

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Faculdade de Veterinária
Programa de Pós-Graduação em Veterinária



Tese

**Produção de imunobiológicos para o diagnóstico do vírus da bronquite
infecciosa das galinhas**

Paula Fonseca Finger

Pelotas, 2015

Paula Fonseca Finger

**Produção de imunobiológicos para o diagnóstico do vírus da bronquite
infecciosa das galinhas**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Veterinária da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Ciências (área de concentração: Sanidade Animal).

Orientador: Fabricio Rochedo Conceição

Pelotas, 2015

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação na Publicação

F498p Finger, Paula Fonseca

Produção de imunobiológicos para o diagnóstico do vírus da bronquite infecciosa das galinhas / Paula Fonseca Finger; Fabricio Rochedo Conceição, orientador. — Pelotas, 2015.
87 f. : il.

Tese (Doutorado) — Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, 2015.

1. BIG. 2. Nucleoproteína. 3. Proteína recombinante. 4. Escherichia coli. 5. Imunodiagnóstico. I. Conceição, Fabricio Rochedo, orient. II. Título.

CDD : 636.6

Paula Fonseca Finger

Produção de imunobiológicos para o diagnóstico do vírus da bronquite infecciosa
das galinhas

Data da Defesa: 17/12/2015

Banca examinadora:

Prof. Dr. Fabricio Rochedo Conceição (Orientador)
Doutor em Ciências pela Universidade Federal de Pelotas

Prof. Dra. Silvia de Oliveira Hübner
Doutora em Ciências Veterinárias pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof. Dr. Paulo Augusto Esteves
Doutor em Ciências Veterinárias pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof. PhD. Fábio Pereira Leivas Leite
PhD em Sanidade Animal pela Universidade de Wiscosin – Madison (USA)

**Dedico esse trabalho à minha família, minha base para que eu conseguisse
cumprir essa longa caminhada.**

Agradecimentos

Aos meus pais, Nóris e Francisco, pelo amor, preocupação, incentivo e, acima de tudo, por abrirem as portas do meu futuro com o estudo que me proporcionaram, dando o primeiro passo para que eu chegasse até aqui, sem vocês nada disso teria acontecido. Amo vocês.

À minha irmã, Alice, pelo apoio, amizade, incentivo, carinho e amor. Obrigada por estar ao meu lado, me ajudar sempre que eu precisei e ser um exemplo de profissional. Com certeza és meu orgulho e em quem eu me espelho muito.

Ao meu namorado, Henrique, pelo apoio, compreensão, confiança, paciência, carinho e amor que foram fundamentais, além da parceria e do companheirismo para que eu realizasse as atividades durante os finais de semana. Meu eterno agradecimento.

Ao meu orientador Fabricio, por confiar no meu trabalho e me orientar em tudo que precisei. Acima de tudo, obrigada pelo incentivo, pelo aprendizado e pela amizade, que foram fundamentais para que conseguíssemos essa vitória juntos.

À minha eterna orientadora Silvia, por me dar a primeira oportunidade em poder atuar na linha da pesquisa e no laboratório, sempre me incentivando a ir mais longe. Obrigada por abrir as portas e estar sempre disposta a me ajudar.

Ao meu eterno orientador Paulinho, por todas as palavras de incentivo e por confiar em mim a oportunidade de colaborar com os projetos vinculados à Embrapa Suínos e Aves. Fostes fundamental para que eu chegasse até aqui. Muito obrigada!

Ao meu laboratório do coração, Lab 4, muito obrigada por todos que sempre me apoiaram e me ajudaram no início dessa caminhada, em especial aos amigos Alceu, Mateus, Itauá, Lívia, Dênis, Vitória e todos que já passaram por lá. Com certeza vocês foram muito importantes para que essa etapa fosse concluída.

Ao professor Fabio Leite, meu eterno agradecimento por sempre disponibilizar o laboratório para que eu realizasse os trabalhos, sempre me ajudar quando precisei e pela alegria que contagia a todos, inclusive nas festas de laboratório que podemos vivenciar juntos. Muito obrigada!

À minha amiga Luana, pelos ensinamentos e companheirismo dentro e fora do laboratório. És um exemplo de dedicação, muito obrigada por tudo.

Às minhas amigas Michele, Bilica e Carol, por sempre me apoiarem e pela amizade, que fizeram com que esses anos fossem maravilhosos.

Aos amigos do Laboratório de Imunologia Aplicada, Marcelo, Carol, Marcos, Giana, Clóvis, Gustavo, Carlos e demais, meu agradecimento pelos ensinamentos e companheirismo, com certeza a amizade de vocês foi fundamental para que essa etapa fosse vencida.

Aos amigos do Laboratório de Virologia, agradeço por todo apoio durante esses anos e pela amizade que será eterna. Vocês moram no meu coração!

A todos que contribuíram de alguma forma para essa conquista.

Muito obrigada!

“Toda história tem um fim, mas na vida todo fim é apenas um novo começo” (autor desconhecido)

Resumo

FINGER, Paula Fonseca. **Produção de imunobiológicos para o diagnóstico do vírus da bronquite infecciosa das galinhas.** 2015. 87f. Tese (Doutorado em Ciências) - Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2015.

A bronquite infecciosa das galinhas (BIG) é uma enfermidade viral altamente contagiosa que causa predominantemente lesões respiratórias que se manifestam clinicamente por espirros e estertores tráqueo-bronquiolares, podendo levar a sinais mais severos, com diminuição na fertilidade e redução da produção de ovos. O vírus da bronquite infecciosa das galinhas (IBV) codifica quatro proteínas estruturais, sendo a nucleoproteína uma das mais importantes na geração de resposta imune das aves, sendo também a mais abundante e, ainda, se caracteriza por possuir a sequência de aminoácidos bem conservada. A vacinação é a principal forma de controle da enfermidade, porém surtos da doença ainda ocorrem com frequência, causando grandes prejuízos na avicultura. Em vista disso, o objetivo deste trabalho foi produzir imunobiológicos que possam contribuir no monitoramento sorológico das aves. Para tanto, a proteína N foi expressa em *Escherichia coli*, obtendo-se uma proteína recombinante (rN) na forma solúvel. A partir dessa proteína recombinante, foi padronizado um teste ELISA e também produzidos anticorpos monoclonais frente a rN. Para o teste de ELISA foram utilizados 389 soros, os quais já haviam sido testados pelo *Kit* comercial, sendo o ELISA padronizado e comparado ao IDEXX. Os resultados obtidos para o teste ELISA demonstraram uma sensibilidade de 90,16% e especificidade de 90,34% ao comparar com o *Kit* comercial. Para o anticorpos monoclonais, foram selecionados três principais hibridomas, sendo estes testados frente a diferentes vírus aviários. Os anticorpos monoclonais produzidos foram específicos ao reconhecer apenas o vírus da bronquite e a proteína recombinante (rN), não havendo reação cruzada com outros vírus aviários. Os insumos produzidos durante o trabalho são promissores para utilização de rotina em laboratório que realiza diagnóstico de BIG.

Palavras-chave: BIG; nucleoproteína; proteína recombinante; *Escherichia coli*; imunodiagnóstico

Abstract

FINGER, Paula Fonseca. **Production of immunobiologicals for the diagnosis of infectious bronchitis virus of chickens.** 2015. 87f. Thesis (Doctor degree in Sciences) - Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2015.

The infectious bronchitis (IB) is a highly contagious viral disease that causes predominantly respiratory injuries that manifest clinically and invariably by sneezing and tracheo-bronchial throes and may lead to more severe signs with decreased fertility and reduced egg production. The infectious bronchitis virus (IBV) encodes four major structural proteins, the nucleoprotein being the most important in the immune response of the birds, since it is abundant and has a well conserved sequence. Vaccination is the primary means of disease control but outbreaks still occur frequently, causing major losses in poultry. As a result, the objective was to produce immunobiologicals that may contribute to the serological monitoring of birds. Therefore, the N protein was expressed in *Escherichia coli*, yielding a recombinant protein (RN) in soluble form. From this recombinant protein was a standard ELISA test and also produced monoclonal antibodies against rN. For the ELISA test were used 389 sera, which had been tested by the commercial kit, with the standardized ELISA and compared to IDEXX. The results obtained for the ELISA test showed a sensitivity of 90.16% and a specificity of 90.34% when compared to the commercial kit. For monoclonal antibodies, three primary hybridomas were selected, these being tested against different avian viruses. The produced monoclonal antibodies were specific to only recognize the virus bronchitis and recombinant protein (rN), with no cross-reactivity with other avian viruses. The inputs produced during work are promising for routine use in the laboratory that performs IB diagnostic.

