feche cuidadosamente a tampa e centrifugue durante 15 s a  $\geq 8000$  xg ( $\geq 10\ 000$  rpm), passar pela coluna de rotação da membrana. Descarte o sobrenadante.

\*Reutilize o tubo coletor na etapa 8.

Nota: O tampão RPE é fornecido como um concentrado. Certifique-se de que o etanol foi adicionado ao Tampão RPE antes de usar (veja "Coisas a fazer antes de iniciar").

**Passo 08.**

Adicionar 500 µl de Tampão RPE à coluna de rotação RNeasy. Feche cuidadosamente a tampa e centrifugue durante 2 min a  $\geq 8000$  xg ( $\geq 10\ 000$  rpm) para lavar a membrana da coluna de rotação.

A centrifugação longa seca a membrana da coluna de rotação, assegurando que não haja etanol juntamente ao RNA durante sua eluição. O etanol residual pode interferir em reações posteriores.

Nota: Após a centrifugação, retire cuidadosamente a coluna de rotação RNeasy do tubo coletor de modo a que a coluna não contate o fluxo.

**Passo 09.**

\*Opcional: Coloque a coluna de rotação RNeasy em um novo tubo coletor de 2 ml (fornecido) e descarte o tubo de coleta antigo com o sobrenadante. Feche cuidadosamente a tampa e centrifugue a velocidade máxima durante 1 min.

Execute este passo para eliminar qualquer possível transição do Tampão RPE, ou seus resíduos. O sobrenadante permanece no lado de fora da coluna de rotação RNeasy após o passo 8.

**Passo 10.**

Coloque a coluna de rotação RNeasy em um novo tubo coletor de 1,5 ml (fornecido). Adicionar 30-50 µl de água isenta de RNase diretamente para a membrana da coluna de rotação. Feche a tampa suavemente e centrifugue durante 1 min a  $\geq 8000$  xg ( $\geq 10\ 000$  rpm) para eluir o RNA.

**Passo 11.**

Se o rendimento de RNA esperado for  $> 30 \mu\text{g}$ , repita o passo 10 utilizando outro 30-50  $\mu\text{l}$  de água isenta de RNase, ou utilizando o eluído do passo 10 (se for necessária uma concentração elevada de ARN). Reutilize o tubo coletor da etapa 10.

Nota: Se utilizar o eluído do passo 10, o rendimento de ARN será 15-30% menor do que o obtido usando um segundo volume.

## **Anexo B** Protocolo Rápido do Kit comercial de Purificação Wizard® SV Gel e PCR Clean-Up System (Promega)

### Fatia de Gel e Preparação do Produto de PCR.

#### **A) Dissolução da Fatia de Gel**

- 1) Após a eletroforese, retire a fita de DNA do gel e coloque a fatia de gel em tubo de 1,5 ml de microcentrífuga.
- 2). Adicionar 10 µl de solução de ligação à membrana por cada 10 mg de fatia de gel. Vórtex e incubar a 50-65 ° C até que a fatia de gel seja completamente dissolvida.

#### **B) Processamento de ampliações de PCR**

1. Adicionar um volume igual de solução de ligação à membrana à amplificação por PCR.

#### **C) Ligação de DNA**

1. Insira SV mini coluna no tubo de coleta.
2. Transferir a mistura de gel dissolvido ou o produto de PCR preparado para a mini coluna montada. Incubar a temperatura ambiente durante 1 minuto.
3. Centrifugue a 16.000 ×g durante 1 minuto. Descarte o sobrenadante e reinsira a mini coluna no tubo da coleta.
4. Adicione 700 µl de solução de lavagem de membrana (etanol adicionado). Centrifugue a 16000 ×g durante 1 minuto. Descarte o sobrenadante e reinsira a mini coluna no tubo coletor.
5. Repita o passo 4 com 500 µl de solução de lavagem de membrana. Centrifugue a 16000 × g durante 5 minutos.
6. Esvazie o tubo de coleta e recentrifugue o conjunto da coluna durante 1 minuto, com a tampa da micro centrífuga aberta (ou desligada) para permitir a evaporação de qualquer resíduo etanol
7. Transfira cuidadosamente a mini coluna para um tubo de micro centrífuga limpo de 1,5 ml.
8. Adicionar 50 µl de de solução de lavagem de membrana à mini coluna. Incube na sala durante 1 minuto. Centrifugue a 16000 xg durante 1 minuto.
9. Descarte a mini coluna e armazene o DNA a 4 ° C ou -20 ° C.

