



UNICAMP



***PNEUMOVIRUS AVIÁRIO (PVA):
DETECÇÃO POR RT-PCR QUIMIOLUMINESCENTE E
CARACTERIZAÇÃO DOS ISOLADOS BRASILEIROS POR
ANÁLISE COM ENZIMAS DE RESTRIÇÃO E
SEQÜENCIAMENTO***

Maria Ângela Gomes de Castro Dani

Dissertação apresentada ao Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Biologia da Universidade de Campinas para obtenção do título de mestre em Ciências Biológicas na Área de Microbiologia

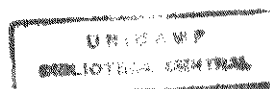
9818480

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida pelo(a) candidato a)
<i>Maria Ângela Gomes de Castro Dani</i>
e aprovada pela Comissão Julgadora

22/06/98

Orientadora: Prof. Dra. Clarice Weis Arns

Campinas, 22 de Junho de 1998.



UNIDADE	BC
N.º CHAMADA:	TI UNICAMP
	D22p
V.	EX
TOMBO BC/	35014
PROC.	395/98
C	☐
D	☒
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	11/09/98
N.º CPD	

CM-00115939-7

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP**

D22p **Dani, Maria Ângela Gomes de Castro.**

Pneumovírus aviário (PVA): detecção por RT-PCR quimioluminescente e caracterização dos isolados brasileiros por análise com enzimas de restrição e sequenciamento / Maria Ângela Gomes de Castro Dani.--
Campinas, SP: [s.n.], 1998.
71f: illus.

Orientadora: Clarice Weis Arns
Co-orientador: Edison Luiz Durigon
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas,
Instituto de Biologia.

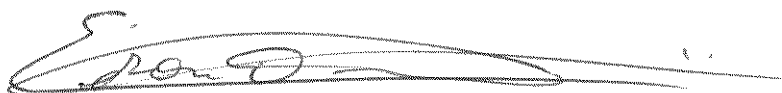
1. Virologia. 2. Biologia molecular. 3. Reação em cadeia de polimerase.
I. Arns, Clarice Weis. II. Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia. III. Título.

Campinas, 22 de junho de 1998.

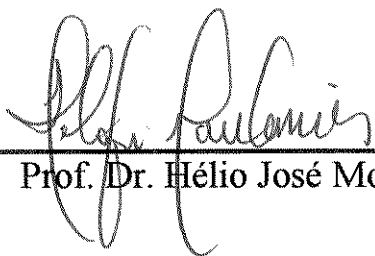
Banca Examinadora



Prof. Dra. Clarice Weis Arns



Prof. Dr. Edison Luiz Durigon



Prof. Dr. Hélio José Montasssier

Suplente

Prof. Dr. Antônio Fernando Pestana de Castro

Aos
meus pais,
Fernando e Terezinha
e meu marido,
Sergio,
pertencem esta tese.

O presente trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Virologia do Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Biologia da UNICAMP, Campinas, São Paulo, em colaboração com o Laboratório de Virologia do Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas-USP, São Paulo, e Laboratório de Genética de Câncer do Instituto Ludwig de Pesquisa sobre o Câncer, São Paulo.

Sumário**Agradecimentos**

7

Abstract

8

Resumo

9

Lista de abreviaturas e sinônimos

10

Introdução

11

Objetivos

16

1. Material e Métodos

17

1.1. Vírus e células

17

1.2. Propagação viral

18

1.3. Determinação do título infectante viral

19

1.4. Extração de RNA viral

20

1.5. RT-PCR

21

1.6. RT-PCR quimioluminescente

28

1.7. Análise com enzimas de restrição

28

1.8. Eletroforese

30

1.9. Transferência para membrana de nylon

30

1.10. Southern blot quimioluminescente

31

1.11. PCR de diluição limitante

31

1.12. Clonagem e seqüenciamento

32

	6
2. Resultados	37
3. Discussão	55
4. Conclusão	57
Referências	59
Apêndice	67

Agradecimentos

À Prof. Dra. Clarice Weis Arns, pela confiança depositada desde a elaboração do projeto de tese.

Ao Prof. Dr. Edison Durigon, pela orientação e críticas durante a realização da tese em seu Laboratório de Virologia, Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biomédicas da USP, no qual foram realizadas as técnicas de RT-PCR, nPCR e RT-PCR quimioluminescente.

Ao Dr. Andrew J. G. Simpson, chefe do Laboratório de Genética do Câncer do Instituto Ludwig para Pesquisa sobre o Câncer, Laboratório no qual foram realizadas as técnicas de análise com enzimas de restrição, clonagem e seqüenciamento dos isolados brasileiros.

Ao meu marido, Sergio Ulhoa Dani, pela orientação e críticas durante o desenvolvimento da tese.

À minha mãe, Terezinha Aparecida Martins Gomes de Castro pelo constante apoio e incentivo.

Aos colegas do Instituto Ludwig: Elisângela Monteiro, pelo seqüenciamento dos isolados, Ricardo Garcia Correa, pelo auxílio durante a técnica transformação e pela cessão de células competentes, e ao Sr. Lionel Conrado, pelos trabalhos de fotografia.

À FAPESP, pela concessão de uma bolsa de mestrado para execução deste trabalho.

Abstract

Dani, M.A.G.C. (1998) Pneumovírus Aviário (PVA): detecção por RT-PCR quimioluminescente e caracterização dos isolados brasileiros por análise com enzimas de restrição e sequenciamento. Tese de Mestrado, Departamento de Microbiologia e Imunologia, Instituto de Biologia, UNICAMP, República Federativa do Brasil.

Keywords: virology, polymerase chain reaction, molecular biology.

Avian Pneumovirus (APV) causes an acute respiratory tract infection both in turkeys (turkey rhinotracheitis) and chicken (swollen head syndrome) with sudden onset and rapid spread through the flocks. In this study, immunochemiluminescent Southern blot RT-PCR assay was employed to detect a F gene transcript of the avian pneumovirus (APV) in two European turkey isolates and two Brazilian chicken isolates. Limiting dilution PCR was performed to compare the sensitivity of immunochemiluminescent Southern blot assay and nested PCR (nPCR) assay. The sensitivity and specificity of immunochemiluminescent Southern blot RT-PCR assay were comparable to that of nPCR, and at least 100 fold more sensitive than a single PCR amplification. Sequence analysis of the 175 bp product of the F gene revealed 100% identity with earlier reported PVA sequences. We characterized the Brazilian isolates using restriction analysis and sequencing of a 600 bp fragment of the G gene and conclude that the isolates belong to the APV subgroup A.

Resumo

O Pneumovírus aviário (PVA) causa infecção aguda no trato respiratório em perus (rinotraqueíte dos perus) e galinhas (síndrome da cabeça inchada) com início abrupto e disseminação rápida. Neste estudo, foi padronizada a reação de RT-PCR quimioluminescente para detecção de um transcrito do gene F do PVA em dois isolados europeus e dois isolados brasileiros. Foram realizadas PCRs de diluição limitante utilizando-se RT-PCR quimioluminescente e “nested PCR” (nPCR) para a comparação quanto à sensibilidade e especificidade entre as metodologias na detecção de PVA. A sensibilidade e especificidade da RT-PCR quimioluminescente foram semelhantes às da nPCR e 100 vezes mais sensível que uma única PCR. O seqüenciamento dos produtos de 175 pb do gene F revelaram 100% de homologia com seqüências depositadas no banco de dados. Em seguida foi realizada a caracterização dos isolados brasileiros através de RT-PCR, análise com enzimas de restrição e seqüenciamento automático de um fragmento do gene G. Os produtos de 600 pb correspondentes aos primeiros 600 nucleotídeos do gene G dos isolados SHS BR 119 e SHS BR 121 revelaram 99% de similaridade com 3 isolados do subgrupo A e 87% de similaridade com isolados do subgrupo B depositadas no banco de dados.

Lista de abreviaturas e sinônimos

APS- Persulfato de amônio
pb- pares de bases
cDNA- DNA complementar
DNA- Ácido Desoxiribonucleico
dNTP- Desoxinucleosídeo-trifosfato
CER- célula rude de embrião de galinha
DO- Densidade óptica
ECP- Efeito citopático
EDTA- Ácido etilenodiaminotetracético
ELISA- Ensaio imunoenzimático
MMEE- Meio mínimo essencial de Eagle
mRNA- RNA mensageiro
nPCR- “nested PCR”
PBS- Tampão fosfato
PCR- Reação em cadeia da polimerase
PVA- Pneumovirus aviário
RNA- Ácido ribonucleico
VRSH- Vírus respiratório sincicial humano
RT- Transcrição reversa
SCI- Síndrome da cabeça inchada
SFB- Soro fetal bovino
SPF- “specific pathogen free”
TBE- Tris borato EDTA
TRT- Rinotraqueíte dos perus

Introdução

A rinotraqueíte de perus (TRT) foi primeiramente descrita em 1978, na África do Sul (Buys *et al.*, 1989), e reconhecida logo depois na Europa (McDougall & Cook, 1986). A infecção é causada por um Pneumovírus aviário (PVA) que também infecta galinhas causando a "síndrome da cabeça inchada" (SCI) (O'Brien, 1985). O agente causal foi isolado e mostrou-se similar a membros da família *Paramyxoviridae*, com cadeia única, não segmentada, de RNA de sentido negativo (McDougall & Cook, 1986; Picault *et al.*, 1987; Buys *et al.*, 1989). Os vírions são pleomórficos, embora predomine a forma esférica, com tamanho variando entre 70 a 600 nm de diâmetro. São sensíveis a solventes lipídicos, termolábeis, sem hemaglutininas e neuraminidase (Girauld *et al.*, 1986; Collins *et al.*, 1986; Wieth *et al.*, 1987).

As seqüências das regiões intergênicas derivadas de mRNAs policistrônicos e PCRs obtidas com iniciadores de diferentes genes mostram que a ordem do genoma é 3'F-22K-S-G5". Esta ordem difere da encontrada nos *Paramyxovirus* e *Morbillivirus*, que não possuem o gene 22K, e do vírus respiratório sincicial humano (VRSH) e o vírus da pneumonia de camundongos, que possuem genes F e 22K localizados após o gene G (Ling *et al.*, 1992).

A infecção por PVA foi detectada sorologicamente em diversos países, incluindo África do Sul (Buys, 1980), Israel (Weisman, 1988), França (Drouin *et al.*, 1985), Inglaterra (Wieth *et al.*, 1987), Marrocos (EL Houadfi, 1991), México (Decanini, 1991) e Brasil (Arns & Hafez, 1992); e o vírus foi isolado na Inglaterra (Jones *et al.*, 1987), França (Picault *et al.*, 1987), Alemanha (Hafez, 1992), Brasil (Arns & Hafez, 1995) e Estados Unidos (Nagaraja *et al.*, 1997).

O PVA causa infecção aguda no trato respiratório em perus e em frangos com evolução rápida. Os sinais clínicos são geralmente leves, mas a presença de agentes bacterianos secundários pode agravar o quadro clínico, levando ao óbito. A infecção com o vírus isoladamente resulta em mortalidade de aproximadamente 3% dos casos.

Perda de peso em perus e queda de produção de ovos em galinhas são consequências frequentes da infecção. A gravidade dos sintomas, duração da doença e mortalidade são extremamente variáveis e influenciados por fatores ambientais como: precárias condições de manejo e higiene, alta densidade de aves, ventilação inadequada, alto nível de amônia, e tipo de infecção bacteriana associada (Hafez, 1992). Os sinais clínicos podem ser observados em frangos de corte, poedeiras, matrizes, faisões, galinhas de angola e perus (Gough *et al.*, 1988). Em frangos de corte os sintomas iniciais incluem coriza, conjuntivite e aumento da glândula lacrimal. Após 12 a 24 horas, observa-se edema periocular que progride anteriormente para a face, e caudalmente, para o tecido subcutâneo mandibular (Morley & Thomson, 1984). Aves matrizes apresentam sinais neurológicos caracterizados por torcicolo e movimentos repentinos da cabeça após 72 horas (Morley & Thomson, 1984). A doença afeta estas aves primariamente no pico da postura, ou logo após estas terem entrado em fase de produção. Os sintomas iniciais incluem falhas respiratórias brandas, rinite e conjuntivite, seguidas de torcicolo e opistótono, edema facial uni ou bilateral que progride para toda a cabeça (Hafez & Loehren, 1990; Arns & Hafez, 1992). Estes sintomas são observados em poedeiras, onde também se nota diminuição na qualidade dos ovos (Hafez, 1992) e redução na produção de ovos de 2 a 3% por 1 a 2 semanas (Hafez & Loehren, 1990; Bell & Alexander, 1990).

As perdas econômicas em frangos de corte devido à SCI situam-se em torno de 1% a 3% em condições favoráveis, e 20% a 30% quando ocorrem complicações respiratórias ou infecções

secundárias. Em matrizes e poedeiras a mortalidade fica em torno de 1 a 3%, porém ocorre queda de postura de 1% a 10% durante 2 a 3 semanas e aumento de morte embrionária em incubadoras, em torno de 3% a 10% (Morley & Thomson, 1984; O'Brien, 1985; Bell & Alexander, 1990; Hafez & Loehren, 1990).

O diagnóstico laboratorial do PVA inclui o isolamento em cultivos primários de embrião de galinha (Picault *et al.*, 1987), inoculação em ovos embrionados, e multiplicação em células CER ("chicken embryo rough") (Hafez, 1991). A detecção viral pode ser realizada através das técnicas de imunofluorescência e imunoperoxidase (Baxter *et al.*, 1986). As técnicas de soroneutralização e os ensaios imunoenzimáticos são mais empregados para o diagnóstico do PVA. Os resultados obtidos pelas duas técnicas mostram boa correlação (Picault *et al.*, 1987; Cook *et al.*, 1988; Hafez & Loehren, 1990). O desenvolvimento de ELISA possibilitou a detecção de respostas sorológicas 11 dias após as aves terem sido contaminadas pelo PVA, com sensibilidade de 98,7% e especificidade de 99,5%. As técnicas convencionais utilizadas no estudo da relação antigênica entre isolados de diferentes países indicam uma estreita similaridade entre esses isolados. Entretanto, testes de soroneutralização e ELISA cruzados com soros policlonais e anticorpos monoclonais são capazes de detectar variações entre estes isolados (Collins *et al.*, 1993).

A comparação entre vários isolados europeus de PVA por ELISA e por soroneutralização sugerem que embora eles sejam relacionadas entre si, há uma grande diversidade entre os mesmos (Cook *et al.*, 1993 a/b). Dados posteriores foram obtidos de sete isolados diferentes de PVA de diferentes países europeus. Esses isolados mostraram-se antigenicamente relacionados, mas puderam ser separados em dois grupos distintos. A não relação antigênica detectada nesses ensaios pode ser devida a componentes internos altamente conservados, mas há grandes diferenças entre outras proteínas virais (Collins *et al.*, 1993).

Os dois principais antígenos do PVA são o F ("fusion") e o G ("attachment"). A glicoproteína G é conhecida por ser a proteína mais variável no vírus respiratório sincicial humano (VRSH), o pneumovírus protótipo (Johnson *et al.*, 1987). Dados obtidos por determinação da sequência nucleotídica do gene G de 5 isolados diferentes de PVA obtidos em diferentes países Europeus em diferentes tempos, dos quais 4 são os mesmos estudados por Collins *et al.*, 1993, indicam variação considerável na sequência de aminoácidos da glicoproteína G, evidenciando dois subgrupos distintos (Juhasz & Easton, 1994).

