

ANÁLISE DA VARIABILIDADE GENÉTICA DA GLICOPROTEÍNA S1 DO VÍRUS DA BRONQUITE INFECCIOSA DAS GALINHAS ORIGINÁRIOS DE CASOS CLÍNICOS OCORRIDOS NOS ANOS DE 2000, 2004 E 2009

Chanaisa Costa^{1*}; Tainá Eliza Klein²; Alessandra D'Avila da Silva³;
Giseli Aparecida Ritterbusch⁴; Iara Maria Trevisol⁵; Cintia Hiromi Okino⁵ e
Paulo Augusto Esteves⁵

¹Graduanda em Ciências Biológicas, Universidade do Contestado, Campus Concórdia, SC, estagiária da Embrapa Suínos e Aves, bolsista CNPq/PIBIC, e-mail: channaizsa@hotmail.com

²Graduanda em Ciências Biológicas, Universidade do Contestado, Concórdia, SC, bolsista da Embrapa Suínos e Aves

³Pós-Doutorado Empresarial, CNPq

⁴Doutoranda do Programa de Pós-graduação em Veterinária UFPel

⁵Embrapa Suínos e Aves

Palavras-chave: bronquite infecciosa das galinhas, glicoproteína S1, clonagem.

INTRODUÇÃO

O Vírus da Bronquite infecciosa das galinhas (VBI) é um membro da família *Coronaviridae*, que caracteriza-se por causar manifestações respiratórias, renais, reprodutivas e entéricas em aves de diversas idades (3). Tal enfermidade está amplamente distribuída sendo controlada, no Brasil, principalmente através da imunização da aves com vacinas produzidas a partir de um único tipo de VBI. O vírus é constituído por um genoma RNA de fita simples e sentido positivo com 27,6 kb (2;10) que codifica três proteínas principais: a nucleoproteína (N), a glicoproteína da matriz (M) e a glicoproteína de superfície (S) sendo esta composta por duas subunidades: S1 e S2 (4). Assim como acontece com outros RNA vírus, devido aos erros decorrentes da replicação viral pela enzima Transcriptase Reversa, ocorrem mutações que originam as chamadas Variantes do vírus. Suspeita-se que tais Variantes seriam responsáveis pela ocorrência de surtos de bronquite infecciosa em aves comerciais previamente imunizadas. Dessa forma, o objetivo do presente trabalho foi realizar a comparação das seqüências gênicas da S1 de estirpes de VBI previamente isoladas (através da amplificação, clonagem, sequenciamento e análise) frente a relevantes seqüências da S1 de VBI disponíveis no GenBank. Através de tal comparação foi possível verificar que os tipos de VBI aqui estudados agruparam-se juntamente com outros vírus da BI que vem ocorrendo no território Nacional formando um "Cluster"(14). Através da presente análise foi possível, também, verificar a não ocorrência de VBI considerados bastante virulentos e que ocorrem em outros lugares do planeta.

MATERIAIS E MÉTODOS

Foram utilizados no presente estudo VBI previamente isolados de sete casos clínicos distintos (249/00, 1496/00, 692/00, 331/00, 212/04, 116/09, 438/00) e mantidas na coleção de Microrganismos da Embrapa Suínos e Aves (CEMISEA). Inicialmente os vírus foram multiplicados em ovos embrionados tipo SPF (Specific Pathogen Free) após, foi realizada a extração do RNA viral colhido a partir do líquido cório-alantóide (LCA), seguida da síntese do cDNA. O cDNA foi então utilizado como molde para as reações de amplificação de um fragmento de 1720 pares de bases correspondente ao gene da glicoproteína S1. Os produtos amplificados foram clonados e o material utilizado para transformação de células de *E. coli* DH5 α (12). Os clones transformantes foram cultivados em meio LB com ampicilina e, posteriormente, o DNA plasmidial foi extraído e submetido à clivagem com enzima de restrição *Eco* RI para liberação do inserto. Os produtos de tais digestões foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio e visualizados sob luz UV. O DNA clonado foi submetido a sequenciamento através da metodologia de Terminação de Cadeia (ABI3130 Big Dye Terminator, v3.1 Cycle Sequencing Kit, Life Technologies) e os dados gerados foram avaliados utilizando-se os softwares Sequence Scanner (ABI) e VECTOR NTI (Invitrogen) para formação das seqüências consenso. As seqüências foram então submetidas ao programa BLAST (1), para verificação do percentual de homologia com demais seqüências de VBI. A robustez do alinhamento foi avaliada utilizando-se o software Guidance (11), sendo o software MUSCLE (4), o modelo matemático escolhido para a realização do alinhamento. O alinhamento foi também avaliado através do cálculo da Média Geral da Distância (Overall Mean Distance) utilizando-se o software MEGA 5 (13). Os softwares BioEdit 7.0.5 (9) e MEGA 5 foram utilizados na construção da análise filogenética. O modelo que representa as relações de homologia entre as seqüências alinhadas foi construído utilizando-se o método de Máxima Verossemelhança (Maximum Likelihood-Hall) (7,8), com os seguintes parâmetros: Kimura-2/distribuição Gamma (G) e 100 replicações (5).