## Anexo C Quantificação das amostras

Origem	Órgão	Amostra	RNA	A260 (Abs)	A280 (Abs)	260/280	260/230
Lidice	Rim	55	126,6	3,166	1,645	1,92	0,84
Lidice	Rim	56	482,1	12,053	6,101	1,98	1,62
Lidice	Rim	57	494,2	12,356	6,271	1,97	1,47
Lidice	Rim	58	297,5	7,439	3,781	1,97	1,3
Lidice	Rim	59	179,3	4,483	2,339	1,92	1,33
Lidice	Rim	60	222,4	5,559	2,905	1,91	1,85
Lidice	Rim	61	218,1	5,453	2,833	1,92	1,69
Lidice	Rim	62	305,3	7,631	3,869	1,97	1,31
Lidice	Rim	63	138,9	3,473	1,827	1,90	1,38
Lidice	Rim	64	184,8	4,621	2,387	1,94	0,5
Lidice	Traqueia	55	245,9	6,147	3,162	1,94	0,84
Lidice	Traqueia	56	930,1	23,252	11,791	1,97	1,72
Lidice	Traqueia	57	243,6	6,09	3,148	1,93	1,32
Lidice	Traqueia	58	210,5	5,262	2,626	2,00	1,19
Lidice	Traqueia	59	83,6	2,09	1,102	1,90	0,68
Lidice	Traqueia	60	693,3	17,332	8,854	1,96	1,65
Lidice	Traqueia	61	231,3	5,781	2,956	1,96	1,27
Lidice	Traqueia	62	533,1	13,328	6,958	1,92	1,16
Lidice	Traqueia	63	624,9	15,623	8,036	1,94	0,98
Lidice	Traqueia	64	1018	25,449	13,087	1,94	1,54
Macaé	Rim	301	126,2	3,156	1,683	1,88	0,41
Macaé	Rim	302	293,9	7,348	3,774	1,95	1,09
Macaé	Rim	303	185,9	4,647	2,364	1,97	0,59
Macaé	Rim	304	743,5	18,588	9,173	2,03	1,24
Macaé	Rim	305	239	5,976	3,085	1,94	0,66
Macaé	Rim	306	320,6	8,015	3,962	2,02	1,09
Macaé	Rim	307	291,7	7,293	3,76	1,94	0,58
Macaé	Rim	308	581,9	14,548	7,396	1,97	1,16
Macaé	Rim	309	586,7	14,668	7,527	1,95	1,15
Macaé	Rim	310	661,4	16,534	9,823	1,68	0,71
Macaé	Rim	311	290,7	7,266	3,768	1,93	0,89
Macaé	Traqueia	300	72,3	1,808	0,967	1,87	0,34
Macaé	Traqueia	301	353,3	8,831	4,511	1,96	1,11
Macaé	Traqueia	302	365,6	9,141	4,703	1,94	0,63
Macaé	Traqueia	303	155,6	3,889	2,023	1,92	0,99
Macaé	Traqueia	304	271	6,775	3,444	1,97	0,83
Macaé	Traqueia	305	75,7	1,893	0,997	1,90	0,28
Macaé	Traqueia	306	158,9	3,973	2,057	1,93	0,91
Macaé	Traqueia	307	110,7	2,768	1,397	1,98	0,45
Macaé	Traqueia	308	249,3	6,233	3,193	1,95	0,74
Macaé	Traqueia	309	185,6	4,639	2,393	1,94	0,67
Macaé	Traqueia	310	667,5	16,687	8,504	1,96	1,44
Macaé	Traqueia	311	675,4	16,135	8,628	1,87	1,46
Macaé	Traqueia	312	355,6	9,131	4,713	1,94	0,63
Macaé	Intestino	307	212,8	5,319	2,777	1,92	0,74
Macaé	Intestino	308	251,9	6,296	3,244	1,94	0,81
Macaé	Intestino	309	319,6	7,99	4,153	1,92	1,53
Macaé	Intestino	310	105,7	2,643	1,395	1,89	1,02