A dedução da sequência de aminoácidos da glicoproteína de fusão do PVA revelou grande identidade com a proteína homóloga do VRSH, e constituiu a primeira evidência baseada em sequência de aminoácidos de que o PVA é um Pneumovírus, o primeiro gênero a ser descrito em aves (YU *et al.*, 1991). A glicoproteína F do PVA tem homologia na sequência de aminoácidos de 39% com a proteína homóloga do VRSH e apenas metade disto com membros dos outros dois gêneros. Ocorre também extensa similaridade de aminoácidos entre as proteínas codificadas pelos genes da Matriz (M) e 22K (ou M2) (Yu *et al.*, 1992), e estruturas conservadas nas proteínas codificadas pelo VRSH (Ling *et al.*, 1992). Uma característica que distingue os pneumovírus humanos dos outros dois gêneros (*Paramyxovírus* e *Morbillivírus*) é a produção de M2, que também ocorre em células infectadas por PVA (Cavanagh & Barret, 1988; Ling & Pringle, 1988, 1989).

O uso da PCR na detecção de PVA em perus e galinhas demonstrou a vantagem de detectar pequenas quantidades de vírus sem a necessidade de outros testes confirmatórios e de testes preliminares. Por ser altamente específica, a PCR não é afetada pela presença de outros patógenos e pode ser de suma importância para caracterização do isolado viral do ponto de vista genético molecular e em estudos epidemiológicos (Jing *et al.*, 1993).

Duas metodologias de nPCR foram descritas para detecção de PVA através da amplificação de fragmentos da glicoproteína F (Jing *et al.*, 1993; Mase *et al.*, 1996). No entanto, nPCR consome muito tempo, possui um alto risco de contaminação e pode gerar resultados falsos positivos. Trabalhos recentes incluem o uso de sondas quimioluminescentes e fluorescentes, que possuem uma série de vantagens sobre metodologias clássicas como nPCR incluindo diminuição do risco de contaminação, aumento da sensibilidade e menor tempo e trabalho (Durigon *et al.*, 1994; Holtke *et al.*, 1992).

Objetivos

- 1- Padronizar as técnicas de nPCR e RT-PCR quimioluminescente para o detecção do gene F de PVA.
- 2- Comparar a sensibilidade e a especificidade das técnicas de nPCR e RT-PCR quimioluminescente.
- 3- Caracterizar os dois isolados brasileiros através de análise com enzimas de restrição e seqüenciamento da região genômica G do PVA.

1. Material e Métodos

1.1. Vírus e Células

Foram utilizados os seguintes isolados de PVA:

- a) **STG 761/88**: isolada de perus com sintomas de rinotraqueíte, no Laboratório Estadual de Stuttgart, Alemanha, após 16 passagens em células CER (“chicken embryo rough”).
- b) **BUT 1=8544**: isolada de perus em cultura de anel traqueal em embrião de galinha SPF (“specific pathogen free”), após várias passagens. Proveniente da "British United Turkeys Ltd" (BUT), Chester, Inglaterra.
- c) **SHS BR 119**: isolada de aves matrizes com SCI após 16 passagens em células CER, previamente adaptada em cultura de anel de traquéia, proveniente do Laboratório de Virologia, Departamento de Microbiologia e Imunologia, Instituto de Biologia, UNICAMP, São Paulo (Arns & Hafez, 1995).
- d) **SHS BR 121**: isolada de aves matrizes com SCI após 18 passagens em células FEG (fibroblasto de embrião de galinha) mais anel de traquéia com passagens simultâneas, proveniente do Laboratório de Virologia, Departamento de Microbiologia e Imunologia, Instituto de Biologia, UNICAMP, Campinas, São Paulo (Arns & Hafez, 1995).

As células CER foram doadas pelo Prof. Dr. H. M. Hafez do Laboratório Estadual de Stuttgart, Alemanha. Estas células parecem resultantes da mistura de célula primária de embrião de galinha com célula renal de Hamster. As células foram cultivadas em garrafas de 75 cm² (Falcon 3023), com 2×10^5 células/ml (concentração inicial), em meio MEM (Meio Mínimo Essencial-Cultilab) com 10% de soro fetal bovino (SFB Sigma Chemical Company), por 48 horas, a 37°C.

Todas as amostras foram adaptadas ao crescimento em células CER após passagens sucessivas. Esta adaptação foi feita por Arns e colaboradores (comunicação pessoal).

1.2. Propagação viral

As amostras virais foram inoculadas em garrafas (Corning) de células CER após formação completa da monocamada celular (aproximadamente 24 horas após tripsinização). Nas garrafas de 175 cm² e de 75 cm² foram adicionados 8,0 ml e 3,0 ml de inóculo por garrafa de cada isolado viral, respectivamente. Desprezou-se o meio antigo de cada garrafa e após lavagem da monocamada celular com meio mínimo essencial de Eagle (MMEE) ou PBS estéril, adicionou-se o inóculo viral. As garrafas foram então incubadas a 37°C. O mesmo procedimento foi realizado para o controle negativo (garrafa controle, sem adição do inóculo). Após 1 hora de incubação completou-se o volume para 30 ml (garrafas de 75 cm²) ou 70 ml (garrafas com 175 cm²) com meio Eagle. Após incubação a 37°C durante 2 a 3 dias [até observação de 70-80% de efeito citopático (ECP)] as garrafas foram congeladas e após alguns dias descongeladas, agitadas e centrifugadas em tubos estéreis durante 15 minutos a 2000 rpm. Após centrifugação, os sobrenadantes foram aliquotados

em frascos de 2.0 ml (Corning) e guardados no freezer (-70°C). Realizou-se sempre a titulação viral para obtenção do título da amostra de cada isolado viral.

1.3. Determinação do título infectante viral

As amostras de PVA foram tituladas em placas de poliestireno de 96 cavidades (Corning). As titulações foram sempre realizadas em duplicata e os títulos (DICT_{50}) calculados pelo método de Reed & Muench (1938). Em cada placa adicionou-se 50 µl de MMEE nas cavidades destinadas à titulação viral e 100 µl nas cavidades destinadas ao controle de células. Foram realizadas diluições de razão constante igual a 10 (10^{-1} a 10^{-6}) de cada isolado viral em tubos de ensaio. Em seguida, foram inoculados 50 µl de cada diluição em cada cavidade da placa de microtitulação no total de 8 cavidades por diluição e adicionados 50 µl de uma suspensão de células CER, previamente tripsinizadas em MMEE com 10% de SFB e 1% de antibiótico, completando um volume final de 100 µl/cavidade. A incubação foi realizada em estufa de atmosfera úmida de CO_2 a 37°C (Forma Scientific) por 5 dias. As leituras foram feitas através da constatação de ECP em microscópio invertido (Carl Zeiss). O Quadro 1 mostra os títulos virais de cada amostra.

QUADRO 1 – Títulos infectantes virais das amostras de PVA após passagens em células CER

Amostra Viral	Título Viral (DICT₅₀)^a
STG 761/88	5,3
BUT 1=8544	4,8
SHS BR 119	5,3
SHS BR 121	5,3

^a Dose infectante de 50% em cultura de tecido (por ml)

1.4. Extração do RNA viral

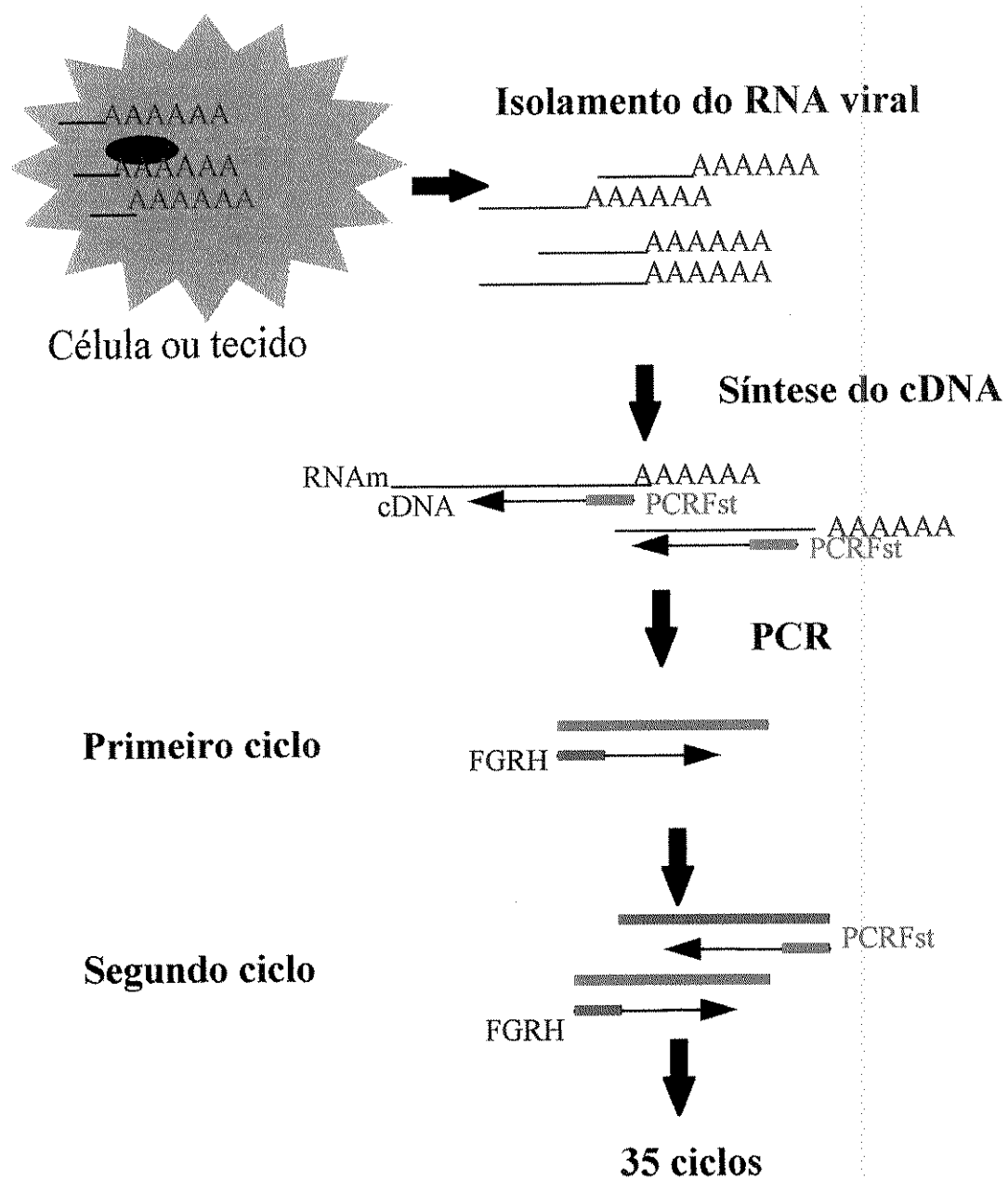
Para cada amostra dos diferentes isolados virais de PVA foi realizado o seguinte procedimento: duas garrafas de 75 cm² (Corning) foram inoculadas com 1 ml de PVA. Após incubação por 24 horas a 37°C (aproximadamente 40% ECP) desprezou-se o meio de cada garrafa, raspou-se a monocamada celular com auxílio de uma pipeta descartável e em um tubo Eppendorf adicionou-se a este raspado 500 µl de tiocianato de guanidina-fenol (Trizol-Gibco BRL) para 10⁷ células. Em seguida foi adicionado 200 µl de clorofórmio e após centrifugação a 12.000 rpm, a 4°C, por 15 minutos, foi separada a fase aquosa contendo o RNA que foi recuperado por precipitação com 500 µl de isopropanol (15 minutos de repouso a 4°C) seguida de centrifugação (12.000 rpm, a 4°C, por 12 minutos). Depois dessa fase foi adicionado ao pellet 800 µl de etanol e após centrifugação a 7.500 rpm a 4°C por 8 minutos, e secagem por evaporação do pellet formado,

este foi resuspendido em 30 µl de EDTA 1mM (pH 7,0) e armazenado a -70°C. Devido à instabilidade do RNA, iniciou-se a síntese do cDNA (transcrição reversa - TR) logo em seguida.