RESULTADOS E DISCUSSÕES

Os resultados obtidos no presente trabalho estão de acordo com os resultados amplamente divulgados nos periódicos da área que, através do sequenciamento da S1, demonstraram ser possível a formação de dois grupos distintos de IBV, um considerado Clássico e outro Variante. Além disso, foi possível notar que as sequências oriundas dos vírus isolados no Brasil formaram um grupo (dentro do grupo de amostras Variantes) que destaca-se dos demais. Fica claro, também, que parece não haver a ocorrência, no Brasil, de VBIG relevantes que ocorrem fora do país. O que não justificaria, por exemplo, a inclusão de tal tipo de vírus em vacinas utilizadas no território nacional. Ainda, de acordo com nossos resultados, parece haver alguma relação entre o grau de homologia entre as sequências analisadas e a data e local de origem dos vírus utilizados no presente estudo.

CONCLUSÕES

No presente trabalho através da amplificação, sequenciamento e análise filogenética do gene S1 de VBIG, foi possível demonstrar que os vírus previamente isolados de sete casos clínicos ocorridos no território Nacional agruparam-se com outros VBIG previamente isolados em território Nacional, formando um agrupamento dentro do grupo de vírus considerados Variantes de VBIG. Além disso, fica claro que, até o presente momento, não foi detectada a presença de vírus considerados de alta virulência dentro do território Nacional.

REFERÊNCIAS

1. ALTSCHUL, S.F.; MADDEN, T.L.; SCHAFFER, A.A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W.; LIPMAN, D.J.; Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 25, 3389–3402; 1997.
2. CAVANAGH, D. **Coronavirus avian infectious bronchitis vírus**. *Vet. Res., Les Ulis*, v. 38, n. 22, p. 281-297, 2007.
3. DEZENGRINI, R.; LOVATO, L. T.; Coronaviridae. In: FLORES, Eduardo Furtado. **Virologia Veterinária**. 1. ed. Santa Maria: Editora UFSM, 2007. c.24, p.615-636.
4. EDGAR RC, MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res.* 2004 Mar 19;32(5):1792-7.
5. EFRON, B; HALLORAN, E; HOLMES, S; 1996. **Bootstrap confidence levels for phylogenetic trees**. *PNAS* 93, 13429–13434.
6. FÁBIO, José D; BUITRAGO, L; Bronquite infecciosa das galinhas. In FÁBIO, José Di. **Doenças das Aves**. 2. ed. Campinas: Fundação APINCO de ciência e Tecnologia Avícolas, c.5.4,p.631-648, 2009.
7. HALL, B.G; **Building Phylogenetic Trees from Molecular Data with MEGA**. *Mol Biol Evol.* 2013.
8. HALL, B.G; **Phylogenetic Trees Made Easy: A How-To Manual**. 4th Edition. Sinauer, Assoc. Sunderland, MA; 2011
9. HALL, T.A; BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp.* 1999.
10. PENA, L. J. SANTOS, B. M.; ROBERTI, R. P.; MARIN, S. Y. **Bronquite infecciosa das galinhas**. *Arquivos do Instituto Biológico, São Paulo*, v. 72, n. 3, p. 397-404, 2005.
11. PENN, O; PRIVMAN, E; ASHKENAZY, H; LANDAN, G; GRAUR, D. AND PUPKO, T. GUIDANCE: a web server for assessing alignment confidence scores. *Nucleic Acids Research*, 2010.
12. SAMBROOK, J., RUSSEL, D.W., 2001. **Molecular Cloning: A laboratory Manual**, third ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, v.1 p. 1.31–1.34.
13. TAMURA, K; PETERSON, D; PETERSON, N; STECHER ,G; NEI ,M; AND KUMAR S (2011) MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. **Molecular Biology and Evolution** (submitted).
14. VILLARREAL, L.Y.B; BRANDÃO, J.L; CHACÓN, A.B.S; SAIDENBERG, M.S; ASSAYAG, R.C; **Molecular Characterization of Infectious Bronchitis Virus Strains Isolated from the Enteric Contentes of Brazilian Laying Hens and Broilers**. Source: Avian Disease. Published by: American Association of Avian Pathologists (2007).