Keywords: IB; nucleoprotein; recombinant protein; *Escherichia coli*; imunodiagnosis

Lista de Figuras

Artigo 2

Figura 1	Amplificação e clonagem do gene da proteína N do VBIG.....	50
Figura 2	Avaliação da expressão da proteína rN (A). Caracterização da proteína rN (B).....	51
Figura 3	Análise através da curva ROC do ELISA com a rN comparado ao IDEXX.....	52
Figura 4	Avaliação de diferentes lotes de produção de rN em ELISA indireto utilizando soros positivos e negativos para VBIG.....	52
Figura 5	Reação da proteína rN em <i>Western Blot</i> frente a soros de aves....	53

Artigo 3

Figura 1	Análise da expressão da proteína N A- Eletroforese em gel de poliacrilamida 12%.....	67
Figura 2	Análise dos MAb's por eletroforese em gel de poliacrilamida 12%..	68
Figura 3	Western Blot frente aos MAb's B7 e E2 e frente ao soro policlonal rN produzido em camundongo.....	68
Figura 4	Curva de titulação dos MAb's B7 e D3 frente à proteína rN.....	69
Figura 5	ELISA para avaliar a especificidade dos MAb's anti-rN frente a diferentes antígenos vacinais de vírus aviários.....	69

Lista de Tabelas

Artigo 1

Tabela 1	Métodos de diagnóstico utilizados para detecção da BIG.....	39
----------	---	----

Artigo 2

Tabela 1	Análise dos soros testados em ELISA comercial e ELISA rN classificados quanto à categoria e à presença de anticorpos para VBIG.....	54
----------	---	----

Lista de Abreviaturas e Siglas

BIG	Bronquite infecciosa das galinhas
cDNA	DNA complementar
dNTPs	Desoxirribonucleotídeos
ELISA	<i>Ensaio imunoenzimático do tipo ELISA</i>
EUA	Estados Unidos da América
LCA	Líquido córioalantoide
M41	cepa Massachusetts
MAbs	Monoclonal Antibodies
OIE	Organização mundial da saúde animal
OMS	Organização mundial da saúde
PCR	Reação em cadeia da polimerase
RT	Transcriptase reversa
SPF	<i>Specific Pathogen Free</i>
VBIG	Vírus da bronquite infecciosa das galinhas

Sumário

1 Introdução.....	13
2 Revisão da Literatura.....	17
2.1 Artigo 1.....	17
3 Hipótese.....	40
4 Objetivos.....	41
4.1 Objetivo geral.....	41
4.2 Objetivos específicos.....	41
5 Artigos.....	42
5.1 Artigo 2.....	42
5.2 Artigo 3.....	61
6 Considerações Finais.....	75
Referências.....	76
Anexos.....	86

1 Introdução

A avicultura é um dos setores mais importantes do agronegócio brasileiro e também o que mais cresceu nos últimos anos (EMBRAPA, 2012). Atualmente o Brasil é o 3º maior produtor de carne de frango, atrás apenas dos EUA (Estados Unidos da América) e da China (OIE, 2013). Por se tratar de um amplo mercado em expansão, a avicultura vem crescendo também em âmbito de tecnologias, com o surgimento de novos fármacos e vacinas desenvolvidos com o objetivo de evitar a disseminação de enfermidades entre os animais alojados (RESENDE, 2003).

Dentre as doenças que acometem as aves e causam grandes prejuízos econômicos aos produtores, está a bronquite infecciosa das galinhas (BIG). Trata-se de uma doença de curso agudo, altamente contagiosa que leva a maior susceptibilidade a infecções secundárias, e resulta, conseqüentemente, em perdas consideráveis da produtividade de criações comerciais de frangos de corte, galinhas de postura ou aves reprodutoras (CAVANAGH, 2007).

O vírus da bronquite infecciosa das galinhas (VBIG) é o agente causador da bronquite infecciosa (BIG), doença que continua causando grandes prejuízos na produção avícola (AHMED et al., 2014).

A doença foi descrita pela primeira vez nos EUA, em 1931, por Schalk & Hawn e, dois anos após, Bushnell & Brandly notificaram uma doença idêntica, mas diagnosticaram-na como laringotraqueíte infecciosa (LT). Em 1936, Beach & Schalm provaram, por meio de estudos de imunidade cruzada, que o agente da BIG era um vírus diferente do vírus da LT e denominaram-no de vírus da bronquite infecciosa (VBI). No início da década de 60, a doença já havia sido notificada em quase todo o mundo (MUNEER et al., 1988).

A BIG está incluída na lista da OIE (Organização Mundial de Saúde Animal), FAO (Organização para a Agricultura e Alimentação) e OMS (Organização Mundial de Saúde) como doença transmissível de notificação anual, devido à importância socioeconômica e implicações sanitárias, podendo trazer alguma repercussão a qualquer momento no comércio internacional de produtos e animais.

O VBIIG acomete aves de todas as idades, causando sintomas respiratórios, alta morbidade nas aves adultas e alta mortalidade em aves jovens. (CAVANAGH & NAQI, 2003). O sistema respiratório é o sitio de replicação primário do vírus, sendo posteriormente distribuído para outros órgãos, incluindo os rins e órgãos reprodutivos, resultando em danos na produção de ovos (GUANGLIANG LIU et al., 2012). Atualmente, a BIG é endêmica praticamente em todos os países que criam aves e, no Brasil, é considerada a principal doença respiratória avícola (DI FÁBIO et al., 2000).

Pertencente à ordem *Nidovirales*, família *Coronaviridae* e gênero *Coronavírus*, o VBIIG possui proteínas estruturais, tais como do nucleocapsídeo (N) que está associada ao genoma viral para formar o nucleocapsídeo, de superfície (S) que se divide em duas subunidades, S1 e S2, e as proteínas de membrana (M) e do envelope (E) que estão inseridas no envelope que circunda o nucleocapsídeo (CAVANAGH; NAQI, 1997; DI FÁBIO; ROSSINI, 2000). Dentre as proteínas virais, podemos ressaltar a importância da proteína N, que possui uma sequência de nucleotídeos no seu genoma bastante conservada e a glicoproteína S, cuja porção S1 possui regiões hipervariáveis e está em constante mutação (MCKINLEY et al., 2008).

A S1 é responsável pela infectividade viral e possui determinantes antigênicos que induzem a formação de anticorpos neutralizantes, sendo uma das principais indutoras da resposta imune protetora contra a infecção pelo VBIIG e de fundamental importância na imunoprofilaxia (ABDEL-MONEIM et al., 2014). Além disso, ela é a base dos testes de diagnósticos que têm sido utilizados para identificar e caracterizar diferenças entre cepas virais (KEELER et al., 1998; COOK et al., 1997). Variações antigênicas descritas entre diferentes isolados do VBIIG são devido a mutações no gene da proteína S1, o que pode resultar na existência de diversos sorotipos, com pouca proteção cruzada entre eles (CAVANAGH, 2007).