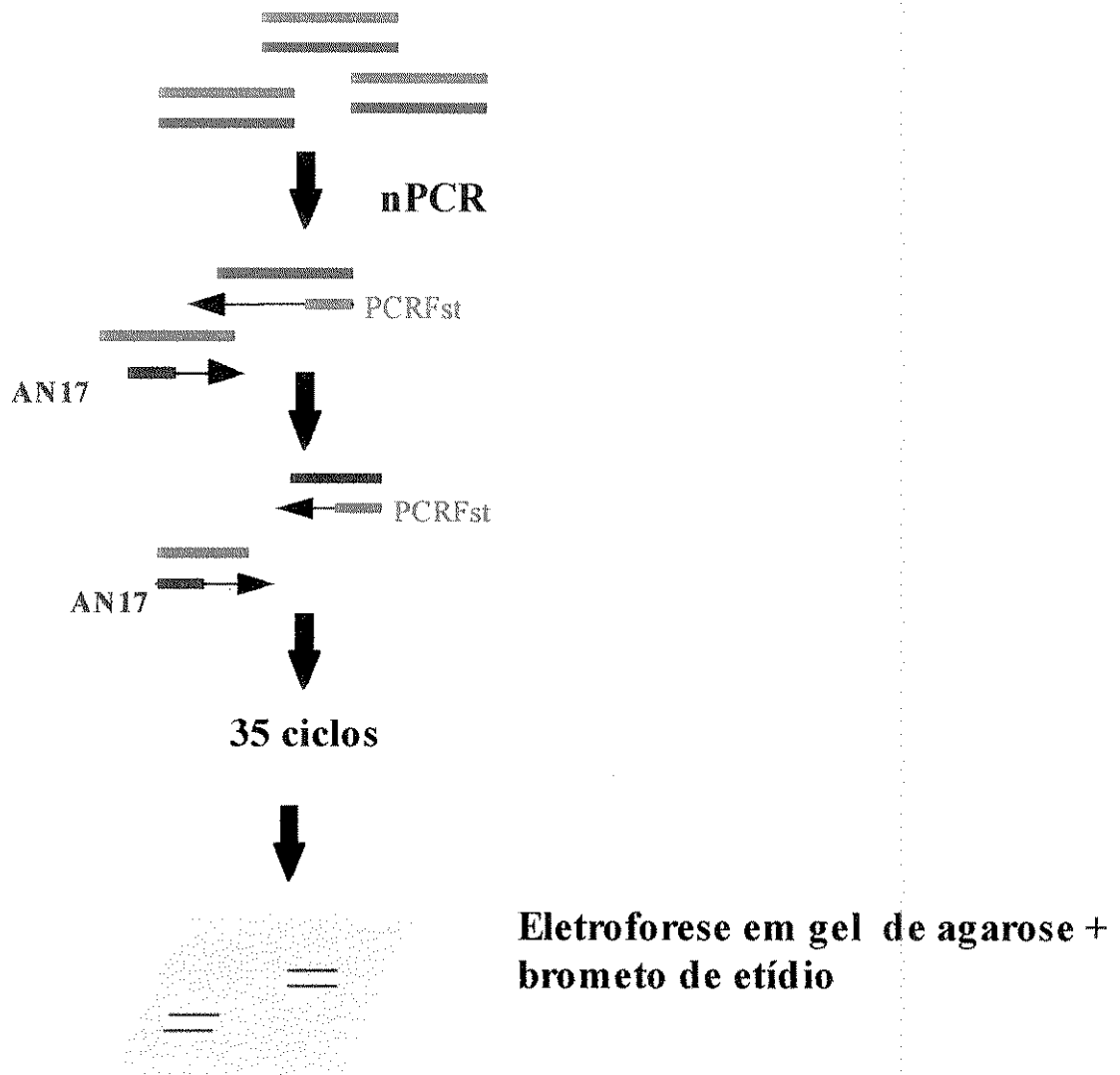
1.5. RT-PCR

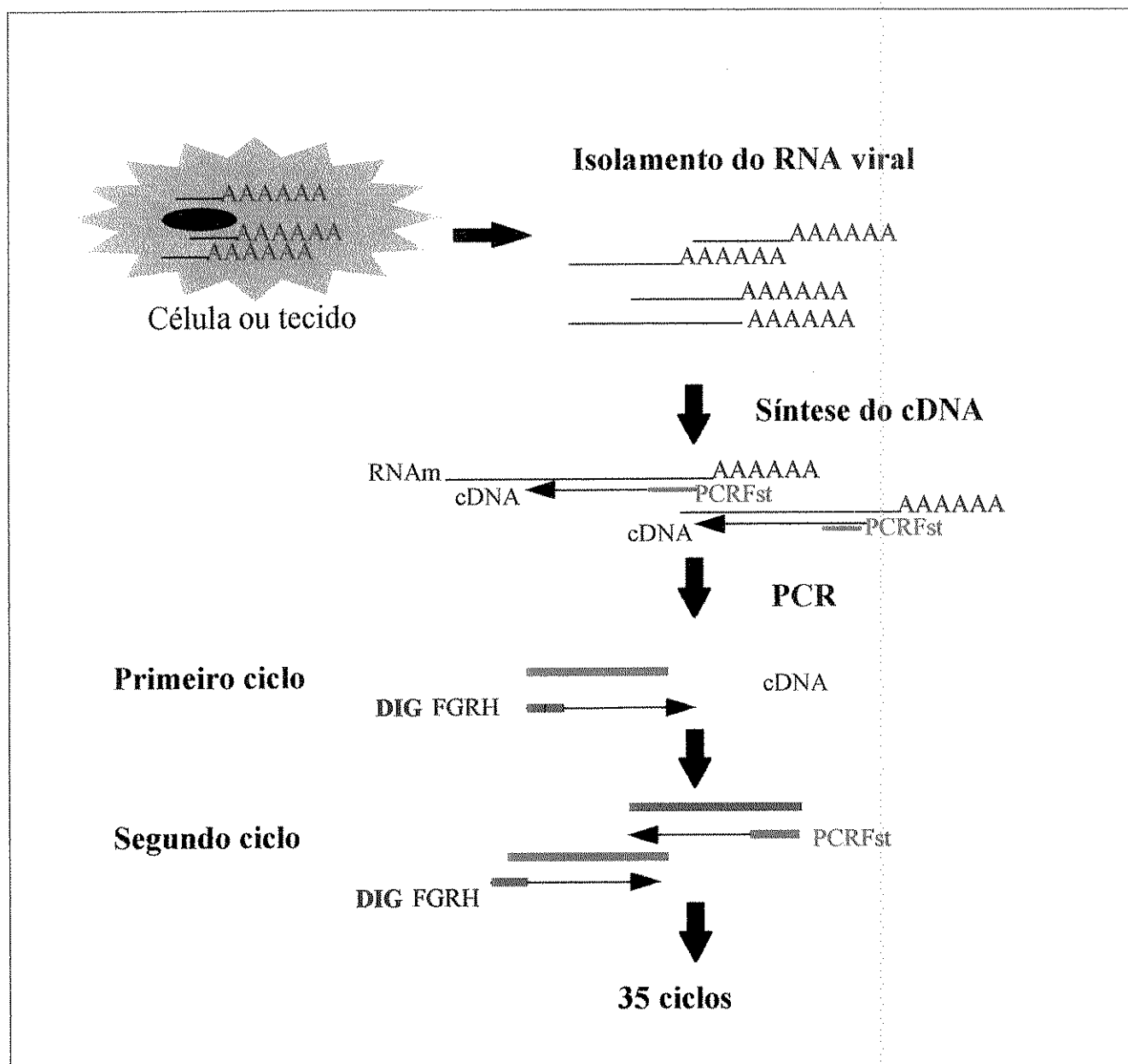
Foram realizadas três metodologias de PCR: nPCR (esquema 1) e RT-PCR quimioluminescente (esquema 2) para amplificação de um fragmento do gene codificador da glicoproteína F (“fusion”) do PVA utilizando-se os iniciadores PCRFst, FGRH e AN17, descritos por Jing *et al.*, 1993, com o objetivo de se avaliar a sensibilidade, especificidade e eficácia das duas metodologias; e RT-PCR para amplificação de um fragmento de 600 pb do gene codificador da glicoproteína G, utilizando-se os iniciadores TRTG3 e TRTG6 descritos por Juhasz & Easton, 1994, para posterior análise com enzima de restrição e seqüenciamento. Todos os iniciadores foram sintetizados e gentilmente doados pelo Instituto Ludwig para este estudo.

O cDNA foi sintetizado segundo metodologia descrita no quadro 2. O protocolo de PCR descrito no quadro 3 foi mantido para todas as PCRs, nPCRs e PCRs quimioluminescentes para amplificação dos fragmentos do gene F, utilizando-se os iniciadores específicos de cada reação. A tabela 1 mostra a localização dos diferentes iniciadores utilizados nas 3 PCRs e o quadro 4 o protocolo de PCR “hot-start” utilizado para amplificação do fragmento de 600 pb do gene G.

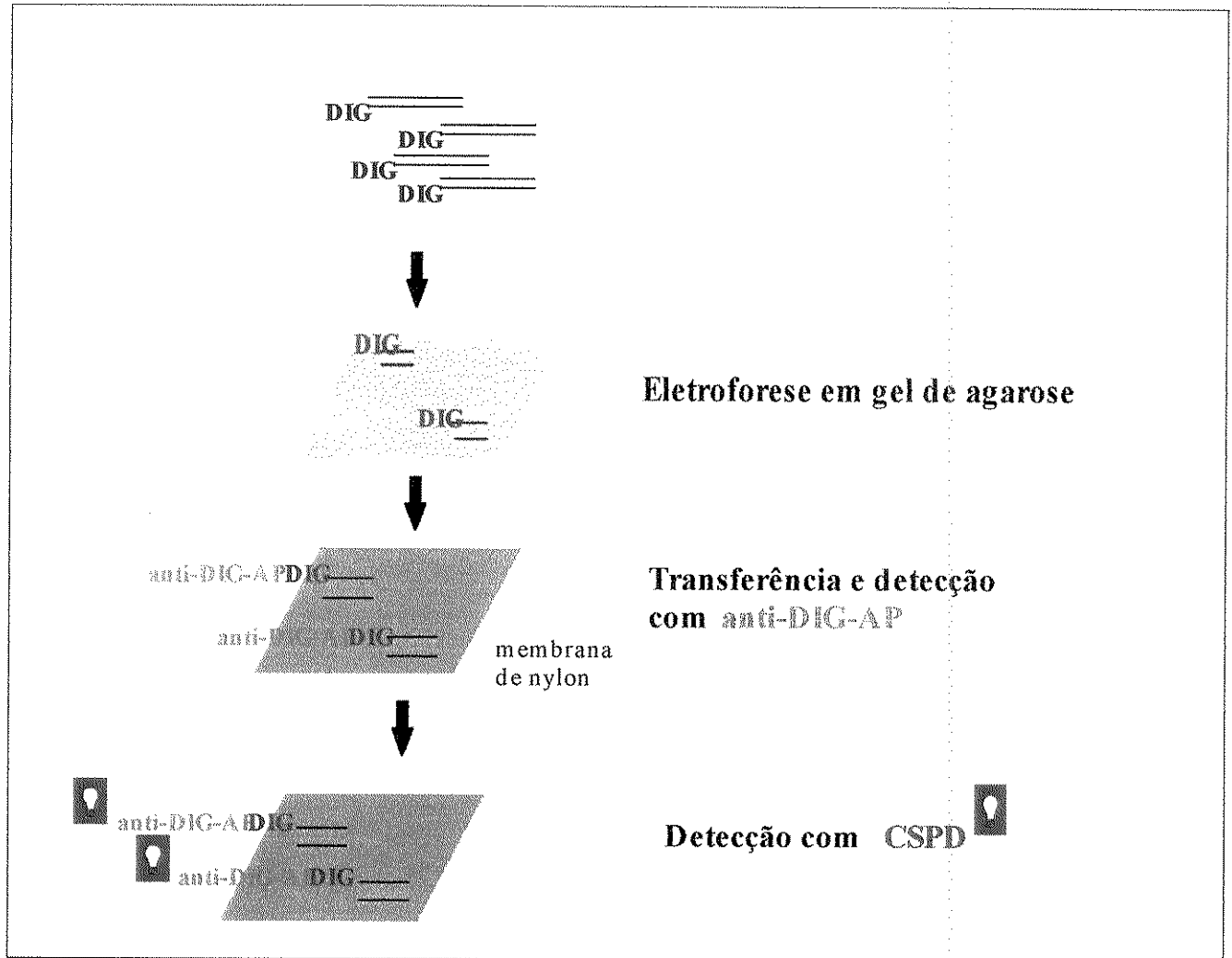
Esquema 1. “Nested PCR” (Gene F)

“Nested PCR” (continuação do esquema 1)



Esquema 2. RT-PCR quimioluminescente (Gene F)

RT-PCR quimioluminescente (continuação)



Quadro 2: Síntese de cDNA

Em um tubo Eppendorf:

RNA (extração)	5 ul
tampão 2X[]	20 ul
dNTP 10 pmol/ul	6 ul
transcriptase reversa [SuperScript II- Gibco BRL (200U/ul)]	1 ul
iniciador sentido negativo(20 pm/ml)	5 ul
inibidor de Rnase (RNasin-Ribonuclease Inhibitor-Promega)	1 ul

60 minutos a 42°C

Congelamento a -70°C

gene F: iniciador PCRFst

gene G: iniciador: oli (dT)

Quadro 3: PCR (gene F)

Em um tubo Eppendorf:

cada iniciador (20 pmol/ml)	1,0 ul
cDNA (50 ng/ml)	5,0 ul
dNTP 1,25mM	5,0 ul
tampão de PCR 10 X []	5,0 ul
Taq 5U (Cenbiot)	0,4 ul
água milliQ estéril qsp.	50 ul

A PCR foi desenvolvida em 35 ciclos sob as seguintes condições:

94°C; 20 segundos; 52°C; 20 segundos ; 72°C; 20 segundos.

Eletroforese em gel de agarose 2% com brometo de etídio

U.V.

Quadro 4: PCR “hot-start” - tubos HOT START 100 μ m-Gibco BRL (gene G)

Tubo Eppendorf:

cada iniciador [TRTG3 e TRTG6] (20 pmol/ml)]	1,0 μ l
cDNA (50ng/ml)	5,0 μ l
dNTP 1,25mM	5,0 μ l
tampão de PCR 10 X []	5,0 μ l
Taq 5U (Cenbiot)	0,4 μ l
água milliQ estéril qsp.	50 μ l

A amplificação foi realizada em 35 ciclos:

94°C, 24 segundos; 55°C, 45 segundos; 75°C, 45 segundos.

Eletroforese em gel de poliacrilamida 8% e revelação com nitrato de prata

Tabela 1. Localização dos iniciadores nos genes codificadores das glicoproteínas F e G do PVA

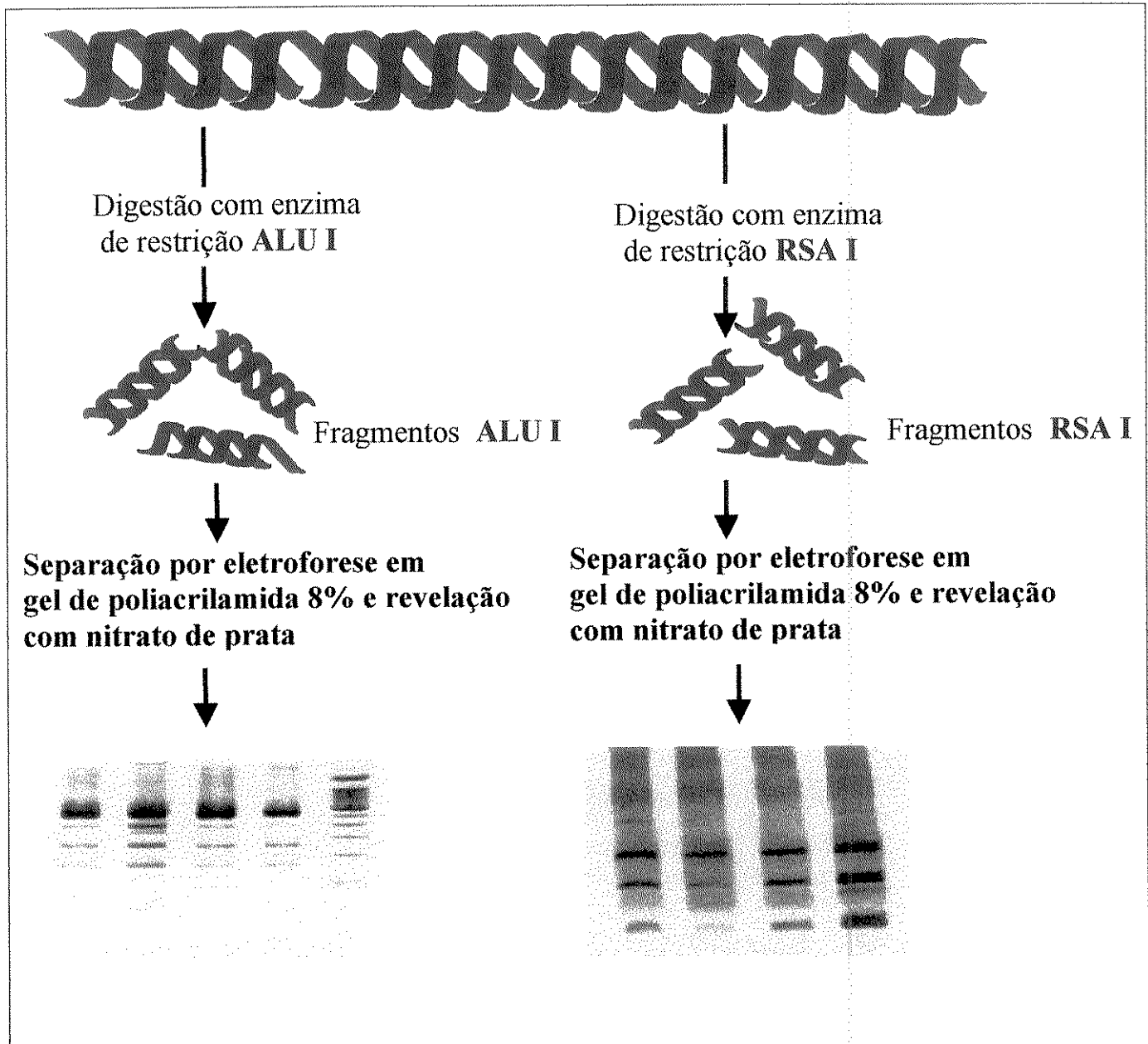
Iniciador	Sequência	Local	Proteína
PCRFst	5'-AAATAACTTAACTGACATAAGCCAT-3	1612-1636	F
FGRH	5'AAAGTCAGCACAGGTAGACAC-3	1096-1116	F
AN17	5'-GATGCCAAGAGCAAGGCTGG-3'	1462-1481	F
oligo(dT)	GGCCCGGGAAGCTTTTTTTTTTTTTTTTA ₁₁₉₃	poli-A	G
TRTG3	GGGATCCCGGGACAAGTATCTCTCTATG ₁₉	1-19	G
TRTG6	₅₇₂ GCCGGGTTGGTCTTCCTGGGGG ₅₅₃	553-572	G

1.6. RT-PCR quimioluminescente

A RT-PCR quimioluminescente foi realizada segundo metodologia descrita no quadro 3, utilizando-se os iniciadores PCRFst e FGRH, marcado com DIG (Genemed Biotechnologies, Inc. San Francisco, USA). Após eletroforese em gel de agarose 2% as amostras dos diferentes isolados amplificadas foram transferidas para membrana de nylon e revelados com substrato quimioluminescente “Disodium 3-(4-methoxyspiro{1,2-dioxetane-3,2-(5-chloro)tricyclo [3.3.1.1^{3,7}] decan}-4 yl) phenyl phosphate” (CSPD®-Boehringer Mannheim).