Macaé	Intestino	311	54	1,35	0,727	1,86	0,16
Macaé	Intestino	312	116	2,899	1,517	1,91	0,38
Macaé	Intestino	300	296,5	7,413	3,72	1,99	1,05
Macaé	Intestino	301	264,7	6,617	3,323	1,99	0,67
Macaé	Intestino	302	268,9	6,723	3,38	1,99	0,67
Macaé	Intestino	303	209,5	5,238	2,638	1,99	0,5
Macaé	Intestino	304	241	6,024	3,056	1,97	0,45
Macaé	Intestino	305	209,5	5,238	2,638	1,99	0,5
Macaé	Intestino	306	370,3	9,256	4,608	2,01	0,67
Passa Tres	Rim	170	290,5	7,263	3,843	1,89	1,94
Passa Tres	Rim	171	115,2	2,88	1,582	1,82	1,03
Passa Tres	Rim	172	249,3	6,232	3,273	1,90	1,44
Passa Tres	Rim	173	141,2	3,53	1,877	1,88	0,32
Passa Tres	Rim	174	393,7	9,842	4,977	1,98	1,26
Passa Tres	Rim	175	312,6	7,816	3,927	1,99	1,47
Passa Tres	Rim	176	123,9	3,098	1,59	1,95	0,76
Passa Tres	Rim	177	614,7	15,369	7,741	1,99	1,85
Passa Tres	Rim	178	229,8	5,745	2,931	1,96	1,29
Passa Tres	Rim	179	301,8	7,544	3,658	2,06	0,9
Passa Tres	Traqueia	170	358,4	8,961	4,596	1,95	1,11
Passa Tres	Traqueia	171	371,8	9,296	4,769	1,95	0,7
Passa Tres	Traqueia	172	161,2	4,03	2,1	1,92	1,01
Passa Tres	Traqueia	173	275,3	6,883	3,498	1,97	0,84
Passa Tres	Traqueia	174	634,5	15,863	8,215	1,93	1,14
Passa Tres	Traqueia	175	170,4	4,261	2,203	1,93	0,96
Passa Tres	Traqueia	176	111,9	2,799	1,421	1,97	0,46
Passa Tres	Traqueia	177	251,2	6,279	3,206	1,96	0,75
Passa Tres	Traqueia	178	187	4,674	2,407	1,94	0,67
Passa Tres	Traqueia	179	424,7	10,616	5,458	1,95	1,24
Passa Tres	Intestino	170	1239	30,974	15,561	1,99	1,87
Passa Tres	Intestino	171	721,4	18,036	9,207	1,96	1,47
Passa Tres	Intestino	172	771,8	19,294	9,87	1,95	1,51
Passa Tres	Intestino	173	1741,9	43,547	21,931	1,99	1,91
Passa Tres	Intestino	174	685,4	17,135	8,628	1,99	1,46
Passa Tres	Intestino	175	324,8	8,12	3,922	2,07	0,64
Passa Tres	Intestino	176	148,2	3,706	1,812	2,05	0,36
Passa Tres	Intestino	177	225,8	5,646	2,883	1,96	1,71
Passa Tres	Intestino	178	114	2,85	1,483	1,92	0,23
Passa Tres	Intestino	179	238,4	5,96	2,843	2,10	1,06
Vargem Alegre	Rim	154	457,3	11,432	5,885	1,94	1,81
Vargem Alegre	Rim	155	355,5	8,887	4,468	1,99	0,96
Vargem Alegre	Rim	156	395,7	9,893	4,964	1,99	1,84
Vargem Alegre	Rim	157	157,6	3,94	1,979	1,99	1,07
Vargem Alegre	Rim	159	475,4	11,885	5,987	1,99	1,07
Vargem Alegre	Rim	160	135,7	3,393	1,747	1,94	0,72
Vargem Alegre	Rim	151	348,2	8,704	4,444	1,96	1,37
Vargem Alegre	Rim	161	407,2	10,179	5,177	1,97	1,84
Vargem Alegre	Rim	152	260,1	6,503	3,38	1,92	0,71
Vargem Alegre	Rim	153	154,5	3,864	2,01	1,92	0,81
Vargem Alegre	Traqueia	151	135,6	3,39	1,791	1,89	0,7
Vargem Alegre	Traqueia	152	185,2	4,629	2,392	1,94	1,03