Também bastante importante, tanto na arquitetura viral quanto nas relações com o hospedeiro, a proteína N é formada por 409 aminoácidos com uma massa molecular predita de cerca de 50 KDa (MACNAUGHTON et al., 1977; BOURSNEILL et al., 1985). Geralmente, tal proteína apresenta homologia entre as diferentes cepas de IBV ($91 \pm 96.5\%$), sendo uma proteína bastante imunogênica e abundantemente expressa durante o processo de replicação viral (PRADHAN et al., 2014). Além disso, ela é capaz de induzir a produção de anticorpos específicos e de linfócitos T

efetores específicos, sobretudo com ação citotóxica (SNEED et al., 1989; SEO et al., 1997). Dessa forma, a proteína N do VBI é o antígeno de eleição para emprego em ensaios de diagnóstico, tanto para detecção quanto mensuração de anticorpos nos soros das aves (NDIFUNA et al., 1998). Epítomos para linfócitos T já foram identificados na proteína N do VBI e demonstraram induzir respostas contra o vírus (BOOTS et al., 1992). A detecção de anticorpos contra a proteína N pode ocorrer nos soros das aves após duas semanas da vacinação com vacina atenuada (IGNJATOVIC & GALLI, 1995).

Como acontece com a maioria dos vírus cujo genoma é composto por RNA, a ocorrência de mutações e recombinações são dois importantes eventos que podem alterar significativamente o genoma dos coronavírus (LEE et al., 2010). Por conseguinte, acredita-se que subpopulações virais podem emergir como resultado da ocorrência destes eventos (JACKWOOD et al., 2012). A mutação do VBI pode ocorrer pela recombinação entre os genomas de diferentes vírus circulantes em um mesmo hospedeiro ou até mesmo com as próprias amostras vacinais vivas atenuadas que podem recombinar com estirpes de campo circulantes, podendo resultar em novos vírus. Em vista disso, a introdução de novos sorotipos vacinais tem sido evitada, uma vez que existe o risco inerente de surgimento de novos vírus (MCKINLEY et al., 2008 e 2011).

Como alternativas de controle de surtos de VBI ainda se utiliza vacinas do sorotipo Massachusetts, cuidados essenciais de manipulação das vacinas e estratégias de revacinação, buscando um reforço na tentativa de atingir uma resposta imune mais eficiente (ASSAYAG, 2009; MONTASSIER, 2008). Porém, mesmo com diferentes estratégias de vacinação, o VBI continua causando significativas perdas econômicas na produção avícola de corte e postura no Brasil e no mundo. (MONTASSIER, 2008; ASSAYAG, 2009).

Com relação ao diagnóstico laboratorial, verifica-se que o mesmo depende de técnicas diretas envolvendo o isolamento e a identificação genômica ou fenotípica (sorotipos, protectotipos e patotipos) do vírus, e/ou de métodos indiretos, destinados à detecção de anticorpos específicos. Geralmente, os métodos indiretos são realizados a partir de Kits comerciais de ELISA, os quais são importados e apresentam um custo muito elevado para a sua utilização com frequência (WANG et al., 2002; BERNARDINO, 2004). Além disso, deve ser considerado que o diagnóstico rápido e a determinação do estado de imunidade de um plantel de aves

são aspectos críticos para se conseguir uma melhor condição de controle da IB. Para tanto, foi comprovado que os ensaios imunoenzimáticos quando realizados com padrões apropriados, indicam com elevada acurácia as concentrações de anticorpos específicos contra IBV e podem facilitar o monitoramento do estado imunitário em criações com grande número de aves (SNYDER et al., 1983).

Devido à relevância da ocorrência de BIG nos plantéis de aves da indústria avícola nacional, existe uma grande necessidade por alternativas de proteção frente ao VBIG, sendo que a utilização de novas tecnologias visando o desenvolvimento de imunobiológicos (vacinas e antígenos para o desenvolvimento de métodos de diagnóstico e anticorpos monoclonais), por exemplo, é uma importante área de estudo (JOHNSON et al., 2003; ZENHAM, 2010).

Sendo assim, métodos moleculares visando o diagnóstico da BIG, como a expressão de proteínas recombinantes vem sendo bastante estudados. Em estudo realizado por Pradhan et al. (2014), o gene que codifica para a proteína N do VBIG foi clonado e expresso em sistema procarioto, sendo, posteriormente, utilizada a proteína recombinante purificada para desenvolver um ensaio imunoenzimático (ELISA), com a finalidade de mensurar anticorpos específicos em soro de galinhas. O teste obteve uma especificidade de 95,8% e sensibilidade de 96,8%, quando comparado com o *kit* IDEXX, que apresenta como antígeno o vírus inteiro, demonstrando o potencial de proteínas recombinantes como imunobiológicos. A utilização de células de insetos é outra opção para a produção de proteínas heterólogas, uma vez que possui por característica altos níveis de expressão, sistema que foi utilizado por Abdel-Moneim et al. (2014) também para a expressão da proteína N do VBIG, obtendo sucesso quando utilizada em teste do tipo ELISA, o qual apresentou 100% de especificidade e acurácia.

Em vista disso, sabe-se da necessidade de um antígeno para utilização em ELISA com o qual seja possível realizar um monitoramento sorológico das aves. Para isso, é de grande valia a produção de proteína N da cepa Massachusetts, uma vez que é a única cepa liberada para vacinação no Brasil.

Em vista disso, o objetivo do estudo foi produzir a nucleoproteína do VBIG de forma recombinante, para sua avaliação como antígeno em teste ELISA. Além disso, anticorpos monoclonais também foram produzidos frente a essa proteína visando a elaboração de imunobiológicos que possam ser utilizados no diagnóstico da BIG.

2 Revisão da Literatura

2.1 Artigo 1

Avian Infectious Bronchitis: Diagnostic, control and biotechnological advances

Paula Fonseca Finger Luana Alves Dummer Carolina Georg Magalhães
Paulo Augusto Esteves Alessandra D'Avila da Silva Giseli Ritterbusch Silvia de
Oliveira Hübner Fábio Pereira Leivas Leite Fabricio Rochedo Conceição

Artigo de Revisão submetido à Revista Ciência Rural

Avian Infectious Bronchitis: Diagnostic, control and biotechnological advances**Bronquite Infecciosa das galinhas: Diagnóstico, controle e avanços
biotecnológicos**

**Paula Fonseca Finger^{1*} Luana Alves Dummer^{II} Carolina Georg Magalhães^I
Paulo Augusto Esteves^{III} Alessandra D'Avila da Silva^{III} Giseli Ritterbusch^{IV} Silvia de
Oliveira Hübner^{IV} Fábio Pereira Leivas Leite^{II} Fabricio Rochedo Conceição^I**

-REVISÃO BIBLIOGRÁFICA-**ABSTRACT**

Avian infectious bronchitis (IB) is a disease responsible for important economic losses in the poultry production, affecting both broilers and laying birds, being the avian infectious bronchitis virus (IBV), a member of the *Coronaviridae* family, its causative agent. As it happens with most viruses with RNA genome, the occurrence of mutations and recombination are two important events that can significantly alter the genome of coronaviruses. In Brazil, the control of the disease is mainly made through vaccination programs, along with the adoption of biosafety measures. Thus, given the social and the economic relevance of IB, this work highlights important characteristics of IBV, as well as aspects of its diagnosis, control, and biotechnological advances with the objective to provide improvements in control and a better understanding this relevant illness.

^ILaboratório de Imunologia Aplicada, Centro de Desenvolvimento Tecnológico (CDTec), Universidade Federal de Pelotas, RS, Brazil E-mail: paulaafinger@hotmail.com*Autor para correspondência.

^{II}Laboratório de Bacteriologia, Centro de Desenvolvimento Tecnológico (CDTec), Universidade Federal de Pelotas, RS, Brazil

^{III}Laboratório de Virologia e Imunologia, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, RS, Brazil

^{IV}Embrapa Suínos e Aves, Concórdia, SC, Brazil

Keywords: IBV, IB, aviculture, biotechnology.