1.7. Análise com enzimas de restrição

Os produtos de PCR representando o fragmento de 600 pb do gene G de cada isolado foram digeridos com as enzimas de restrição *Alu I* e *Rsa I* (Gibco BRL) conforme esquema 3. Para cada amostra foi realizado o seguinte procedimento: em um tubo Eppendorf de 0,5 ml foram adicionados: tampão 10X, 1 µl; enzima de restrição, 1 µl; água milliQ estéril, 4 µl, produto de PCR, 4 µl. A mistura foi agitada gentilmente e incubada a 37°C, por 12 horas. A detecção foi realizada por eletroforese em gel de poliacrilamida 8% e revelação com nitrato de prata segundo metodologia descrita por Sanguinetti *et al.*, 1994.

Esquema 3. Análise com enzimas de restrição

1.8. Eletroforese

Gel de Agarose

Os produtos de PCR, nPCR e PCR quimioluminescente foram submetidos à eletroforese em gel de 2% de agarose e corados com brometo de etídio segundo metodologia descrita no apêndice 1 (Sambrook *et al.*, 1989).

Após coloração, o DNA amplificado por PCR quimioluminescente foi transferido do gel de agarose 2% para membrana de nylon e realizada a reação de Imunoquimioluminescência.

Gel de Poliacrilamida

Os produtos de 600 pb e os produtos obtidos após digestão com as enzimas de restrição foram submetidos à eletroforese em gel de 8% de poliacrilamida em TBE pH 8,3 e coloração com nitrato de prata segundo metodologia descrita por Sanguinetti *et al.*, 1994 (apêndice 2).

1.9. Transferência para membrana de nylon

A transferência de DNA do gel de agarose para a membrana de nylon (carga positiva, Boehringer Mannheim) foi realizada utilizando-se o Vacuum Blotter Modelo 785 (Bio Rad) e pressão de 12 mmHg com tampão 20 X SSC 3M (NaCl; citrato de Na 0.3M, pH 7.0) durante 90 minutos conforme instruções do fabricante descritas no apêndice 3.

O mesmo procedimento foi realizado em uma segunda etapa utilizando-se o iniciador FGRH marcado com digoxigenina e o iniciador PCRFst e as mesmas condições que as descritas no quadro 3. O DNA foi transferido para membrana de nylon e detectado por quimioluminescência utilizando-se o protocolo descrito acima.

1.12. Clonagem e seqüenciamento

Após coloração, os DNAs amplificados dos 4 isolados foram purificados utilizando-se o Gene Clean II® (Bio 101 Inc.) (Figura 5) conforme metodologia descrita no apêndice 4. Os produtos de 600 pb (gene G) e os de 175 pb (gene F) dos isolados brasileiros SHS BR 119 e SHS BR 121 foram clonados em vetor pUC18 utilizando-se o Sure Clone® Ligation Kit (Pharmacia-Biotech) (esquema 4), transformados em bactérias, purificados [Wizard® Miniprep Purification System (Promega)] e seqüenciados no seqüenciador automático ALF Express (Pharmacia).

Reação de formação de extremidades cegas e fosforiladas

A reação para formação de extremidades cegas e fosforiladas foi montada adicionando os seguintes componentes em 1 tubo de microcentrífuga: produto de PCR, 12 µl; fragmento de Klenow, 1 µl; tampão 10X, 2 µl; T4 kinase de polinucleotídeo, 1 µl; água destilada estéril qsp., 20 µl. Os componentes foram misturados suavemente e os tubos centrifugados rapidamente e incubados a 37°C por 30 minutos. Em seguida foram adicionados 20 µl de fenol/clorofórmio e após

agitação no vortex, os tubos foram centrifugados por 1 minuto, a fase aquosa superior coletada foi purificada em coluna MicroSpin, segundo procedimento descrito no apêndice 5.

Ligação do produto de PCR ao vetor

O produto da PCR foi ligado ao vetor com extremidades cegas desfosforiladas. A reação foi montada adicionando-se em um tubo Eppendorf os seguintes componentes: efluente da coluna (produto kinado), 7 µl; 50 ng de vetor desfosforilado, 1 µl; tampão de ligação, 10 µl; T4 DNA ligase, 1 µl; DDT, 1 µl; água milliQ estéril q.s.p 20 µl. Os componentes foram misturados gentilmente e os tubos centrifugados rapidamente. A mistura de reação foi incubada a 16°C, por 3 horas.

Após a ligação foi realizada reação de PCR para o produto ligado a fim de se confirmar a ligação do fragmento com o vetor pUC18, conforme apêndice 6. Seguindo procedimentos estabelecidos, transformaram-se as células competentes DH5 - α (*E. coli* rec -).

Transformação

As células competentes DH5- α foram retiradas do freezer a -70°C e colocadas no gelo para descongelamento lento. Em seguida foram pipetados 50 µl das células competentes em um tubo Eppendorf e 7 µl de produto ligado. A reação foi mantida no gelo por 30 minutos. Após este período foi realizado o choque térmico (42°C por 1 minuto, gelo por 2 minutos). Aos 57 µl de células submetidas ao choque foram adicionados a 1 ml de meio LB líquido + carbenicilina em um tubo

Falcon de 15 ml e após incubação a 37 °C por 1 hora, sob agitação, as bactérias foram plaqueadas (200 µl/placa em meio LB sólido) segundo apêndice 7.

Foram realizadas PCRs das colônias (apêndice 6) para confirmar presença do fragmentos desejados (600 pb ou 175 pb) antes da purificação e seqüenciamento.

Purificação

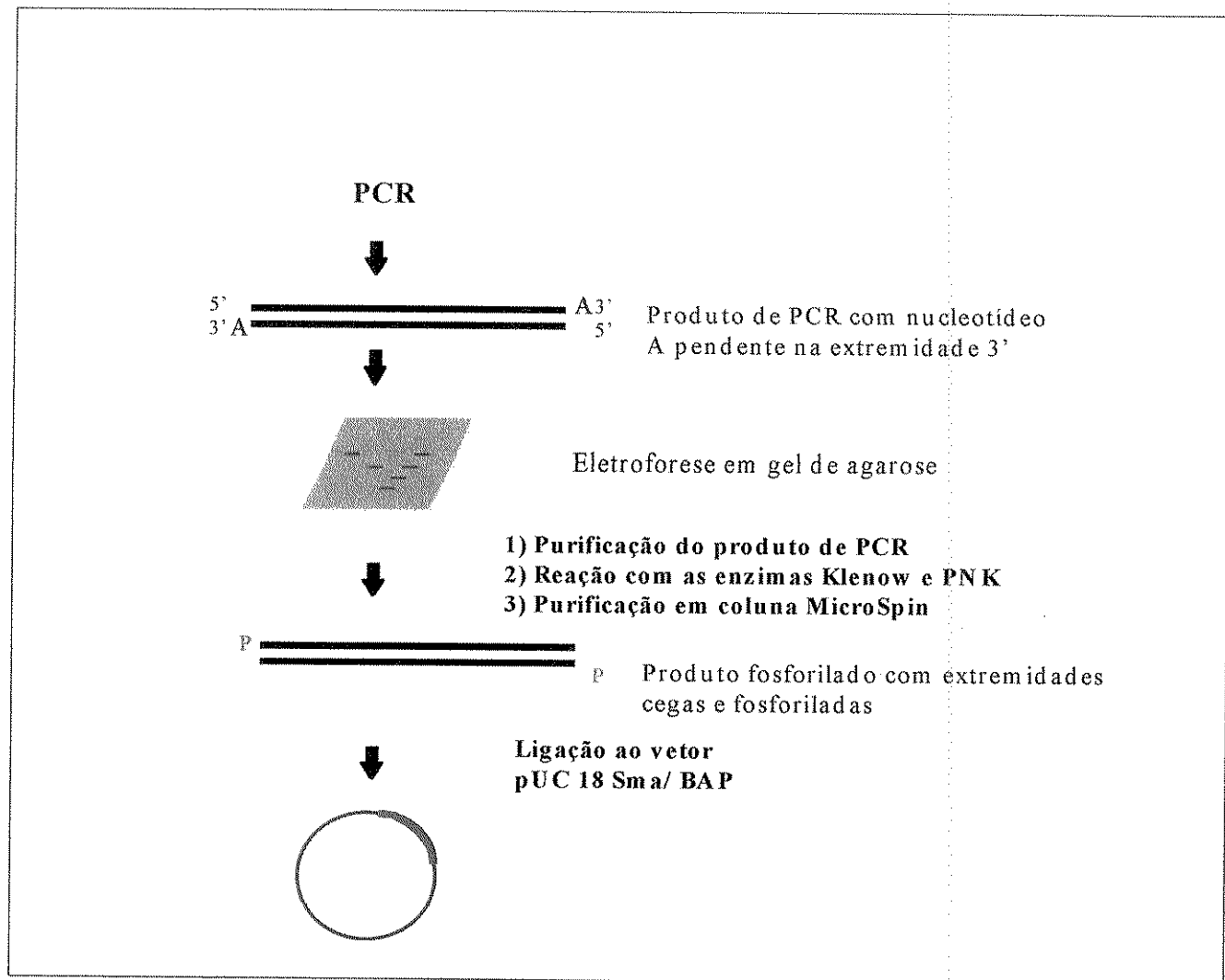
A purificação do DNA clonado e transformado em bactérias foi realizada utilizando-se o sistema WIZARD[®]MINIPREP (PROMEGA).

Selecionou-se a colônia em 5 ml de meio LB com 50µg/ml de carbenicilina e incubou-se sob agitação a 37°C por 12 a 14 horas. Em seguida foram centrifugados 3 ml desta cultura a 14.000 rpm por 4 min. (2 X em tubo com 1,5 ml). Foram adicionados 150 µl de tampão de ressuspensão, 150 µl de tampão de solução de lise (homogeneizados por inversão até que a solução ficasse clara) e 150 µl de solução de neutralização (homogeneizados algumas vezes; a proteína precipitou com coloração branca). Após centrifugação a 14.000 rpm, o sobrenadante foi transferido para um tubo de 1,5 ml novo, adicionou-se 500 µl da resina (agitada antes de usar) e homogeneizou-se por inversão durante 15 min.

As colunas foram lavadas com 2,5 ml de solução de lavagem, secas por centrifugação a 14.000 rpm por 1 min., colocadas em tubos de 1,5 ml rotulados. Adicionou-se 50 µl de água para PCR a 70°C e centrifugou-se a 14.000 rpm por 1 min. O produto clonado e purificado foi, então, seqüenciado.

Seqüenciamento

O seqüenciamento foi realizado no seqüenciador automático ALF Express (Pharmacia). As seqüências obtidas foram confrontadas com seqüências depositadas em banco de dados, usando o programa BLAST, acessado via Internet.

Esquema 4. Clonagem de fragmentos de PCR no vetor pUC18

2. Resultados

Após diluição dos cDNAs de todos os isolados para 50 ng/ μ l, a PCR amplificou o fragmento de 541 pb do gene codificador da glicoproteína F somente no isolado SHS BR 121 [Figura 1 (A)], enquanto que a nPCR amplificou o fragmento de 175 pb de todos os isolados [Figura 1 (A)].

O isolado SHS BR 119 (Figura 2) não foi detectado na RT-PCR, tendo sido detectado até diluição de 10^{-2} por nPCR e por quimioluminescência, o que revela igual sensibilidade das metodologias de nPCR e RT-PCR quimioluminescente para detecção de PVA.

A Figura 3 mostra os resultados obtidos utilizando-se as três metodologias (RT-PCR, nPCR e RT-PCR quimioluminescente) para a PCR de diluição limitante do isolado brasileiro SHS BR 121 de PVA, revelando igual sensibilidade das metodologias de nPCR e RT-PCR quimioluminescente: o produto de 175 pb foi amplificado até a diluição de 10^{-4} e o produto de 541 pb detectado por quimioluminescência até a mesma diluição. Deve-se ressaltar que na primeira PCR o fragmento de 541 pb só foi visualizado até diluição de 10^{-1} .

O seqüenciamento dos fragmentos de 175 pb obtidos por nPCR confirmaram 100% de identidade dos isolados brasileiros de galinhas com isolados de perus cujas seqüências foram depositadas no banco de dados (Figura 4).

A Figura 5 mostra os resultados obtidos na PCR, onde o par de iniciadores TRTG3 e TRTG6 amplificou todas as amostras de isolados brasileiros e europeus dando origem a um fragmento de 600 pb.

A Figura 6 mostra os resultados obtidos da análise com as enzimas restrição *Alu I* e *Rsa I* para os diferentes isolados. Os resultados obtidos utilizando-se a enzima *Rsa I* revelaram um padrão de bandas característico do subgrupo A descrito por Juhaz & Easton, 1994.

As seqüências dos 576 nucleotídeos dos isolados brasileiros SHS BR 119 e SHS BR 121 também foram comparadas com as seqüências depositadas no *Genebank* acessadas via Internet. As seqüências de nucleotídeos e aminoácidos dos isolados brasileiros apresentaram 100% de identidade com a seqüência do gene G do isolado 1556 (França) (Figuras 7, 9 e 14). Entre os dois isolados brasileiros e o isolado CVL14/1 (Inglaterra) houve somente duas diferenças de bases, nas posições 44 e 486 (Figuras 8 e 10). A primeira diferença resulta na alteração do aminoácido alanina (no isolado CVL 14/1) por valina (nos isolados brasileiros); a segunda não causa mudança de aminoácido (Figura 15).

Houve 11 diferenças na seqüências de nucleotídeos dos isolados brasileiros quando comparados com os isolados 6574 (Hungria), 2119 (Itália) e 872S (Espanha), nas posições 368, 371, 372, 373, 380, 383, 398, 407, 421, 428, 429 e 450 (Figuras 11, 12 e 13), que resultam nas alterações dos aminoácidos mostradas nas Figuras 16, 17 e 18.