Vargem Alegre	Traqueia	153	401,6	10,039	5,117	1,96	0,86
Vargem Alegre	Traqueia	154	400,1	10,002	5,119	1,95	1,26
Vargem Alegre	Traqueia	155	180,8	4,52	2,348	1,93	0,8
Vargem Alegre	Traqueia	156	339,4	8,484	4,345	1,95	0,72
Vargem Alegre	Traqueia	157	163,5	4,086	2,104	1,94	0,75
Vargem Alegre	Traqueia	158	135,2	3,379	1,757	1,92	0,64
Vargem Alegre	Traqueia	159	244,9	6,122	3,142	1,95	0,64
Vargem Alegre	Traqueia	160	379,7	9,494	4,856	1,96	0,97
Vargem Alegre	Intestino	156	323,1	8,079	4,076	1,98	1,5
Vargem Alegre	Intestino	157	132,9	3,322	1,67	1,99	0,4
Vargem Alegre	Intestino	158	304	7,6	3,849	1,97	1,44
Vargem Alegre	Intestino	159	61	1,525	0,826	1,85	0,64
Vargem Alegre	Intestino	163	283	7,074	3,727	1,90	0,59
Vargem Alegre	Intestino	164	220,4	5,509	2,879	1,91	0,96
Vargem Alegre	Intestino	165	144,7	3,617	1,977	1,83	0,96
Vargem Alegre	Intestino	166	261,1	6,527	3,412	1,91	1,1
Vargem Alegre	Intestino	167	348,5	8,712	4,333	2,01	1,01
Vargem Alegre	Intestino	168	273,2	6,83	3,591	1,90	0,93

**Anexo D** Resultado do RT-qPCR realizado nesse estudo e baseado em Callison et al (2006). Observa-se o número da amostra, a localização da granja, o status (positivo/negativo) e o status da ave, sendo 1 para aves positivas em todos os sistemas fisiológicos testados, 0 para aves que são positivas em pelo menos um órgão, e 2 para aves completamente negativas.

<b>Amostra - Granja</b>	<b>Órgão</b>	<b>Status</b>	<b>Status ave</b>
055 - Lidice	Rim	Positivo	1
055 - Lidice	Traqueia	Positivo	
056 - Lidice	Rim	Negativo	0
056 - Lidice	Traqueia	Positivo	
057 - Lidice	Rim	Positivo	1
057 - Lidice	Traqueia	Positivo	
058 - Lidice	Rim	Positivo	0
058 - Lidice	Traqueia	Negativo	
059 - Lidice	Rim	Positivo	1
059 - Lidice	Traqueia	Positivo	
060 - Lidice	Rim	Negativo	0
060 - Lidice	Traqueia	Positivo	
061 - Lidice	Rim	Negativo	0
061 - Lidice	Traqueia	Positivo	
062 - Lidice	Rim	Negativo	0
062 - Lidice	Traqueia	Positivo	
063 - Lidice	Rim	Positivo	1
063 - Lidice	Traqueia	Positivo	
064 - Lidice	Rim	Negativo	2
064 - Lidice	Traqueia	Negativo	
151 - Vargem Alegre	Rim	Negativo	0
151 - Vargem Alegre	Traqueia	Positivo	
152 - Vargem Alegre	Rim	Positivo	1
152 - Vargem Alegre	Traqueia	Positivo	
153 - Vargem Alegre	Rim	Positivo	1
153 - Vargem Alegre	Traqueia	Positivo	
154 - Vargem Alegre	Rim	Positivo	1
154 - Vargem Alegre	Traqueia	Positivo	
155 - Vargem Alegre	Rim	Positivo	1
155 - Vargem Alegre	Traqueia	Positivo	
156 - Vargem Alegre	Rim	Positivo	1
156 - Vargem Alegre	Traqueia	Positivo	
156 - Vargem Alegre	Intestino	Positivo	