RESUMO

Acredita-se que a bronquite infecciosa das galinhas (BIG) seja responsável por grandes perdas na produção avícola, tanto de aves de corte como de postura, sendo o vírus da bronquite infecciosa das galinhas (VBIG), membro da família *Coronaviridae*, causador de tal enfermidade. Como acontece com a maioria dos vírus cujo genoma é composto por RNA, a ocorrência de mutações e recombinações são dois importantes eventos que podem alterar significativamente o genoma dos coronavírus. No Brasil, o controle da doença é realizado principalmente através de programas de vacinação juntamente com medidas de biossegurança. Dessa forma, dada a importância econômica e social da BIG, o presente trabalho destaca algumas características importantes do VBIG, bem como considerações sobre o diagnóstico, controle e avanços biotecnológicos conquistados, a fim de proporcionar melhorias no controle, além de um maior entendimento a respeito da ocorrência desta relevante enfermidade.

Palavras-chave: VBIG, BIG, avicultura, biotecnologia.

INTRODUCTION

Avian infectious bronchitis (IB) is a highly contagious acute disease that affects domestic fowl of the *Gallus gallus domesticus* species. Its causative agent is the avian infectious bronchitis virus (IBV), which infects cells mainly from the respiratory and genitourinary tracts of chicken (PENA et al., 2005). The disease was first described in the north of United States of America in 1931 by SHALK & HAWN, and in the following decade, its impact was already felt in the egg production industry. Later, in the 60s, the nephrosis-nephritis syndrome was described in Australia, making evident the dispersion of IBV, as well as the disease relevance for the poultry industry worldwide (KING & CAVANAGH, 1991).

According to the International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV), in 2008 the IBV species was renamed to *Avian coronavirus*, and is grouped in order *Nidovirales*, family *Coronaviridae*, subfamily *Coronavirinae*, genera *Gammacoronavirus* (<http://www.ictvonline.org/index.asp>). The viruses belonging to this family has, as structural characteristic, the presence of club-shaped protein projections with approximately 20 nm forming spikes in the viral envelope, which gives them the aspect of a corona-like, hence the name *Coronaviridae* (CAVANAGH, 2007).

Based on genetic and antigenic criteria, the coronaviruses are divided in four genus: Alpha (known as group 1), Beta (known as group 2), Delta (recently recognized by ICTV) and Gammacoronaviruses (known as group 3), being the IBV classified as Gammacoronavirus (JACKWOOD et al., 2012). IBV virions have a typical coronavirus pleomorphic shape, with viral envelope of 120 nm in diameter and genome consisting of positive sense single strand RNA genome with approximately 27.6 kb in length, which encodes non-structural (accessory proteins) and structural proteins. The main proteins in the viral structure are: the spike protein (S), envelope (E), matrix (M) and the nucleocapsid protein (N) (CAVANAGH, 2007), and, of these, two have their immunogenic characteristics recognized: the N protein, which is highly conserved, and the S protein, less conserved and composed by two subunits: S1 and S2 (CAVANAGH, 2007).

Regarding its pathogenesis, the IBV initially replicates in ciliated and mucus-secreting epithelia from the upper respiratory tract after 18 to 36 h of incubation, spreading to other tropism sites during viremia. The virus can cause damages in the respiratory tract and other epithelial surfaces, including the genitourinary tract, the gastrointestinal tract and the oviduct (PENA et al., 2005). Lesions in the trachea characterize the main pathological findings, since the trachea is the principal site for viral replication; however, lesions may also be found in

kidneys with different degrees of severity, which are caused by viral serotypes called nephropathogenic (PENA et al., 2005).

As with most RNA viruses, mutation and recombination are two important events that alter the genome of coronaviruses. Consequently, viral subpopulations may emerge as a result of these genetic events (LEE et al., 2010; JACKWOOD et al., 2012). The mutations can occur by genome recombination of different viruses circulating in the same host, or between attenuated field strains present in vaccines (MONTASSIER, 2010).

In spite of these indications, several other factors are involved in the process of viral selection and that are also relevant when outbreaks of the disease happen in flocks of birds previously immunized, as the adequate manipulation and vaccine administration (TORO et al., 2012; DHAMA et al., 2014). It is worth mentioning that some authors emphasize that the use of live attenuated vaccines, although it may promote higher levels of protection to birds (LIM et al., 2012; FERNANDO et al., 2013), could facilitate the development of new variants of IBV (MCKINLEY et al., 2011). Also, it is important to perform constant surveillance (with isolation and characterization) of prevalent IBV strains in a particular geographic area, as well as to perform *in vivo* studies with these viral samples, once understanding the IBV evolution is essential to the development of new strategies for control and prevention of the disease (DHAMA et al., 2014).

According to TORO (2012), some scientists use the concept of quasispecies to explain the evolution of IBV. The concept grew outside the molecular evolution theories, which was originally proposed by EIGEN (1971) as determinant kinetic theory to all molecular species with reproductivity, being later modified to a stochastic theory (KIMURA, 1991). However, according to MINSKAIA (2006), the theory of quasispecies will be further related to viruses that show a higher mutation rate than the coronavirus, once the latter possesses its

exoribonuclease domain associated with their RNA polymerase RNA dependent, which decrease error rates.

As an alternative to control the outbreaks of IBV in Brazil, vaccines developed with the serotype Massachusetts are used, together with essential care in the manipulation of these vaccines, as well as in the elaboration of immunization strategies, seeking for reinforcement to achieve the stimulation of an efficient immune response (MONTASSIER, 2008).

Considering the situation of the IBV in Brazil and worldwide, these review highlights important aspects of both virus and diseases, as well as its diagnostic, control and biotechnological efforts achieved so far.

DEVELOPMENT

Control

The control of IB in Brazil is performed by the implementation of vaccination programs together with biosecurity measures to avoid or decrease losses, once, due to the reported history from professionals in the poultry sector, the current vaccination strategies used are not presenting satisfactory efficiency (BERNARDINO, 2004). Thus, the IBV is still causing important economic losses in the poultry meat and egg production industries in Brazil and worldwide (BANDE et al., 2015).

As the main IBV transmission route is by air, with the virus rapidly spreading inside the flock, it is also recommended the implementation of good biosafety practices inside aviaries, as enforcing a rigid flux control of authorized personal in and out of installations, enforcing change of clothes and showering before and after having access to barns, and enforcing sanitary empty between flocks (TREVISOL e JAENISCH, 2010). It is also important to apply restrictions and control of vehicles with access to the propriety, preventing contaminants to being brought into clean areas (ALMEIDA et al., 2013). However, implementing these control measures can be difficult, especially in farms with poultry in

multiple ages, where management is more complicated, the control of diseases transmission is more challenging (DI FABIO e ROSSINI, 2007).

Live-attenuated and inactivated vaccines are used in poultry flocks and, those measures are employed with the objective to avoid viral transmission to different poultry farms and flocks, once IBV is highly contagious and can rapidly spread in the bird organism (MONTASSIER, 2008). In Brazil, inactivated oily and live lyophilized vaccines formulated with serotype Massachusetts (Mass) sample H120 are available. These vaccines can be administered via drinking water, nasal-ocular, sprays and intramuscular, being the two latters the two preferable ways for live and inactivated vaccines, respectively (BACK, 2010).

To date, obtained data regarding variable genotypes indicate that they have being in circulation in Brazil since 1988; however there are still few scientific studies concerning its genetic and antigenic variations (VILLARREAL et al., 2007; ABREU et al., 2010; BALESTRIN et al., 2014). In Brazil, at least five different antigenic types of IBV have already been isolated in commercially available chicken in all the country's regions, but mainly in the South where the poultry production industry is bigger (DI FABIO et al., 2000). These genotypes are determined mainly by the analyses of proteins S1 and N gene sequences (MONTASSIER et al., 2008; ABREU et al., 2010).

There are several studies approaching the introduction of new vaccines in Brazil, however, there is still few studies about variants circulating in the country that may prove the low antigenic relation with the available vaccine. These live-attenuated vaccines with variant serotypes are only authorized for use in areas where this type of virus can cause important economic losses and after a throughout characterization of the vaccine, due to the risk of introducing a new serotype and occurrence of genetic recombination (TREVISOL e JAENISCH, 2010; TREVISOL, 2013).