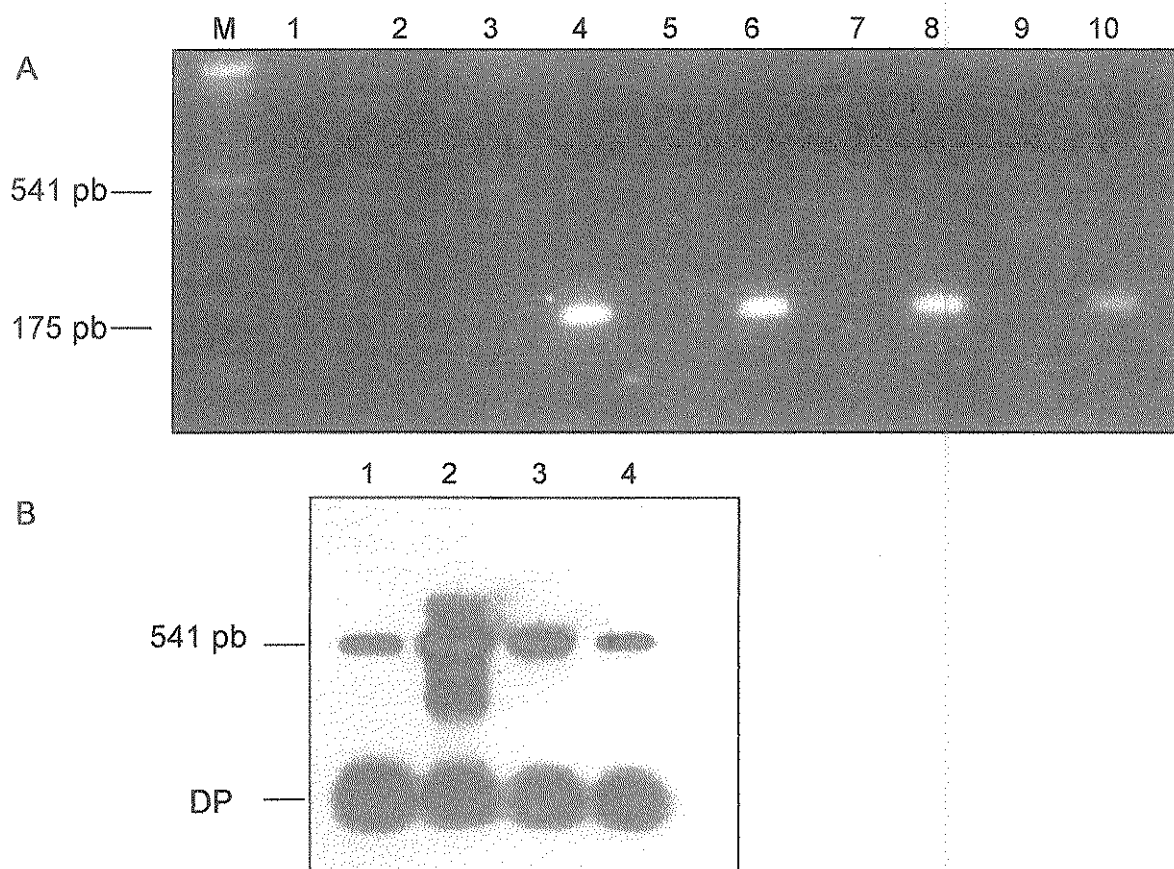


Figura 1 :(A) Eletroforese em gel de agarose 2% com brometo de etídio (1 µg/ml) do DNA das amostras de PVA obtidas a partir de nPCR, utilizando-se na primeira reação (colunas : 1, 3, 5, 7 e 9) o par de iniciadores PCRFst e FGRH que amplifica um fragmento de 541 pb; e na segunda reação (colunas: 2, 4, 6, 8 e 10), o par de iniciadores PCRFst e AN17, que amplifica um fragmento de 175 pb do gene da glicoproteína F.

1. controle negativo para PVA (células CER sem inóculo viral)

2. controle negativo para PVA (células CER sem inóculo viral)

3. SHS BR121

4. SHS BR121

5. SHS BR119

6. SHS BR119

7. BUT 1=8544

8. BUT 1=8544

9. STG 761/88

10. STG 761/88

(B) Southern blot imunoquimioluminescente do gel de agarose dos diferentes isolados (1:SHS BR119; 2: SHS BR121; 3: BUT1=8544 e 4: STG761/88).

M, marcador de peso molecular; DP, dímero de primers.

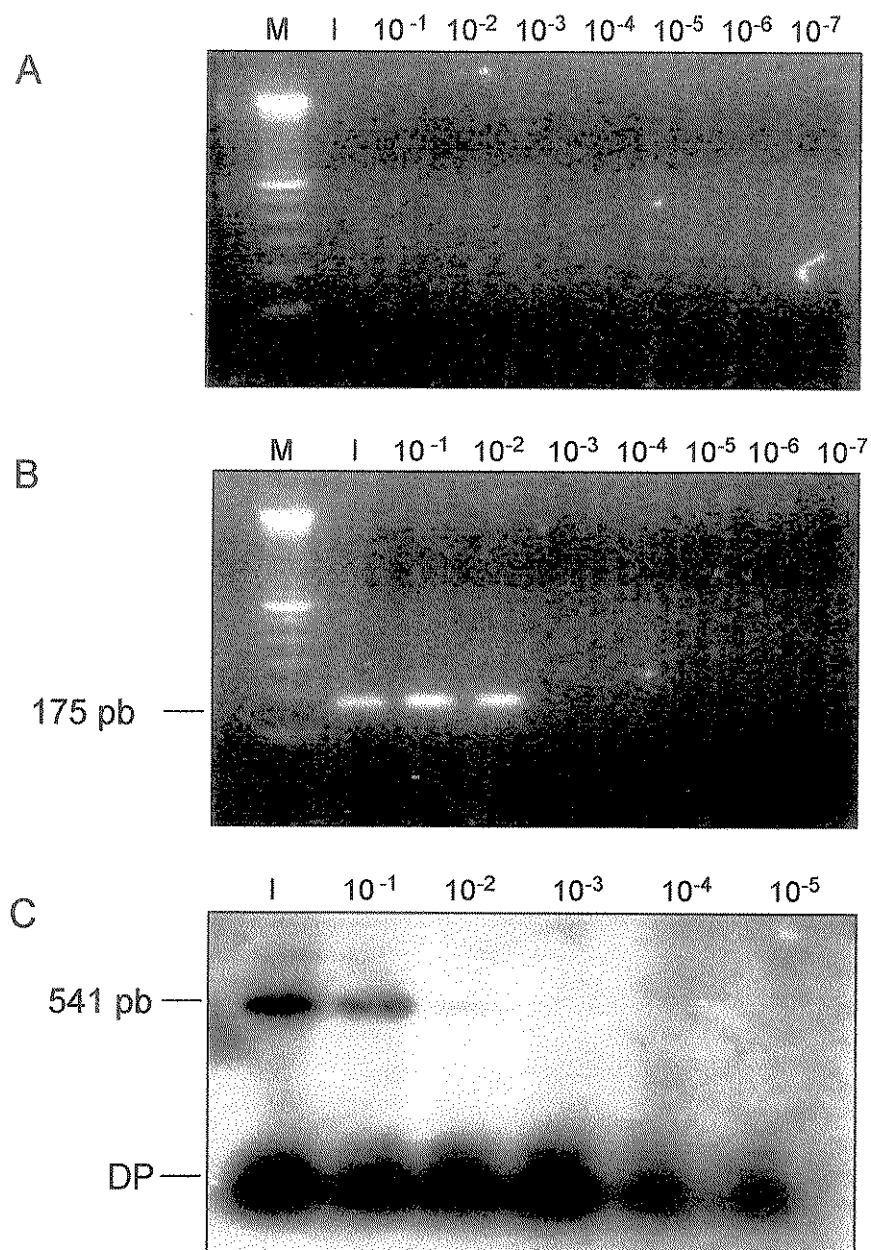


Figura 2. Eletroforese em gel de agarose do produto amplificado de diluições seriadas (10^{-1} a 10^{-7}) do isolado SHS BR119. (A) Produto de PCR de 541 pb utilizando-se o par de iniciadores PCRFst/FGRH, não detectado em gel de agarose 2% com brometo de etídio (1 ug/ml). (B) Produto de nPCR de 175 pb utilizando-se o par de iniciadores PCRFst/AN17 em gel de agarose com brometo de etídio. (C) Southern blot imunoquimioluminescente do gel de agarose mostrado em (A). M, marcador de peso molecular; DP, dímero de primers; I, isolado SHS BR119.

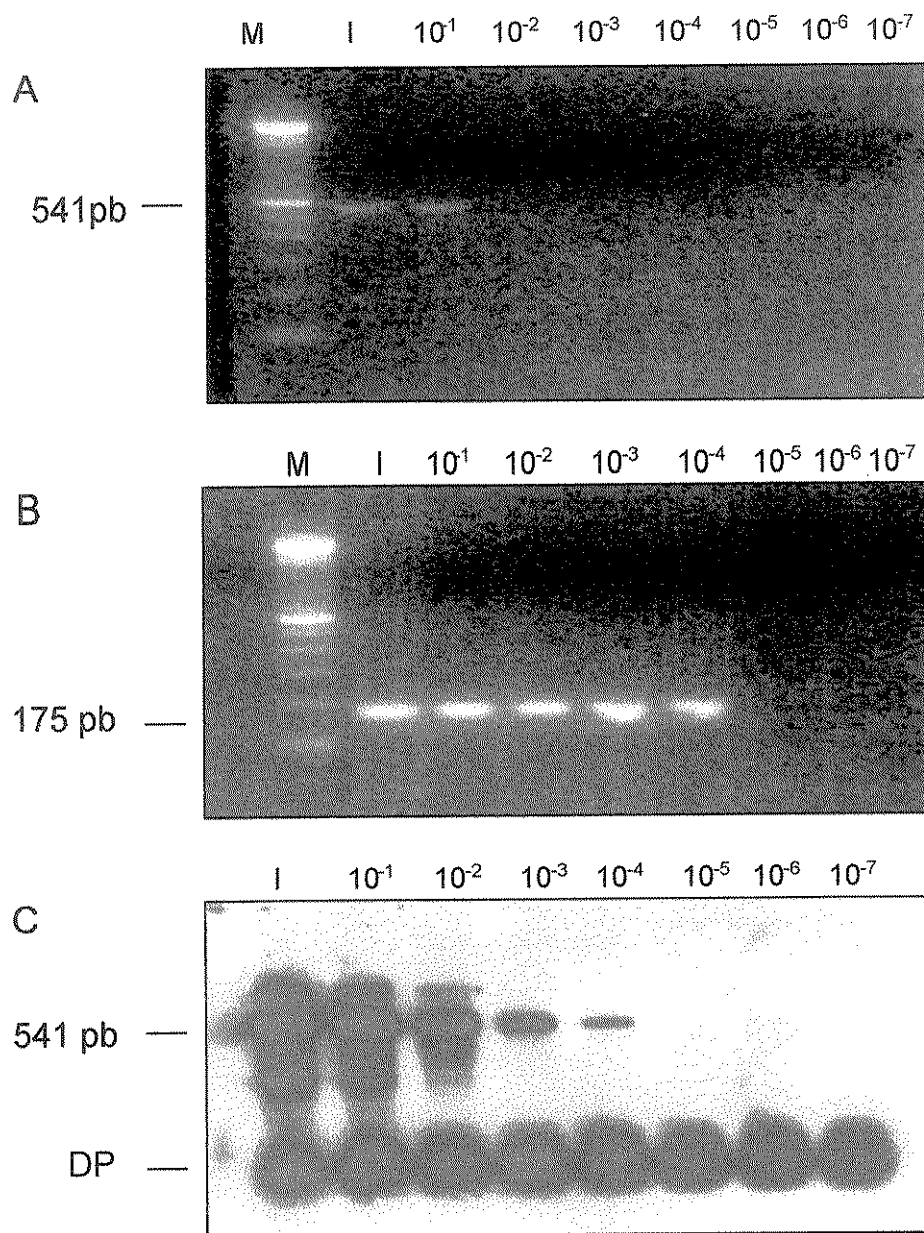


Figura 3. Eletroforese em gel de agarose do produto amplificado de diluições seriadas (10^{-1} a 10^{-8}) do isolado SHS BR121. (A) Produto de PCR de 541 pb obtido com o par de iniciadores PCRFst/FGRH detectado em gel de agarose 2% com brometo de etídio ($1 \mu\text{g/ml}$). (B) Produto de nPCR de 175 pb obtido com o par de iniciadores PCRFst/AN17 em gel de agarose com brometo de etídio ($1 \mu\text{g/ml}$). (C) Southern blot imunoquimioluminescente do gel de agarose mostrado em (A). I, isolado SHS BR 121; M, marcador de peso molecular; DP, dímero de primers.

```

UK/3B/85:  1 gatgccaagagcaaggctggaattgctatagcaatagtagtgctagtcattctaggaatc 60
          |||
BR119:    1462 gatgccaagagcaaggctggaattgctatagcaatagtagtgctagtcattctaggaatc 1521

UK/3B/85: 61 ttcttttttacttgcagtgatatattactgttccagagtcggaagaccaaaccaaagcat 120
          |||
BR119:    1522 ttcttttttacttgcagtgatatattactgttccagagtcggaagaccaaaccaaagcat 1581

UK/3B/85:121 gattaccgggccacgacaggtcatagcagcatggcttatgtcagttaagttat 175
          |||
BR119:    1582 gattaccgggccacgacaggtcatagcagcatggcttatgtcagttaagttat 1636

Pontuação = 347 bits (175) Identidade = 175/175 (100%)
Positividade = 175/175 (100%)

```

Figura 4. Seqüência dos 175 nucleotídeos do gene F do isolado SHS BR 119 alinhada com a seqüência do gene F do isolado UK/3B/85 (Yu, Q., Davis, P. J., Barrett, T., Binns, M. M., Boursnell, M. E. & Cavanagh, D, 1991). O alinhamento foi realizado via Internet, no sítio www.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/BLAST/nph-newblast.

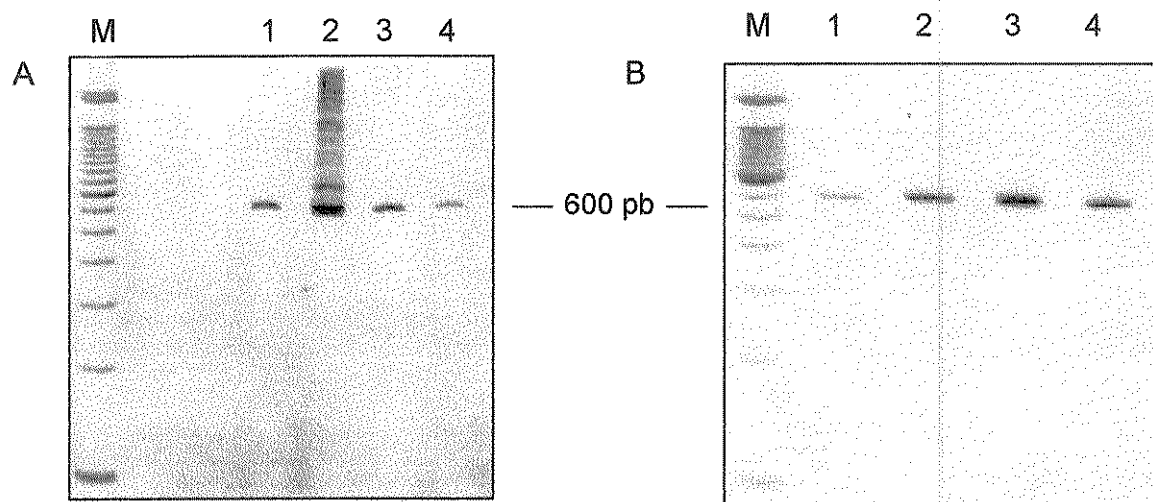


Figura 5. (A) Eletroforese em gel de poliacrilamida 8% e revelação com nitrato de prata dos diferentes isolados, utilizando-se o par de iniciadores TRTG3/TRTG6 que amplificou um fragmento de 600 pb. (B) O mesmo produto de PCR do gel (A) após purificação utilizando-se o kit Gene clean II (Bio 101 Inc.).