---

157 - Vargem Alegre	Rim	Positivo	
157 - Vargem Alegre	Traqueia	Positivo	1
157 - Vargem Alegre	Intestino	Positivo	
158 - Vargem Alegre	Traqueia	Negativo	
158 - Vargem Alegre	Intestino	Positivo	0
159 - Vargem Alegre	Rim	Positivo	
159 - Vargem Alegre	Traqueia	Positivo	1
159 - Vargem Alegre	Intestino	Positivo	
160 - Vargem Alegre	Rim	Negativo	
160 - Vargem Alegre	Traqueia	Positivo	0
161 - Vargem Alegre	Rim	Positivo	1
163 - Vargem Alegre	Intestino	Positivo	1
164 - Vargem Alegre	Intestino	Positivo	1
165 - Vargem Alegre	Intestino	Positivo	1
166 - Vargem Alegre	Intestino	Positivo	1
167 - Vargem Alegre	Intestino	Positivo	1
168 - Vargem Alegre	Intestino	Negativo	0
170 - Passa Três	Traqueia	Positivo	
170 - Passa Três	Intestino	Positivo	1
170 - Passa Três	Rim	Positivo	
171 - Passa Três	Traqueia	Positivo	
171 - Passa Três	Intestino	Positivo	1
171 - Passa Três	Rim	Positivo	
172 - Passa Três	Traqueia	Positivo	
172 - Passa Três	Intestino	Positivo	1
172 - Passa Três	Rim	Positivo	
173 - Passa Três	Traqueia	Positivo	
173 - Passa Três	Intestino	Positivo	1
173 - Passa Três	Rim	Positivo	
174 - Passa Três	Traqueia	Positivo	
174 - Passa Três	Intestino	Positivo	1
174 - Passa Três	Rim	Positivo	
175 - Passa Três	Traqueia	Positivo	
175 - Passa Três	Intestino	Positivo	1
175 - Passa Três	Rim	Positivo	
176 - Passa Três	Traqueia	Positivo	
176 - Passa Três	Intestino	Positivo	1

---

---

176 - Passa Três	Rim	Positivo	
177 - Passa Três	Traqueia	Positivo	
177 - Passa Três	Intestino	Positivo	1
177 - Passa Três	Rim	Positivo	
178 - Passa Três	Traqueia	Positivo	
178 - Passa Três	Intestino	Negativo	0
178 - Passa Três	Rim	Negativo	
179 - Passa Três	Traqueia	Positivo	
179 - Passa Três	Intestino	Positivo	0
179 - Passa Três	Rim	Negativo	
300 - Macaé	Intestino	Negativo	2
300 - Macaé	Traqueia	Negativo	
301 - Macaé	Intestino	Negativo	
301 - Macaé	Traqueia	Negativo	2
301 - Macaé	Rim	Negativo	
302 - Macaé	Intestino	Positivo	
302 - Macaé	Traqueia	Positivo	0
302 - Macaé	Rim	Negativo	
303 - Macaé	Intestino	Positivo	
303 - Macaé	Traqueia	Positivo	0
303 - Macaé	Rim	Negativo	
304 - Macaé	Intestino	Positivo	
304 - Macaé	Traqueia	Positivo	0
304 - Macaé	Rim	Negativo	
305 - Macaé	Intestino	Negativo	
305 - Macaé	Traqueia	Positivo	0
305 - Macaé	Rim	Negativo	
306 - Macaé	Intestino	Positivo	
306 - Macaé	Traqueia	Positivo	0
306 - Macaé	Rim	Negativo	
307 - Macaé	Rim	Positivo	
307 - Macaé	Intestino	Negativo	0
307 - Macaé	Traqueia	Negativo	
308 - Macaé	Rim	Positivo	
308 - Macaé	Intestino	Negativo	0
308 - Macaé	Traqueia	Negativo	
309 - Macaé	Rim	Positivo	0

---

---

309 - Macaé	Intestino	Negativo	
309 - Macaé	Traqueia	Negativo	
310 - Macaé	Rim	Positivo	
310 - Macaé	Intestino	Negativo	0
310 - Macaé	Traqueia	Negativo	
311 - Macaé	Rim	Positivo	
311 - Macaé	Intestino	Negativo	0
311 - Macaé	Traqueia	Negativo	
312 - Macaé	Intestino	Negativo	2
312 - Macaé	Traqueia	Negativo	

---