Thus, the biological and epidemiological behavior of these variants needs further investigation to help defining more efficient programs to control IB, considering alleged ineffectiveness of current control methods based only on vaccination with monovalent vaccines containing the Massachusetts serotype (MONTASSIER, 2010). New molecular strategies using the virus focusing in the field needs are in development; however, the simple administration of two genetic different vaccines to protect against a wide range of heterologous types is an efficient practice that is already being used (JACKWOOD et al., 2012).

Still considering the IB control, it is important to highlight some aspects of the avian immune response to IBV, as well as adopted vaccination methodologies.

- Immune response against IBV

Humoral immune response is associated with inhibition of viral replication and has been correlated with specific antibodies titers to IBV (BANDE et al., 2015). Antibodies stimulated by vaccination can be detected in poultry serum, tracheal swabs and lacrimation (De WIT, 2000). Among different existent immunoglobulin classes, studies had shown that the immunoglobulin G (IgG), M (IgM), and A (IgA) are essential to minimize viral circulation in the blood (DARBYSHIRE E PETERS, 1985).

As the virus replicates in the Harderian glands, it will induce the development of mucosal immune response, which is characterized by the secretion of IgA. (BANDE et al., 2015). Besides, IgA is the main inducer of mucosal response, acting mainly through the neutralization of viral epitopes responsible for binding to the cell receptors, thus, preventing the attachment of IBV to permissive cells (CARON, 2010).

Studies using N and S1 recombinant proteins for poultry immunization through ocular vaccination showed the stimulation of significant cellular-mediated immune response without the need for boost or use of adjuvants. Birds vaccinated with these proteins were protected

against infection with a virulent virus strain, emphasizing the important role of mucosal immunity for infection control (MEIR et al., 2012). In a study performed by JACKWOOD et al. (2012), which evaluated the protection of poultry vaccinated with two IBV vaccines, showed that the decrease of infection and virus replication in the upper respiratory system contributed to the decrease of transmission and possible mutations that could originate variants. Such studies reinforce the importance of mucosal immunity in the control of IBV, once the respiratory tract is the main entry site of this virus.

The cytotoxic T cell (CTL) mediated immune response stimulated by IBV occurs 10 days after the infection, which correlates with the decline of clinical signs (CAVANAGH, 2007). The specific response to the IBV N protein is associated with the stimulation of CTLs, which are responsible for the decrease of cells infected by the virus (SEO et al., 2000). Also, reports have shown that there is a significant increase in the presence of CD4 and CD8 T cells after immunization with specific vaccines containing S1 protein (JOHNSON et al., 2003).

Passive immunity is an important form of protection of birds early in life. It has been demonstrated that maternal antibodies can last for days or weeks, depending upon the viral strain. From birds that have maternal antibodies, approximately 97% will be protected against IBV infection in their first day of life. However, this protection can decline approximately 30% until 7 days of life, showing the limited duration of this kind of protection (MONDAL E NAQI, 2001).

There are many attempts to the development of an efficient vaccine against IBV in the future, which could be capable of stimulating a wide range of protection against different viral serotypes, surpass the passive immunity, meet international biosafety standards, provide adequate stability, being easy to apply and economically accessible (BANDE et al., 2015).

- Vaccination

Vaccination is a widely used form to prevent IBV. To obtain higher immunization efficiency, as well as ensure proper management and vaccine application, one must pay attention to questions of biosafety and respect the time dedicated to sanitary empty (DI FABIO e ROSSINI, 2000). If those measures are not enough, the ideal procedure would be to isolate a sample of the main IBV strain circulating at the local and, then, obtain a local vaccine strain (DHAMA et al., 2014). However, this approach is time consuming and requires financial resources since the virus must be isolated and the serotype identified which will require adaptation in embryonated egg or in cell culture, and a serum bank against known strains (SASIPREEYAJAN et al., 2012).

To the immunization of birds against IBV, there are vaccination protocols that use live-attenuated vaccines as well as inactivated vaccines. Commonly, the primo vaccination is performed with a live-attenuated vaccine via the ocular, oral or nasal routes and boost vaccinations performed with the inactivated vaccines (DI FABIO e ROSSINI, 2000). In Brazil, the vaccination in broilers is performed with live-attenuated vaccine in the incubatory period at the first day of life, and a boost vaccination is performed with live-attenuate vaccine via nasal spray 15 days after the primo vaccination.

There are several attempts to develop new vaccines against IBV, including the development of vaccines using new technologies as the recombinant DNA could be an excellent alternative, providing adequate levels of protection without the inconvenient consequences with the use of live-attenuated vaccines (BANDE et al., 2015).

Diagnostic

The diagnosis of IBV can be performed through direct and indirect methods, being the viral isolation, according with OIE (2013), the golden standard technique to the confirmation of the disease-causing agent. However, as birds can be vaccinated against IBV, the surveillance of antibodies is the most employed diagnosis and can be made through

techniques as serum agglutination, ELISA, hemagglutination inhibition, and others (OIE, 2013).

The laboratorial diagnostic depend on the use of techniques that involve isolation and genotypic and phenotypic identification (serotypes, protectotypes and pathotypes) of the virus, and methods designed to the detection of specific antibodies. Normally, the indirect methods are performed with commercial tests as the *Enzyme Linked Immunosorbent Assay* (ELISA), which are imported and are expensive for the routine use (WANG et al., 2002). Besides, it should be taking into consideration that the rapid diagnostic and the determination of the immunity level of a flock of birds are critical aspects to obtain better conditions for IB control. Several diagnostic techniques can be used detect IBV antigens or antibodies against this virus, however, each one has specific characteristics related to the material used and several require longer time for the results to be obtained, as can be observed at Table 1.

In most laboratories, the hemagglutination inhibition test (HI) is the most employed serological assay for detection of antibodies against IBV, but it is a laborious test. Another method is the ELISA assay, which is a relatively simple test and of fast to perform, but requires trained professionals, specific equipments and four to eight hours of labor to achieve its complete execution (OIE, 2013). An alternative if the use of rapid diagnostic methods to monitor antibodies induced by the vaccination, both with field application as well as for epidemiological surveillance (ZHANG et al., 2010). Recently, immunochromatographic assays are being used as an new strategy, in which a cellulose membrane is used as carrier and antigen or antibody is conjugate to colloidal gold, which in turn is used as marker (HUANG et al., 2007).

Molecular techniques, such as Real-time PCR (RT-PCR) and Restriction Fragment Length Polymorphisms (RFLP) are used to detect the viral genome in samples as tracheas, embryonated eggs or cell cultures, as well as to determinate the types of IBV.

Also aiming the IB diagnostic, the expression of recombinant proteins is being extensively considered. In a studied performed by PRADHAN et al. (2014), the N protein gene of IBV was cloned and expressed in prokaryotic system and used in the development of a ELISA, with the objective to measure specific antibodies in chicken serum. The test described was 95.8% specific and 96.8% sensitive, when compared with a commercial diagnostic kit, showing that recombinant proteins have potential to be used as immunobiological. The use of insect cells is another option to production of heterologous proteins, since it has as characteristics the high levels of expression and had been used by ABDEL-MONEIM et al. (2014) for the expression of IBV N protein, which was highly successful when used as antigen in the development of an ELISA with 100% of specificity and accuracy

Biotechnological advances

Given the relevancy of IB in bird flocks of the national poultry industry, there is a increasing need for alternatives to achieve protection against IBV, and the use of new technologies aiming the development of immunobiologicals (vaccines, antigens to the development of diagnostic methods and monoclonal antibodies), is an important field of study (JOHNSON et al., 2003; ZESHAM, 2010).

Regarding the development of vaccines, the achievement of protection, better thermal stability of the vaccine and others advantages are sought. Recombinant vaccines are a “big bet” for the introduction of new strategies for the control of IB, especially vaccines based in vectorial vaccines, DNA vaccines or subunit vaccines (BANDE et al, 2015).

For example, the development of vaccines based in the insertion of target-genes of IBV in other viral genomes (adenovirus and poxvirus) used as vectors (RUSSEL, 2000; JOHNSON et al., 2003), bring, a series of advantages, including easy manipulation and

purification, and reduction of the occurrence of unwanted recombination events between vaccine strains and field strains.