1, SHS BR 119; 2, SHS BR 121; 3, STG 761/88; 4, BUT 1=8544; M, marcador de peso molecular.

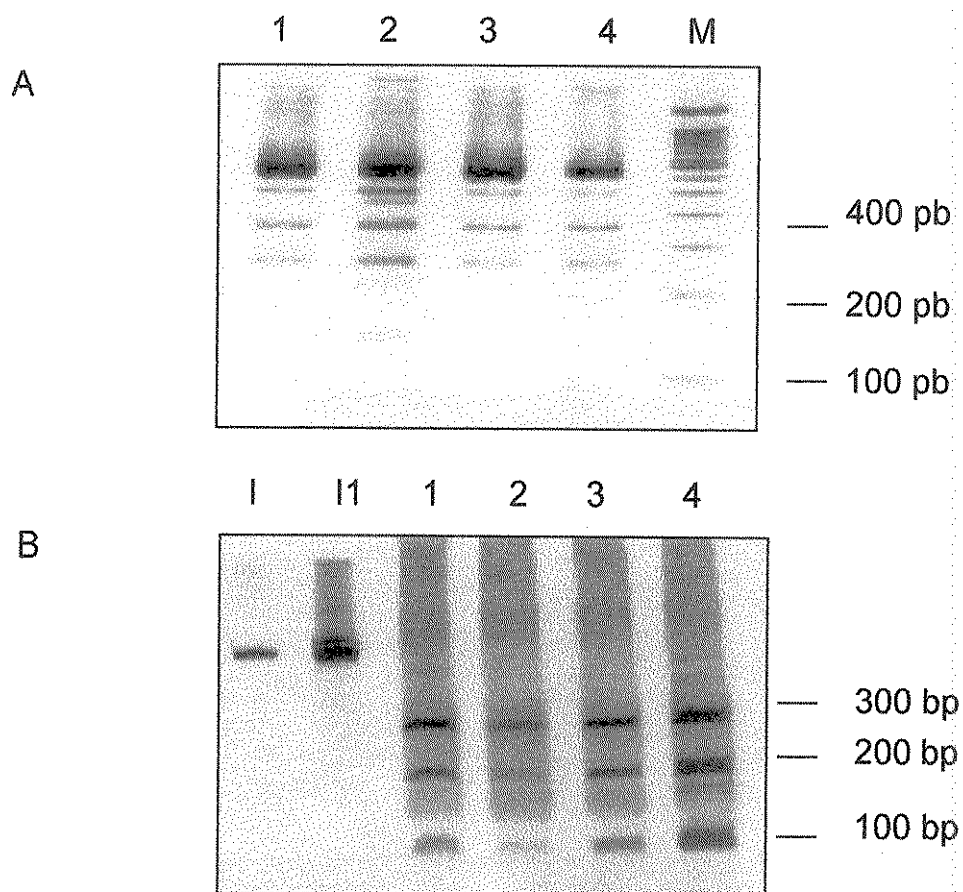


Figura 6. Eletroforese em gel de poliacrilamida 8% e revelação com nitrato de prata dos produtos de 600 bp mostrados na figura 4, após digestão com as enzimas de restrição *Alu I* (A) e *Rsa I* (B). I, isolado SHS BR 119 (sem digestão); I1, isolado SHS BR 121 (sem digestão); 1, BUT 1=8544; 2, SHS BR 121; 3, SHS BR 119; 4, STG 761/88; M, marcador de peso molecular.

```

BR119:8   gggacaagtatctctatggggtccaaactatatatggttcagggcaccagtgcatatcaa 67
|||||
1556: 1   gggacaagtatctctatggggtccaaactatatatggttcagggcaccagtgcatatcaa 60

BR119:68  actgcagtggggttctggtggacatcgggaggaggtacatattggctatagtcctatca 127
|||||
1559: 61  actgcagtggggttctggtggacatcgggaggaggtacatattggctatagtcctatca 120

BR119:128 gctttcgggctgacctgcacagtcactattgcactcactgttagcgtcatagttgaacag 187
|||||
1556: 121 gctttcgggctgacctgcacagtcactattgcactcactgttagcgtcatagttgaacag 180

BR119:188 tcagtgtttagaggagtgagaaactacaatggaggagatagagattggtggtcaaccacc 247
|||||
1556: 181 tcagtgtttagaggagtgagaaactacaatggaggagatagagattggtggtcaaccacc 240

BR119:248 caggagcagccaactactgcaccaagtgcgactccagcaggaaattatggaggattacaa 307
|||||
1556: 241 caggagcagccaactactgcaccaagtgcgactccagcaggaaattatggaggattacaa 300

BR119:308 acggctcgaacaagaaagtctgaaagctgtttgcatgtgcaaatttcttatggtgatatg 367
|||||
1556: 301 acggctcgaacaagaaagtctgaaagctgtttgcatgtgcaaatttcttatggtgatatg 360

BR119:368 tatagccgcagtgatactgtactgggtggttttgattgtatgggcttattggttctttgc 427
|||||
1556: 361 tatagccgcagtgatactgtactgggtggttttgattgtatgggcttattggttctttgc 420

BR119:428 aaatcaggaccaattttgtcagcgagataatcaagttgacccaacagccctctgccactgc 487
|||||
1556: 421 aaatcaggaccaattttgtcagcgagataatcaagttgacccaacagccctctgccactgc 480

BR119:488 agggtagatctttcaagtgtggactgctgcaaggtgaacaagattagcactaacagcagc 547
|||||
1556: 481 agggtagatctttcaagtgtggactgctgcaaggtgaacaagattagcactaacagcagc 540

BR119:548 accacctctgagccccagaagaccaaccc 576
|||||
1556: 541 accacctctgagccccagaagaccaaccc 569

Pontuação = 1128 bits (569) Identidade = 569/569 (100%)
Positividade = 569/569 (100%)

```

Figura 7. Seqüência dos 576 nucleotídeos do gene G do isolado SHS BR 119 alinhada com a seqüência do gene G do isolado 1556 (França) como representante do subgrupo A (Juhász & Easton, 1994). O alinhamento foi realizado via Internet, no sítio www.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/BLAST/nph-newblast.

```

BR119:      8   gggacaagtatctctatgggggtccaaactatatatgggttcagggcaccagtgcatatcaa 67
               |||
CVL14/1:    1   gggacaagtatctctatgggggtccaaactatatatgggttcagggcaccagtgcatatcaa 60

BR119:     68   actgcagtgggggttctggctggacatcgggaggaggtacatattggctatagtcctatca 127
               |||
CVL14/1:    61   actgcagtgggggttctggctggacatcgggaggaggtacatattggctatagtcctatca 120

BR119:    128   gctttcgggctgacctgcacagtcactattgcactcactggttagcgctcatagttgaacag 187
               |||
CVL14/1:   121   gctttcgggctgacctgcacagtcactattgcactcactggttagcgctcatagttgaacag 180

BR119:    188   tcagtgttagaggagtgagaaactacaatggaggagatagagattgggtggtcaaccacc 247
               |||
CVL14/1:   181   tcagtgttagaggagtgagaaactacaatggaggagatagagattgggtggtcaaccacc 240

BR119:    248   caggagcagccaactactgcaccaagtgcgactccagcaggaaattatggaggattacaa 307
               |||
CVL14/1:   241   caggagcagccaactactgcaccaagtgcgactccagcaggaaattatggaggattacaa 300

BR119:    308   acggctcgaacaagaaagtctgaaagctggttgcatgtgcaaatttcttatggtgatatg 367
               |||
CVL14/1:   301   acggctcgaacaagaaagtctgaaagctggttgcatgtgcaaatttcttatggtgatatg 360

BR119:    368   tatagccgcagtgatactgtactgggtgggttttgattgtatgggcttattggttctttgc 427
               |||
CVL14/1:   361   tatagccgcagtgatactgtactgggtgggttttgattgtatgggcttattggttctttgc 420

BR119:    428   aaatcaggaccaattttgtcagcgagataatcaagttgacccaacagccctctgccactgc 487
               |||
CVL14/1:   421   aaatcaggaccaattttgtcagcgagataatcaagttgacccaacagccctctgccattgc 480

BR119:    488   agggtagatctttcaagtgtggactgctgcaaggtgaacaagattagcactaacagcagc 547
               |||
CVL14/1:   481   agggtagatctttcaagtgtggactgctgcaaggtgaacaagattagcactaacagcagc 540

BR119:    548   accacctctgagccccagaagaccaaccc 576
               |||
CVL14/1:   541   accacctctgagccccagaagaccaaccc 569

Pontuação = 1112 bits (561) Identidade = 567/569 (99%)
Positividade = 567/569 (99%)

```

Figura 8. Sequência dos 576 nucleotídeos do gene G do isolado SHS BR 119 alinhada com a sequência do gene G do isolado CVL 14/1 (Inglaterra) como representante do subgrupo A (Juhász & Easton, 1994). As alterações de nucleotídeos estão representadas em vermelho. O alinhamento foi realizado via Internet, no sítio: www.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/BLAST/nph-newblast

```

BR121: 8   gggacaagtatctctatggggtccaaactatatatggttcagggcaccagtgcatatcaa 67
          ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
1556:  1   gggacaagtatctctatggggtccaaactatatatggttcagggcaccagtgcatatcaa 60

BR121: 68  actgcagtggggttcttgctggacatcgggaggaggtacatatattggctatagtcctatca 127
          ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
1559:  61  actgcagtggggttcttgctggacatcgggaggaggtacatatattggctatagtcctatca 120

BR121:128  gctttcgggctgacctgcacagtcactattgcactcactggttagcgtcatagttgaacag 187
          ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
1556: 121  gctttcgggctgacctgcacagtcactattgcactcactggttagcgtcatagttgaacag 180

BR121:188  tcagtgtagaggagtgagaaactacaatggaggagatagagattgggtggtcaaccacc 247
          ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
1556: 181  tcagtgtagaggagtgagaaactacaatggaggagatagagattgggtggtcaaccacc 240

BR121:248  caggagcagccaactactgcaccaagtgcgactccagcaggaaattatggaggattacaa 307
          ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
1556: 241  caggagcagccaactactgcaccaagtgcgactccagcaggaaattatggaggattacaa 300

BR121:308  acggctcgaacaagaaagtctgaaagctgtttgcatgtgcaaatttcttatggtgatatg 367
          ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
1556: 301  acggctcgaacaagaaagtctgaaagctgtttgcatgtgcaaatttcttatggtgatatg 360

BR121:368  tatagccgcagtgatactgtactgggtggttttgattgtatgggcttattgggttctttgc 427
          ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
1556: 361  tatagccgcagtgatactgtactgggtggttttgattgtatgggcttattgggttctttgc 420

BR121:428  aaatcaggaccaattttgtcagcgagataatcaagttgacccaacagccctctgccactgc 487
          ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
1556: 421  aaatcaggaccaattttgtcagcgagataatcaagttgacccaacagccctctgccactgc 480

BR121:488  agggtagatctttcaagtgtggactgctgcaaggtgaacaagattagcactaacagcagc 547
          ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
1556: 481  agggtagatctttcaagtgtggactgctgcaaggtgaacaagattagcactaacagcagc 540

BR121:548  accacctctgagccccagaagaccaaccc 576
          ||||||||||||||||||||||||||||
1556: 541  accacctctgagccccagaagaccaaccc 569

Pontuação = 1128 bits (569) Identidade = 569/569 (100%)
Positividade = 569/569 (100%)

```

Figura 9. Sequência dos 576 nucleotídeos do gene G do isolado SHS BR 121 alinhada com a sequência do gene G do isolado 1556 (França) como representante do subgrupo A (Juhász & Easton, 1994). O alinhamento foi realizado via Internet, no sítio www.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/BLAST/nph-newblast.

```

BR121:      8      gggacaagtatctctatggggtccaaactatatatgggttcagggcaccagtgcatatcaa 67
|||||
CVL14/1:    1      gggacaagtatctctatggggtccaaactatatatgggttcagggcaccagtgcatatcaa 60

BR121:     68      actgcagtggggttcttggtggacatcgggaggaggtacatattggctatagtcctatca 127
|||||
CVL14/1:   61      actgcagtggggttcttggtggacatcgggaggaggtacatattggctatagtcctatca 120

BR121:    128      gctttcgggctgacctgcacagtcactattgcactcactgttagcgctcatagttgaacag 187
|||||
CVL14/1:  121      gctttcgggctgacctgcacagtcactattgcactcactgttagcgctcatagttgaacag 180

BR121:    188      tcagtgtagaggagtgagaaactacaatggaggagatagagattggtggtcaaccacc 247
|||||
CVL14/1:  181      tcagtgtagaggagtgagaaactacaatggaggagatagagattggtggtcaaccacc 240

BR121:    248      caggagcagccaactactgcaccaagtgcgactccagcaggaaattatggaggattacaa 307
|||||
CVL14/1:  241      caggagcagccaactactgcaccaagtgcgactccagcaggaaattatggaggattacaa 300

BR121:    308      acggctcgaacaagaaagtctgaaagctgtttgcatgtgcaaatttcttatggtgatatg 367
|||||
CVL14/1:  301      acggctcgaacaagaaagtctgaaagctgtttgcatgtgcaaatttcttatggtgatatg 360

BR121:    368      tatagccgcagtgatactgtactgggtggttttgattgtatgggcttattggttctttgc 427
|||||
CVL14/1:  361      tatagccgcagtgatactgtactgggtggttttgattgtatgggcttattggttctttgc 420

BR121:    428      aaatcaggaccaatttgtcagcgagataatcaagttgacccaacagccctctgccactgc 487
|||||
CVL14/1:  421      aaatcaggaccaatttgtcagcgagataatcaagttgacccaacagccctctgccattgc 480

BR121:    488      agggtagatctttcaagtgtggactgctgcaaggtgaacaagattagcactaacagcagc 547
|||||
CVL14/1:  481      agggtagatctttcaagtgtggactgctgcaaggtgaacaagattagcactaacagcagc 540

BR121:    548      accacctctgagccccagaaagaccaaccc 576
|||||
CVL14/1:  541      accacctctgagccccagaaagaccaaccc 569

Pontuação = 1112 bits (561) Identidade = 567/569 (99%)
Positividade = 567/569 (99%)

```

Figura 10. Sequência dos 576 nucleotídeos do gene G do isolado SHS BR 121 alinhada com a sequência do gene G do isolado CVL 14/1 (Inglaterra) como representante do subgrupo A (Juhász & Easton, 1994). As alterações de nucleotídeos estão representadas em vermelho. O alinhamento foi realizado via Internet: www.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/BLAST/nph-newblast

Figura 13. Sequência da região variável do fragmento de 576 nucleotídeos do gene G do isolado SHS BR 121 alinhada com a sequência do gene G do isolado 872 S (Espanha) como representante do subgrupo B (Juhász & Easton, 1994). As alterações de nucleotídeos estão representadas em vermelho. O alinhamento foi realizado via Internet, no sítio: www.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/BLAST/nph-newblast

BR121:	23	MGSKLYMVQGTSA YQTAVGFWLDIGRRYILAIVLSA FGLTCTVTIALT VSVIVEQSVLEE	202
1556:	1	MGSKLYMVQGTSA YQTAVGFWLDIGRRYILAIVLSA FGLTCTVTIALT VSVIVEQSVLEE	60
BR121:	203	CRNYNGGDRDWWSTTQE QPTTAPSATPAGNYGGLQTARTRKSE SCLHVQISYGD MYSRSD	382
1556:	61	CRNYNGGDRDWWSTTQE QPTTAPSATPAGNYGGLQTARTRKSE SCLHVQISYGD MYSRSD	120
BR121:	383	TVLGGFDCMGLLVLC KSGPICQRDNQVDPTALCHCRVDLSSVDCCKV NKISTNSSTTSEP	562
1556:	121	TVLGGFDCMGLLVLC KSGPICQRDNQVDPTALCHCRVDLSSVDCCKV NKISTNSSTTSEP	180
BR121:	563	QKTN 574	
		QKTN	
1556:	181	QKTN 184	

Figura 14. Sequência de aminoácidos do gene G do isolado SHS BR 121 alinhada com a sequência de aminoácidos do isolado 1556 (França) como representante do subgrupo A (Juhasz & Easton, 1994). O alinhamento foi realizado via Internet, no sítio: www.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/BLAST/nph-newblast

```

BR121: 23  MGSKLYMVQGTSAYQTAVGFWLDIGRRYILAIVLSAFGLTCTVTIALTVSVIVEQSVLEE 202
           MGSKLYM  QGTSAYQTAVGFWLDIGRRYILAIVLSAFGLTCTVTIALTVSVIVEQSVLEE
CVL14/1: 1  MGSKLYMAQGTSAYQTAVGFWLDIGRRYILAIVLSAFGLTCTVTIALTVSVIVEQSVLEE 60

BR121: 203 CRNYNGGDRDWWSTTQEQPTTAPSATPAGNYGGLQTARTRKSESCLHVQISYGDMYSRSD 382
          CRNYNGGDRDWWSTTQEQPTTAPSATPAGNYGGLQTARTRKSESCLHVQISYGDMYSRSD
CVL14/1: 61 CRNYNGGDRDWWSTTQEQPTTAPSATPAGNYGGLQTARTRKSESCLHVQISYGDMYSRSD 120

BR121: 383 TVLGGFDCMGLLVLCCKSGPICQRDNQVDPTALCHCRVDLSSVDCCKVNKISTNSSTTSEP 562
          TVLGGFDCMGLLVLCCKSGPICQRDNQVDPTALCHCRVDLSSVDCCKVNKISTNSSTTSEP
CVL14/1:121 TVLGGFDCMGLLVLCCKSGPICQRDNQVDPTALCHCRVDLSSVDCCKVNKISTNSSTTSEP 180

BR121: 563  QKTN 574
          QKTN
CVL14/1:181 QKTN 184

```

Pontuação = 383 bits (974) Identidade = 183/184 (99%)
 Positividade = 183/184 (99%)

Figura 15. Sequência de aminoácidos do gene G do isolado SHS BR 121 alinhada com a sequência de aminoácidos do isolado CVL 14/1 (Inglaterra) como representante do subgrupo A (Juhász & Easton, 1994). O alinhamento foi realizado via Internet, no sítio: www.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/BLAST/nph-newblast

```

BR121: 23  MGSKLYMVQGTSA YQTAVGFWLDIGRRYILAIVLSAFGLTCTVTIALTVSVIVEQSVLEE 202
          MGS+LY+++G S+ + + L ++ +L +VLSA GLT T TI +++ + VEQ L +
872 S: 1   MGSELYIIIEGVSSSEIVLKQVLRRSQKILLRLVLSALGLTLTSTIVISICISVEQVKLRQ 60

BR121: 203 CRNY-----NGGDRDWWSTTQEQPTTAPSATPAGNYGGLQTARTRKSESLHVQISYGDMY 370
          C + NG ST + T+ T + LQ K ESC +VQ+ GDM+
872/S: 61  CVDTYWAENGSLHPGQST---ENTSTRGKTTTKDPRRLQATGAGKFESC GYVQVVDGDMH 117

BR121: 371 SRSDTVLGGFDCMGLLVLCCKSGPICQRDNQVDPTALCHCRVDLSSVDCCKVNKI-STNSS 547
          RS VLGG DC+GLL LC+SGPICQ D + C C + V CCK K +T +
872/S: 118 DRSYAVLGGVDCLGILLALCESGPICQGD TWSEDGNFCRCTLSSHGVSCCKKPKSKATTAQ 177

BR121: 548 TTSEP 562
          S+P
872/S: 178 RNSKP 182

```

Pontuação = 118 bits (294) Identidade = 71/180 (39%)
 Positividade = 101/180 (55%) Gaps = 5/180 (2%)

Figura 16: Seqüência de aminoácidos do gene G do isolado SHS BR 121 alinhada com a seqüência de aminoácidos do isolado 872 S (Espanha) como representante do subgrupo B (Juhász & Easton, 1994). O alinhamento foi realizado via Internet, no sítio: www.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/BLAST/nph-newblast.

```

BR121: 23  MGSKLYMVQGTSA YQTAVGFWLDIGRRYILAIVLSAFGLTCTVTIALTVSVIVEQSVLEE 202
          MGS+LY+++G S+ + + L ++ +L +VLSA GLT T TI +++ + VEQ L +
2119: 1  MGSELYIIIEGVSSSEIVLKQVLRRSQKILLGLVLSALGLTLTSTIVISICISVEQVKLRQ 60

BR121: 203 CRNY----NGGDRDWWSTTQEQTTPSATPAGNYGGLQTARTRKSESLHVQISYGDMY 370
          C + NG ST + T+ T + LQ K ESC +VQ+ GDM+
2119: 61  CVDTYWAENGSLHPGQST---ENTSTRDKTTTKDPRRLQATGAGKFESCXYVQVVDGDMH 117

BR121: 371 SRSDTVLGGFDCMGLLVLCCKSGPICQRDNQVDPTALCHCRVDLSSVDCCKVNI-STNSS 547
          RS VLGG DC+GLL LC+SGPICQ D + C C V CCK K +T +
2119: 118 DRSYAVLGGVDCGLGLLALCESGPICQGDWSEEDGNFCRCTFSSHGVSCCKPKSKATTAQ 177

BR121: 548 TTSEP 562
          S+P
2119: 178 RNSKP 182

```

P.ontuação = 118 bits (293 Identidade = 71/180 (39%)
 Positividade = 100/180 (55%) Gaps = 5/180 (2%)

Figura 17: Seqüência de aminoácidos do gene G do isolado SHS BR 121 alinhada com a seqüência de aminoácidos do isolado 2119 (Itália) como representante do subgrupo B (Juhasz & Easton, 1994). O alinhamento foi realizado via Internet, no sítio: www.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/BLAST/nph-newblast

```

BR121: 23  MGSKLYMVQGTSA YQTAVGFWLDIGRRYILAIVLSAFGLTCTVTIALTVSVIVEQSVLEE 202
          MGS+LY+++G S+ + + L ++ +L +VLSA GLT T TI +++ + VEQ L +
6574: 1  MGSELYIIIEGVSSSEIVLKQVLRRSQKILLGLVLSALGLTLTSTIVISICISVEQVKLRQ 60

BR121: 203 CRNY----NGGDRDWWSTTQE QPTTAPSATPAGNYGGLQTARTRKSESLHVQISYGDMY 370
          C + NG ST + T+ T + LQ K ESC +VQ+ GDM+
6574: 61  CVDTYWAENGSLHPGQST---ENTSTRGKTTTKDPRLQATGAGKFESCGYVQVVDGDMH 117

BR121: 371 SRSDTVLGGFDCMGLLVLC KSGPICQRDNQVDPTALCHCRVDLSSVDCCKV NKI-STNSS 547
          RS VLGG DC+GLL LC+SGPICQ D + C C V CCK K +T +
6574: 118 DRSYAVLGGVDCLGLLALCESGPICQGD TWSEDGNFCRC TFSSHGVSCCKPKSKATTAQ 177

BR121: 548 TTSEP 562
          S+P
6574: 178 RNSKP 182

```

Pontuação = 118 bits (293) Identidade = 71/180 (39%)
 Positividade = 100/180 (55%) Gaps = 5/180 (2%)

Figura 18: Seqüência de aminoácidos do gene G do isolado SHS BR 121 alinhada com a seqüência de aminoácidos do isolado 6574 (Hungria) como representante do subgrupo B (Juhasz & Easton, 1994). O alinhamento foi realizado via Internet, no sítio: www.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/BLAST/nph-newblast

3. Discussão

A metodologia até então utilizada para a detecção de rotina de PVA inclui isolamento em cultivos primários de embrião de galinha (Picault *et al.*, 1987), inoculação em ovos embrionados, em cultivo de anel de traquéia (TOCs), multiplicação viral em células CER (Hafez, 1991) e observação do efeito citopático ou diminuição da ciliostase, além de imunofluorescência (Baxter *et al.*, 1986) e ELISA. Esta última tem a capacidade de detectar respostas sorológicas 11 dias após as aves terem sido contaminadas pelo PVA, com sensibilidade de 98,7% e especificidade de 99,5% (Heckert *et al.*, 1993).

Duas metodologias de nPCR foram descritas para detecção de PVA através da amplificação de fragmentos da glicoproteína F (Jing *et al.*, 1993; Mase *et al.*, 1996). No entanto, os protocolos convencionais de nPCR consomem muito tempo, possuem um alto risco de contaminação e de resultados falsos positivos, além de exigirem uma infra-estrutura de laboratório adequada para diminuir estes riscos de contaminação.

Trabalhos recentes incluem o uso de sondas quimioluminescentes e fluorescentes, que possuem uma série de vantagens sobre metodologias clássicas como nPCR, incluindo diminuição do risco de contaminação, aumento da sensibilidade e menor tempo e trabalho (Durigon *et al.*, 1994; Holtke *et al.*, 1992). A técnica de RT-PCR quimioluminescente possui a vantagem de ser específica, sensível e rápida para detecção de PVA sem os riscos de contaminação presentes nos sistemas de nPCR.

A metodologia descrita para caracterização dos isolados brasileiros demonstrou-se altamente eficaz na identificação e classificação do PVA a partir de isolados. Este tipo de abordagem tem aplicações em estudos de variabilidade e epidemiológicos com repercussões sanitárias e econômicas consideráveis, por exemplo, no desenvolvimento e utilização de vacinas.

A glicoproteína G é conhecida por ser a proteína mais variável no vírus respiratório sincicial humano (VRSH), o protótipo de pneumovírus (Johnson *et al.*, 1987), e por isso mesmo tem importância como antígeno vacinal.

A determinação da sequência nucleotídica do gene G de cinco isolados europeus diferentes sugeriram a existência de dois subgrupos de PVA, o subgrupo A, formado pelos isolados CVL 14/1 (Inglaterra) e 1556 (França), e o subgrupo B, formado pelos outros isolados europeus (2119, Itália; 6574, Hungria e 872 S, Espanha) (Juhasz & Easton, 1994).

As diferenças significativas na sequência de nucleotídeos entre os dois subgrupos podem ser a razão para a perda aparente de eficácia nas vacinas utilizadas até hoje. Uma vacina baseada na sequência de um único isolado de um determinado subgrupo parece não ser suficiente para conferir proteção contra infecção por membros de outros subgrupos (Easton, 1997).

Entre os isolados do subgrupo A, a identidade de nucleotídeos variou entre 99,1% e 99,9%, enquanto que, no subgrupo B, variou entre 99,4% e 99,7%. A identidade entre os dois subgrupos variou entre 56,3% e 57%. O alinhamento entre o subgrupo A e B mostrou que a região N terminal é mais conservada, possuindo dois domínios hidrofóbicos, altamente conservados. A primeira região hidrofóbica conservada se localiza entre os aminoácidos 32 a 45 (correspondente à região entre os nts 96 a 135) e atua como região transmembrana análoga à encontrada na proteína G do VRSH (Wertz *et al.*, 1985). A outra região hidrofóbica altamente conservada se localiza entre os aminoácidos 118 e 142 (entre as posições 354 a 426) no subgrupo A, e entre os aminoácidos 119 e

143 (posições 357 - 429) no subgrupo B. Esta segunda região hidrofóbica conservada, juntamente com a região C terminal hidrofóbica, parecem ser estruturas de parte de uma região transmembrana, que expõe a região hidrofílica variável da proteína G à superfície. Em nenhum dos isolados brasileiros houve alterações detectáveis nestas regiões altamente conservadas.

Os resultados obtidos por seqüenciamento dos 576 nucleotídeos do gene G dos isolados brasileiros SHS BR 119 e SHS BR 121 revelaram 100 % de homologia com o isolado francês 1556, e 99% de homologia com o isolado inglês CVL 14/1, ambos representantes do subgrupo A, sugerindo que os isolados brasileiros pertencem a este subgrupo.

4. Conclusão

O experimento de diluição limitante revelou igual sensibilidade das técnicas de RT-PCR quimioluminescente e nPCR, com a vantagem da quimioluminescência não necessitar de reamplificação e portanto, diminuir o risco de contaminação que ocorre durante a segunda PCR no sistema de nPCR. A RT-PCR quimioluminescente é uma metodologia alternativa, específica e capaz de detectar com alta sensibilidade pequenas quantidades de cDNA.

O seqüenciamento dos produtos de 175 pb obtidos a partir de isolados de galinhas por nPCR revelaram 100% de identidade com isolados de perus descritos por Yu, Q., Davis, P. J., Barrett, T., Binns, M. M., Boursnell, M. E. & Cavanagh, D., 1991, depositadas no banco de dados e acessados via internet.

A análise com enzimas de restrição e o seqüenciamento indicam que isolados brasileiros pertencem ao subgrupo A descrito por Juhasz & Easton (1994). Este estudo representa um passo inicial para futuros estudos de variabilidade de PVA no Brasil e na América do Sul, a partir de isolados dos diferentes países e também das diferentes regiões do Brasil que permitirão a identificação da origem geográfica destes isolados e a qual subgrupo pertencem. Esta é a primeira caracterização de subgrupos de PVA feita na América do Sul e servirá como base para futuros estudos no Brasil e países vizinhos.

Referências

- Arns, C.W. & Hafez, H.M. Swollen Head Syndrome in poultry flocks in Brazil. In: Proc. 41st Western Poultry Diseases Conference, Sacramento, California, USA, 81-84, 1992.
- Arns, C.W. & Hafez, H.M., Isolation and identification of Avian Pneumovirus from broiler breeder flocks in Brazil. In: Proc. 44th Western Poul. Diseases Conference, Sacramento, California, USA, 124-125, 1995.
- Arns e colaboradores (comunicação pessoal).
- Baxter-Jones, C, Wilding, G.P. and Grant, M. Immunofluorescence as a potential diagnostic method for turkey rhinotracheitis. *Vet. Rec.*, 119, 600-601, 1986.
- Bell, I.G. & Alexander, D.J. Failure to detect antibody to turkey rhinotracheitis virus in Australian Poultry flocks. *Aust. Vet. J.*, 67, 232-233, 1990.
- Buys, S.B., Du Preez, J.H. & Els, H.J. Swollen head syndrome in chickens: a preliminary report on the isolation of a possible aetiological agent. *Journal of the South African Veterinary Association*, 60, 221-222, 1989.
- Buys, S.B. & Du Preez, J.H. A preliminary report on the isolation of a virus causing sinusitis in South Africa and attempts to attenuate the virus. *Turkeys* 28:36 and 46, 1980.