In recent studies using recombinant Human Adenovirus type 5 (Ad5), the efficacy of a vaccine using Ad5 defective vector carrying the hemagglutinin of Avian influenza virus also demonstrate the induction of protective immunity in vaccinated birds (TORO et al., 2007). Other study also demonstrated the protective efficacy of a recombinant vaccine expressing the IBV S1 gene in vaccinated birds that developed higher levels of antibodies against IBV and the increase of IL-4 levels, which indicates the stimulation of cellular immune response (ZESHAM, 2010).

Besides the use of recombinant vaccines, the use of antibodies is also a powerful therapeutic tool against viral infections (AHMAD et al., 2012). The development of antibodies effectively reagents for emergency prevention and treatment of IBV infection is being studied and evaluated as an alternative to the control of the disease; however, maybe its main use is in the diagnostic of the disease, since it can be used in the development of rapid tests

Monoclonal antibodies based in recombinant single-chain variable fragments are a new genetic engineering that can help in scientific as well as clinical applications, in which the passive administration of neutralizing monoclonal antibodies can be used for emergency prophylaxis and the viral disease treatment. (ANDRIS-WIDHOPF et al., 2000). The scFv are the smaller units of the functional immunoglobulin molecule in the antigen-binding function. In comparison with a whole antibody, they possess several advantages in clinical practices, including better penetration, higher immunogenicity, and therapeutic to the target antigen in vivo, as well as possibility of mass production in vitro. Recombinants scFvs anti-IBV were obtained in a study performed by LIN et al. (2015), which can be used to amplify the antibody expression library for diagnostic development or potential therapeutics.

A study performed by FERNANDES et al. (2010), the phage display technique was used to the construction of a library of chicken monoclonal antibody single-chain variable fragments, which recognize the viral strain as well as some heterologous strains isolated from field samples in Brazil. Those antibodies could be useful in the direct diagnosis of IBV.

CONCLUSION

Thus, knowing the importance of IB and the economical losses to poultry producers that is attributed to this disease, it is increasingly important the execution of studies aiming the achievement accessible reagents for the detection of the agent, as well as the surveillance of birds antibodies, avoiding the clinical signs in infected animals.

REFERENCES

- ABDEL-MONEIM et al. High-Level Protein Expression Following Single and Dual Gene Cloning of Infectious Bronchitis Virus N and S Genes Using Baculovirus Systems. **Viral Immunology**, v. 27, pp. 75-81, 2014. Available from: <<http://online.liebertpub.com/doi/abs/10.1089/vim.2013.0114>>. Accessed: Sep. 10, 2015. doi: 10.1089/vim.2013.0114.
- ABREU, J.T. et al. Molecular Studies of the Brazilian Infectious Bronchitis Virus Isolates. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, v. 12, pp. 107-110, 2010. Available from: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-635X2010000200005&lng=en&nrm=iso>. Accessed in: Sep. 10, 2015. doi: 10.1590/S1516-635X2010000200005.
- AHMAD, Z.A., et al. scFv antibody: principles and clinical application. **Clinical and Developmental Immunology**, v. 2012, 15 p, 2012. Available from: <<http://dx.doi.org/10.1155/2012/980250>>. Accessed: Sep. 10, 2015. doi: 10.1155/2012/980250.

ALMEIDA, J. M. et al. **Impacto da bronquite infecciosa das aves no Brasil**. In: III Simpósio de sustentabilidade e ciência animal. 2013.

ANDRIS-WIDHOPF, J. et al. Methods for the generation of chicken monoclonal antibody fragments by phage display. **Journal of Immunology Methods**, v. 242, pp. 159–181, 2000. Available from: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022175900002210>>. Accessed: Sep. 10, 2015. doi: 10.1016/S0022-1759(00)00221-0.

BACK, A. Bronquite Infecciosa das Galinhas. In: **Manual de Doenças de Aves**. Cascavel: Integração, 2010. p.35-39.

BALESTRIN, E. et al. Infectious bronchitis virus in different avian physiological systems - field study in Brazilian poultry flocks. **Poultry Science**, v. 93, pp. 1922-1929. 2014. Available from: < <http://ps.oxfordjournals.org/content/93/8/1922.long>>. Accessed in: Out. 20, 2015. doi: 10.3382/ps.2014-03875.

BANDE, F. et al. Progress and Challenges toward the Development of Vaccines against Avian Infectious Bronchitis. **Journal of Immunology Research**, v. 2015, pp. 1-12, 2015. Available from: <http://dx.doi.org/10.1155/2015/424860>. Accessed: Sep. 10, 2015. doi: 10.1155/2015/424860.

BERNARDINO, A. Programas de vacinação. In: MENDES, A.A; NAAS, I.A.; MACARI, M. (Eds.). Produção de frangos de corte. Campinas: FACTA, 2004. p.179-199.

CARON, L. F. Etiology and immunology of infectious bronchitis virus. **Revista Brasileira de Ciencia Avicola**, v. 12, pp. 115–119, 2010. Available from: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-635X2010000200007&lng=en&nrm=iso>. Accessed: Sep. 10, 2015. doi: 10.1590/S1516-635X2010000200007.

CAVANAGH, D. Coronavirus Avian Infectious Bronchitis Virus. **Veterinary Research**, v.38, pp. 281–97, 2007. Available from: < <http://dx.doi.org/10.1051/vetres:2006055>>.

Accessed Aug. 10, 2015. doi: 10.1051/vetres:2006055.

DARBYSHIRE, J. H.; PETERS, R.W. Humoral antibody response and assessment of protection following primary vaccination of chicks with maternally derived antibody against avian infectious bronchitis virus. **Research in Veterinary Science**, v. 38, pp. 14–21, 1985.

De WIT, J. Detection of infectious bronchitis virus. **Avian Pathology**, v. 29, pp. 71–93, 2000. Available from: <<http://dx.doi.org/10.1080/03079450094108>>. Accessed: Sep. 10, 2015. doi: 10.1080/03079450094108.

DHAMA, K.D. et al. Emergence of Avian Infectious Bronchitis virus and its Variants Need Better Diagnosis, Prevention and Control Strategies. **Pakistan Journal of Biological Sciences**, v. 17, pp. 751-767, 2014. Available from: <http://dx.doi.org/10.3923/pjbs.2014.751.767>. Accessed: Sep. 10, 2015. doi: 10.3923/pjbs.2014.751.767.

Di FABIO, J; ROSSINI, L.I. Bronquite infecciosa das galinhas. In: BERCHIERI, J. R.; MACARI, M. (Ed.). Doença das aves. Campinas: FACTA, 2000. p.293-300.

Di FABIO, J.; ROSSINI, L.I. **Bronquite infecciosa das galinhas**. In: 14º Curso de Sanidade Avícola Fort Dodge. Campinas – SP – Brasil, 2007.

Di FABIO, J. et al. Characterization of infectious bronchitis viruses isolated from outbreaks of disease in commercial flocks in Brazil. **Avian Diseases**, v. 44, p. 582-589, 2000. Available from: <<http://dx.doi.org/10.2307/1593097>>. Accessed in: Oct. 20, 2015. doi: 10.2307/1593097.

FERNANDES, C.C. et al. Construção de uma biblioteca de fragmentos de anticorpos monoclonais de galinhas com cadeia única (scFv) por phage display com reatividade cruzada para estirpes heterólogas do vírus da bronquite infecciosa aviária. **Ciência Rural**, v. 40, pp.

- 1347-1353, 2010. Available from: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-84782010000600017&lng=en&nrm=iso>. Accessed: Sep. 10, 2015. doi: 10.1590/S0103-84782010000600017.
- FERNANDO, F.S. et al. Nephritis Associated with a S1 Variant Brazilian Isolate of Infectious Bronchitis Virus and Vaccine Protection Test in Experimentally Infected Chickens. **International Journal of Poultry Science**, v. 12, pp. 639-646, 2013. Available from: <<http://scialert.net/abstract/?doi=ijps.2013.639.646>>. Accessed: Sep. 10, 2015. doi: 10.3923/ijps.2013.639.646.
- HUANG, S.H. et al. One-step immunochromatographic assay for the detection of *Staphylococcus aureus*. **Food Control**, v. 18, pp. 893–897, 2007. Available from: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0956713506001277>>. Accessed: Sep. 10, 2015. doi: 10.1016/j.foodcont.2006.05.005.
- ICTV, 2011. Virus Taxonomy: 2011. ICTV, Release. [_http://ictvonline.org/virusTaxonomy.asp?version=2011_](http://ictvonline.org/virusTaxonomy.asp?version=2011_).
- JACKWOOD M.W. et al. Molecular evolution and emergence of avian gammacoronaviruses. **Infection, Genetics and Evolution**, vol. 12, no. 6, pp. 1305–1311, 2012. Available from: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1567134812001839>>. Accessed Sep. 10, 2015. doi: 10.1016/j.meegid.2012.05.003.
- JOHNSON, M.A., et al. A recombinant fowl adenovirus expressing the S1 gene of infectious bronchitis virus protects against challenge with infectious bronchitis virus. **Vaccine**, v. 21, pp. 2730–2736, 2003. Available from: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0264410X03002275>>. Accessed: Sep. 10, 2015. doi: 10.1016/S0264-410X(03)00227-5.

KILBOURNE, E. D. Host determination of viral evolution: a variable tautology. In: *The evolutionary biology of viruses*. S. S. Morse, ed. Raven Press Ltd., New York. pp. 253–271. 1994.

KIMURA, M. The neutral theory of molecular evolution: a review of recent evidence. **Jpn. J. Genet.** v. 66, pp. 367-386, 1991. Accessed: Sep. 10, 2015. doi:10.1266/jjg.66.367.

KING, DJ.; C AVANAGH, D. Infectious Bronchitis. In: CALNEK, B.W.; BARNES, H.J.; BEARD, C.W.; REID, W.M.; YODER JUNIOR, H.W. (Eds.). **Diseases of poultry**. 9.ed. Ames: Iowa State University Press, 1991. p.471-484.

LEE, H. et al. Characterization of a novel live attenuated infectious bronchitis virus vaccine candidate derived from a Korean nephropathogenic strain. **Vaccine**, v. 28, pp. 2887–2894, 2010. Available from: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0264410X10001386>>. Accessed Jul. 20, 2015. doi: 10.1016/j.vaccine.2010.01.062.

LIM, T.H. et al. Live attenuated nephropathogenic infectious bronchitis virus vaccine provides broad cross protection against new variant strains. **Poultry Science**, v. 91, pp. 89-94, 2012. Available from: <<http://ps.oxfordjournals.org/content/91/1/89.long>>. Accessed: Sep. 10, 2015. doi: 10.3923/pjbs.2014.751.767.

LIN, Y. et al. Neutralization Analysis of a Chicken Single-Chain Variable Fragment Derived from an Immune Antibody Library Against Infectious Bronchitis Virus. **Viral Immunology**, v. 28, pp. 397-404, 2015. Available from: <<http://online.liebertpub.com/doi/full/10.1089/vim.2014.0104>>. Accessed: Sep. 10, 2015. doi: 10.1089/vim.2014.0104.

MCKINLEY, E.T. et al. Attenuated live vaccine usage affects accurate measures of virus diversity and mutation rates in avian coronavirus infectious bronchitis virus. **Virus Research**, v. 158, pp. 225-234, 2011. Available from:

<<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168170211001420>>. Accessed: Sep. 10, 2015. doi: 10.1016/j.virusres.2011.04.006.

MEIR R. Immune responses to mucosal vaccination by the recombinant S1 and N proteins of infectious bronchitis virus. **Viral Immunology**, v. 25, pp. 55–62, 2012. Available from: <<http://online.liebertpub.com/doi/full/10.1089/vim.2011.0050>>. Accessed: Sep. 10, 2015. doi: 10.1089/vim.2011.0050.

MINSKAIA, E. Discovery of an RNA virus 3'->5' exonuclease that is critically involved in coronavirus RNA synthesis. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 103, pp. 5108–5113, 2006. Available from: <<http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0508200103>>. Accessed: Sep. 10, 2015. doi: 10.1073/pnas.0508200103.

MONDAL, S.P.; NAQI, S.A. Maternal antibody to infectious bronchitis virus: its role in protection against infection and development of active immunity to vaccine. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 79, pp. 31–40, 2001. Available from: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0165242701002483>>. Accessed: Sep. 10, 2015.

MONTASSIER, H. J. Molecular epidemiology and evolution of avian infectious bronchitis virus. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, v. 12, pp. 87–96, 2010. Available from: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-635X2010000200003&lng=en&nrm=iso>. Accessed: Sep. 10, 2015. doi: 10.1590/S1516-635X2010000200003.

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. 105p. Thesis (Doutorado em Microbiologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo.

OIE - ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE ANIMAL. **Avian Infectious Bronchitis**. 2013. Available from: <<http://www.oie.int>>. Accessed: Sep. 10, 2015.

PENA L.J. et al. Bronquite infecciosa das galinhas. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v.72, n.3, pp. 397-404, 2005. Available from: <http://www.biologico.sp.gov.br/docs/arq/V72_3/pena.PDF>. Accessed: Aug. 10, 2015.

PRADHAN, S.K. et al. Recombinant nucleocapsid protein based single serum dilution ELISA for the detection of antibodies to infectious bronchitis virus in poultry. **Journal of virological methods**, v. 209, pp. 1-6, 2014. Available from: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0166093414003322>>. Accessed: Sep. 10, 2015. doi: 10.1016/j.jviromet.2014.08.015.

RUSSELL, W.C. Update on adenovirus and its vectors. **Journal of General Virology**, v. 81, pp. 2573–2604, 2000. Available from: <<http://jgv.microbiologyresearch.org/content/journal/jgv/10.1099/0022-1317-81-11-2573>>. Accessed: Sep. 10, 2015. doi: 10.1016/S0167-5699(00)01676-5.

SASIPREEYAJAN, J. et al. Efficacy of different vaccination programs against thai QX-like infectious bronchitis virus. **Thai Journal of Veterinary Medicine**, v. 42, pp. 73–79, 2012.

SEO, S.H. et al. Adoptive transfer of infectious bronchitis virus primed $\alpha\beta$ T cells bearing CD8 antigen protects chicks from acute infection. **Virology**, v. 269, pp. 183–189, 2000. Available from: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0042682200902113>>. Accessed: Sep. 10, 2015. doi: 10.1006/viro.2000.0211.

TORO, H. et al. Protective avian influenza in ovo vaccination with non-replicating human adenovirus vector. **Vaccine**, v. 25, pp. 2886–2891, 2007. Available from: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0264410X06010516>>. Accessed: Sep. 10, 2015. doi: 10.1016/j.vaccine.2006.09.047.

TORO, H. et al. Genetic diversity and selection regulates evolution of infectious bronchitis virus. **Avian Diseases**, v. 56, pp. 449–455, 2012. Available from: <<http://dx.doi.org/10.1637/10072-020212-Review.1>>. Accessed Ag. 20, 2015. doi: 10.1637/10072-020212.

TREVISOL, I.M. ; JAENISCH, F. R. F. . Estudos da Embrapa: Bronquite Infecciosa das Galinhas: Crise Atual. Avicultura Industrial (Porto Feliz. Impresso, São Paulo, p. 14 - 20, 2010.

TREVISOL, I.M. Bronquite Infecciosa. In: SIAV - Salão Internacional da Avicultura e 23º Congresso Brasileiro de Avicultura, 2013, São Paulo/ SP. Anais: SIAV - Salão Internacional da Avicultura e 23º Congresso Brasileiro de Avicultura. São Paulo/SP. p. 1-5.