Cavanagh, D. & Barret, T. Pneumovirus-like characteristics of the RNAm and proteins of turkey rhinotracheitis virus. *Virus Res.*, 11, 241-256, 1988.

Collins, P.L., Dockens, L.E., Buckler-White, A., Olmsted, R.A., Spriggs, M.K., Camargo, E. & Coenlingh, K.V.W. Nucleotide sequences for the genejunctions of human respiratory syncytial virus reveal distinctive features for intergenic structure and gene order. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, USA 83, 4594-4598, 1986.

Collins, M.S., Gough, R.E. & Alexander, D.J. Antigenic differentiation of avian Pneumovirus isolates using polyclonal antisera in mouse monoclonal antibodies. *Avian Pathology*, 22, 469- 479, 1993.

Cook, J.K.A., Dolby, C.A., Southee D.J., Mockett, A.P.A. Demonstration of antibodies to turkey rhinotracheitis virus in serum from commercially reared flocks of chickens. *Avian Pathology*, 17, 403-410, 1988.

Cook, J.K.A., Jones, B.V., Ellis, M.M., Li Jing & Cavanagh, D. Antigenic differentiation of strains of rhinotracheitis virus using monoclonal antibodies. *Avian Pathology*, 22, 257-273, 1993a.

Cook, J.K.A., Kinloch, S. & Ellis, M.M. *In vitro* and *in vivo* studies in chickens and turkeys in strains of turkey rhinotracheitis virus isolated from two species. *Avian Pathology*, 22, 157-170, 1993b.

Decanini, E.L., Miranda, E.C. & Le Gros, F.X. Swollen head syndrome in heavy breeders in Mexico. in: *Proc. Poul. Conf 40th Western Poult.*, Acapulco, Mexico, 158-161, 1991.

Drouin, P., Toux, J.Y. & Picault, J.P. Le syndrome infectieux de la grosse tête chez l'espèce poule. *L'Aviculteur*, 460, 93-96, 1985.

Durigon, E.L., Erdman, D.D., Anderson, B.C., Holloway, B.Y. & Anderson, L.J. Immunochemiluminescent Southern blot assay for polymerase chain reaction detection of human parvovirus B19 DNA. *Molecular and Cellular Probes*, 8, 199-204, 1994.

Easton, A.J., 1997 in: <http://thunus.oikos.warwick.ac.uk/~bioac/apv.html>

El Houadfi, M., Haman, A., Vanmarcke, J. et al. Swollen head syndrome in broiler chickens in Morocco. In: *Western Poultry Disease Conference 40th*, 1991, Acapulco, Mexico, Proceedings, 126-127, 1991.

Giraud, P., Bennejean, G., Gittet, M. & Toquin, D. Turkey rhinotracheitis in France: preliminary investigations on a ciliostatic virus. *Vet. Rec.*, 119, 606-607, 1986.

Gough, R.E., Collins, M.S., Cox, W.J. & Chettle, N.J. Experimental infection of turkeys, chickens, ducks, geese, guinea fowl, pheasants and pigeons with turkey rhinotracheitis virus. *Vet. Rec.*, 123, 58-59, 1988.

Hafez, H.M. Swollen head syndrome : potential risk for broiler and broiler breeders. In: *XXVI-th Ann. Conv. Israel Branch WPSA*, Zichron, Yaacov, 39, 1988.

Hafez, H.M. Turkey rhinotracheitis : Review and experience in Germany. *Wien. Tieraerztl. Mschr.*, 78, 95-200, 1991.

Hafez, H.M. & Loehren, U. Swollen head syndrome: clinical observations and serology in West Germany. *Tieraerztl. Umschau.*, 97, 322-324, 1990.

Hafez, H.M. Comparative investigation on different turkey rhinotracheitis (TRT) virus isolates from different countries. *Deutsche Tieraerzliche Wochenschrift*, 99:486-488, 1992.

Hafez, H.M. The role of pneumovirus in swollen head syndrome of chickens. In: *Conferência APINCO de Ciência e Tecnologia Avícolas*. Santos, São Paulo, 15-20, 1992.

Heckert, R., Afshar, A., Myers, D.J. & Riva, J. Development and evaluation of an Enzyme-linked-Immunoabsorbent Assay for the detection of antibodies to avian Pneumovirus. *Avian Diseases* 38, 694-700, 1994.

Holtke, H.J., Sagner, G., Kessler, C. & Schmitz, G. Sensitive chemiluminescent detection of digoxigenin-labeled nucleic acids: a fast and simple protocol and its applications. *Biotechniques*, 12(1), 104-113, 1992.

- Jing, L., Cook, J.K.A., Brown, D.K.T, Shawn, K. & Cavanagh, D. Detection of turkey rhinotracheitis virus in turkeys using the polymerase chain reaction. *Avian Pathology*, 22, 771- 783, 1993.
- Johnson, P.R., Spriggs, M.K., Olmsted, R.A. & Collins, P.L. The G glycoprotein of human respiratory syncytial viruses of subgroups A and B: extensive sequence divergence between antigenically related proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 84, 5625-5629, 1987.
- Jones, P.R., Williams, R.A., Baxter-Jones, C., Savage, S.E. & Wilding, G.P. Experimental infection of laying turkeys with rhinotracheitis virus: distribution of virus in the tissues and serological response. *Avian Pathology*, 17, 841-850, 1987.
- Juhasz, K & Easton, A.J. Extensive sequence variation in the attachment (G) protein gene of avian pneumovirus: evidence for two distinct subgroups. *Journal of General Virology*, 75, 2873-2880, 1994.
- Ling, R. & Pringle, C.R. Turkey rhinotracheitis virus. *in vivo* and *in vitro* polypeptide synthesis. *Journal of General Virology*, 69, 917-923, 1988.
- Ling, R. & Pringle, C.R. Polypeptides of pneumonia virus of mice I. Immunological cross reactions and post-translational modifications. *Journal of General Virology*, 70, 1427-1440, 1989.

Ling, R., Easton, A. & Pringle, C.R. Sequence analysis of the 22 K, SH and G genes of turkey rhinotracheitis virus and their intergenic regions reveals a gene order different from that in other pneumoviruses. *Journal of General Virology*, 69, 917-923 ,1992.

Mase, M., Asahi, S., Imai, K., Nakamura, K. & Yamaguchi, S. Detection of turkey rhinotracheitis virus from chickens with swollen head syndrome by reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *J. Vet. Med. Sci.*, 58(4), 359-361, 1996.

Mc Dougall, J.S. & Cook, J.K.A. Turkey rhinotracheitis: Preliminary investigations. *Vet. Rec.*, 118, 206-207, 1986.

Morley, A.J. & Thomson, D.K. Swollen head syndrome in broiler chickens. *Avian Diseases*, 28, 338-343 ,1984.

Nagaraja, K.V., Sprenger, S. & Halvorson, D.A. in: <http://www.avian.umn.edu/pneumo.html>

O'Brien, J.D.P. Swollen head syndrome in broiler breeders. *Vet. Rec.*, 117, 619-620 ,1985.

Picault, J.P., Giraud, P., Drouin, P., Guittet, M., Bennejean, G., Lamande, J., Toquin, D. & Gueguen, C. Isolation of a TRTV-like virus from chickens with swollen head syndrome. *Vet. Rec.*, 121, 135, 1987.

Sambrook, J., Fritsch, E.F. & Maniatis, T. (1989) *Molecular cloning: A laboratory Manual*, 2nd (Cold Spring Harbor, NY, Cold harbor Laboratory Press).

Sanguinetti, C.J., Dias Neto, E. & Simpson, A.J.G. Rapid silver staining and recovery of PCR products separated on polyacrylamide gels. *Biotechniques*. 17(5), 915-919, 1994.

Wertz G.W., Collins, P.L., Huang, Y., Gruber, C., Levine, S & Ball, L. A. Nucleic acid sequence of the G protein gene of human respiratory syncytial virus reveals a usual type of viral membrane protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 82, 4075-4079, 1985.

Wieth, P.I., Chettle, R.E., & Collins, M.S. Antibodies to TRT in chickens with swollen head syndrome. *Vet. Rec.*, 120, 286-287, 1987.

Weisman Y., Strengel, C., Blumenkranz, R. & Segal, Y. Turkey Rhinotracheitis (TRT) in turkey flocks in Israel – virus isolation and serological responses. In: *Proceedings of the 37th West Poultry Disease Conference*, Davis, California, 67-69, 1988.

Yu, Q., Davis, P.J., Barret, T., Binns, M.M., Boursnell, M.E.G. & Cavanagh, D. Deduced amino acid sequence of the fusion (F) glycoprotein of turkey rhinotracheitis virus has greater identity with that of human respiratory syncytial virus, a pneumovirus, than that of paramyxoviruses and morbilliviruses. *Journal of General Virology*, 72, 75-8, 1991.

Yu, Q., Davis, P.J., Li, J. & Cavanagh, D. Cloning and sequencing of the matrix protein gene of rhinotracheitis reveal a gene order different from that of respiratory syncytial virus. *Virology*, 186, 426-434, 1992.

Yu, Q., Davis, P.J., Brown, T.D.K. & Cavanagh, D. Sequence and *in vitro* expression of the M2 gene of turkeys rhinotracheitis pneumovirus. *Journal of General Virology*, 73, 1355-1363, 1992.

Apêndice

Apêndice 1: *Preparo do gel de agarose*

1. Preparar tampão de eletroforese TBE (trisborato de EDTA) para preencher a cuba e preparar o gel.
2. Adicionar quantidade exata de agarose (1,2%) para uma quantidade medida de tampão de eletroforese em um Erlenmeyer ou um frasco de vidro com tampa. Aquecer em microondas para dissolver em agarose. Esfriar a solução à 60°C.
3. Posicionar o pente 0,5-1,0 mm acima da placa de modo que forme um perfeito poço quando for adicionada a agarose e colocar a agarose morna dentro do molde da cuba de eletroforese. O gel deve ter de 3 a 5 mm de espessura.
4. Após gelificação (30-45 minutos à temperatura ambiente), remover o pente e colocar a placa e o gel no tanque de eletroforese.
5. Adicionar tampão de eletroforese suficiente para cobrir o gel com espessura de aproximadamente 1 mm, contendo brometo de etídio (solução estoque de 10mg/ml em água, mantido à temperatura ambiente, em frasco âmbar ou embrulhado em papel alumínio).
6. Misturar as amostras de DNA com o tampão de aplicação no gel e lentamente aplicar a mistura dentro das fendas do gel submerso, usando micropipeta.
7. Fechar a tampa do tanque com gel, fixar a resistência de modo que o DNA migre em direção ao anodo. Usar voltagem de 1-5 V/cm (medida como distância entre os eletrodos).
8. Desligar a corrente elétrica e remover os cabos condutores e a tampa do tanque de gel. Observar em transiluminador U.V. e fotografar.

Apêndice 3 : Preparo do gel de poliacrilamida e coloração com nitrato de prata

1. Preparar tampão de eletroforese TBE (trisborato de EDTA) para preencher a cuba e preparar o gel.
2. Adicionar quantidade exata de poliacrilamida, APS e TEMED em um becker. Em seguida pipetar sobre a placa já montada.
3. Posicionar o pente e após solidificação (15-20 minutos) remover o pente, colocar a placa na cuba de eletroforese e adicionar o tampão de eletroforese.
4. Misturar as amostras de DNA (4 μ l) com o tampão de aplicação no gel (4 μ l) e lentamente aplicar a mistura nas fendas do gel submerso usando micropipeta.
5. Correr o gel por aproximadamente 30 minutos a 150V, corar com nitrato de prata (passos 7-11) e fotografar.
7. Transferir para 150 ml de solução fixadora (50 ml etanol 100%, 2 ml ácido acético, qsp. 300 ml água milliQ) e agitar suavemente por 3 minutos.
8. Adicionar nitrato de prata (0,3 g em 1-2 ml água milliQ) e agitar durante 5 minutos.
9. Lavar duas vezes em água milli Q, 10 segundos cada lavagem.
10. Adicionar solução reveladora (4,5 g NaOH, 1 ml formaldeído qsp 200 ml de água milliQ).
11. Após revelação colocar 150 ml da solução fixadora.
12. Empacotar o gel em celofane até secar completamente, em placa de vidro.
13. O gel seco pode ser recortado e armazenado à temperatura ambiente.

Apêndice 4: *Purificação do produto de PCR (Gene Clean II[®], Bio 101 Inc.)*

1. Cortar a banda do gel de agarose
2. Adicionar 3 volumes de solução estoque de NaI. Incubar 5 minutos a 45-55 °C para dissolver a agarose.
3. Adicionar 7 µl de suspensão Glassmilk[®] e incubar por 5 minutos.
4. Lavar 3 vezes com 400 µl de solução de lavagem [3.5 ml de concentrado “new wash”; 70.0 ml água milliQ e 77.5 ml de etanol 100% (manter a -20 °C)].
5. Secar completamente (“speed vacuum” 5 minutos) e eluir com 20 µl de água milliQ estéril
6. Ressuspender bem e manter em banho-maria (65 °C) por 2 minutos
7. Centrifugar, aspirar a solução aquosa contendo o DNA.

Apêndice 5: *Purificação em coluna MicroSpin*

1. Se o Sephacryl[®] S-200 estiver congelado, permitir descongelamento total antes de iniciar este procedimento. O frasco deve, então, ser armazenado a 4°C.
2. Inverter o frasco de Sephacryl[®] S-200 várias vezes para ressuspender a resina.
3. Antes de usar a coluna MicroSpin, remover a parte inferior. Quando a coluna não estiver sendo usada, esta parte pode então ser invertida para tampá-la.
4. Colocar a coluna MicroSpin (sem a tampa de baixo) em um tubo de microcentrifuga de 1,5 ml.
5. Transferir 500 µl da resina ressuspensa para a coluna.
6. Após ter tarado os tubos, centrifugar o tubo contendo a coluna cheia em microcentrifuga com rotor de ângulo fixo na velocidade máxima por 1 minuto e 30 segundos.
7. Remover o tubo da microcentrifuga, descartar o efluente e colocar a coluna MicroSpin em um novo tubo.
8. Aplicar vagarosamente a porção aquosa na amostra extraída de PCR (do procedimento I) no centro da cama da resina.
9. Centrifugar novamente, por 1 minuto em velocidade máxima.

Apêndice 6: PCR do produto ligado

Iniciador “reverse” para o pUC18, 0,3 µl; iniciador “forward” para o pUC18, 0,3 µl; Tampão, 1,5 µl; dNTPs, 1,5 µl; Taq, 0,15 µl; H₂O q.s.p. 15 µl

Controle positivo: pUC18

Controle negativo: H₂O

Programa:

1- 94°C, 5 min

2- 55 °C, 1 min

3- 72°C, 2 min

4- 94°C, 1 min

5- 55 °C, 1 min

6- 72°C, 2 min

7- passo 4, 40 X

8- 72°C, 7 min.

Apêndice 7: Meio LB com ágar + carbenicilina + Xgal + IPTG

Carbenicilina: 25 µl de carbenicilina (estoque 200µg/µl)/100 ml de meio

Xgal : 200 µl/250 ml de meio

IPTG (1M): 125 µl/250 ml de meio