VILLARREAL, L.Y.B. et al. Molecular Orchitis in Roosters with Reduced Fertility Associated with Avian Infectious Bronchitis Virus and Avian Metapneumovirus Infections. **Avian Diseases**, v. 51, pp. 900–904, 2007. Available from: <<http://www.bioone.org/doi/full/10.1637/7983-041307.1>>. Accessed in: Aug. 15, 2015. doi: 10.1637/7983-041307.1.

WANG, C. H. An ELISA for antibodies against infectious bronchitis virus using an S1 spike polypeptide. **Veterinary Microbiology**, v. 85, p. 333-342, 2002. Available from: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378113501005259>>. Accessed: Sep. 10, 2015. doi: 10.1016/S0378-1135(01)00525-9.

ZESHAN, B. et al. Immunogenicity and protective efficacy of a replication-defective infectious bronchitis virus vaccine using an adenovirus vector and administered in ovo. **Journal of Virological Methods**, v. 166, pp. 54–59, 2010. Available from: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0166093410000583>>. Accessed: Sep. 11, 2015. doi: 10.1016/j.jviromet.2010.02.019.

ZHANG, J., et al. A Simple and Rapid Strip Test for Detection of Antibodies to Avian Infectious Bronchitis Virus . **Journal of Veterinary Medical Science**. v. 72, pp. 883–886, 2010. Available from: <<http://online.liebertpub.com/doi/full/10.1089/mab.2015.0008>>. Accessed: Sep. 10, 2015. doi: 10.1292/jvms.09-0528.

Table 1 Diagnosis methods used for detection of IB (Di Fabio e Rossini, 2007)

Diagnostic	Sample	Time for results
Inoculation in embryonated egg	Organ maceration (lung, kidney, trachea, cecal tonsils)	7 days
Cell culture	Organs	3 days
PCR	Organs, allantoic liquid, cell culture with suspect material	Approximately 5 hours
Virus neutralization	Embryonated eggs, cell culture	3 days
ELISA	Birds serum	Approximately 3 hours
Serum neutralization	Birds serum	3 days
Hemagglutination inhibition	Birds serum	Approximately 1 hour
Rapid plate agglutination	Birds serum	Approximately 1 hour

3 Hipótese

A nucleoproteína recombinante do vírus da bronquite infecciosa das galinhas expressa em sistema procarioto pode ser utilizada como imunobiológico para o diagnóstico da enfermidade. Além disso, anticorpos monoclonais elaborados a partir da proteína recombinante são promissores para uso em diagnóstico.

4 Objetivos

4.1 Objetivo geral

Desenvolver imunobiológicos que possam ser utilizados no diagnóstico para detecção de anticorpos contra a nucleoproteína do vírus da bronquite infecciosa das galinhas.

4.2 Objetivos específicos

- Expressar a proteína N inteira em *Escherichia coli*;
- Purificar e caracterizar a proteína N recombinante;
- Avaliar a proteína N recombinante através de imunodiagnóstico por ELISA, utilizando soros de galinhas positivos e negativos previamente testados por teste comercial;
- Produzir anticorpos monoclonais frente à proteína N recombinante;
- Caracterizar os MAbs produzidos frente ao vírus da bronquite infecciosa e outros vírus aviários;

5 Artigos

5.1 Artigo 2

Produção da proteína N recombinante solúvel do vírus da bronquite infecciosa das galinhas para uso como imunobiológico

Paula Fonseca Finger^a, Michele Peppe^a, Luana Alves Dummer^a, Carolina Georg Magalhães^a, Silvia de Oliveira Hübner^b, Fábio Pereira Leivas Leite^a, Paulo Augusto Esteves^c, Marcelo Mendonça^a, Ângela Nunes Moreira^d, Fabricio Rochedo Conceição^a

Será Submetido para a revista Virus Research

Produção da proteína N recombinante e. coli solúvel do vírus da bronquite infecciosa das galinhas para uso como imunobiológico

Paula Fonseca Finger^a, Michele Peppe^a, Luana Alves Dummer^a, Carolina Georg Magalhães^a, Silvia de Oliveira Hübner^b, Fábio Pereira Leivas Leite^a, Paulo Augusto Esteves^c, Marcelo Mendonça^a, Ângela Nunes Moreira^d, Fabricio Rochedo Conceição^a

^aLaboratório de Imunologia Aplicada, Centro de Desenvolvimento Tecnológico (CDTec), Universidade Federal de Pelotas, RS, Brazil – paulaafinger@hotmail.com, micpepe2@yahoo.com.br, dummer@gmail.com, carolmagalhaes@gmail.com, fabio_leite@ufpel.edu.br, fabricio.rochedo@ufpel.edu.br

^bLaboratório de Virologia e Imunologia, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, RS, Brazil – sohubner@yahoo.com.br

^cEmbrapa Suínos e Aves, Concórdia, SC, Brazil – paulo.esteves@cnpa.embrapa.br

^dFaculdade de Nutrição, Universidade Federal de Pelotas, RS, Brazil – angelanmoreira@yahoo.com.br

Abstract

Infectious bronchitis is a highly contagious disease that affects birds of all ages. The virus still cause important losses to the poultry industry and an effective control along a specific diagnosis are key to prevent the disease from spreading. In order to prepare an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) to detect antibodies against infectious bronchitis virus (IBV), the gene for the nucleocapsid protein (N) of IBV was amplified (1230 bp) by PCR with subsequent cloning and expression in *Escherichia coli* using the expression vector pAE. Recombinant *E. coli* clones were submitted to appropriate protocols and expression induction was successfully performed, obtaining a soluble protein of

approximately 45 kDa. A total of 389 sera were tested against the recombinant protein in ELISA and compared with the commercial IDEXX kit. ELISA showed a 90,34% sensitivity and 90,16% specificity, and these results are promising for achieving a Immunodiagnosis for monitoring the disease in poultry, and more affordable cost than existing on the market.

Keywords: BI; VBIG; nucleoprotein; recombinant protein; *Escherichia coli*; imunodiagnosis

1. Introdução

A bronquite infecciosa das galinhas (BIG) é uma enfermidade altamente contagiosa e de curto período de incubação, causada por um vírus que pertence à família *Coronaviridae*, gênero *Coronavirus* (Cavanagh et al., 1997). O vírus da bronquite infecciosa (VBIG) causa predominantemente lesões respiratórias que se manifestam clinicamente e invariavelmente por espirros e estertores tráqueo-bronquiolares, podendo levar a sinais mais severos (Muneer et al., 1988; Raj and Jones, 1997). Aves infectadas apresentam diminuição do desempenho e, conseqüentemente, perda de peso e refugagem. Além disso, infecções bacterianas secundárias causam perdas econômicas por condenação de carcaças devido à aerossaculite (Cavanagh, 2007; Mendonça et al., 2009), o que acarreta impactos significativos no comércio da carne de frango e ovos, tendo em vista que o país é o terceiro produtor mundial e líder em exportação (MAPA, 2015).

O VBIG possui genoma RNA de fita simples, não segmentado, com sentido positivo e 27,6 kilobases (kb) de comprimento que codifica quatro proteínas estruturais: N (proteína do nucleocapsídeo), S (proteína de superfície), E (proteína do envelope) e M (proteína da membrana). A nucleoproteína (N) está associada ao genoma viral para formar o nucleocapsídeo, formada por 409 aminoácidos e com massa molecular de cerca de 50 kDa

(Macnaughton et al., 1977; Bournnell et al., 1985). Apresenta uma estrutura altamente conservada, com cerca de 94 a 99% de identidade entre as diversas estirpes do VBIIG (Williams et al., 1992). Além disso, é conhecida por apresentar elevada imunogenicidade, induzindo a produção de anticorpos e linfócitos T efetores específicos, sobretudo com ação citotóxica (Seo and Collisson, 1997; Sneed et al., 1989). Em virtude disso, a proteína N do VBIIG vem sendo estudada como um alvo importante no diagnóstico, uma vez que reúne atributos para se constituir no antígeno de eleição para o desenvolvimento de ensaios sorológicos a serem empregados na detecção/quantificação de anticorpos para essa enfermidade (Ndifuna et al., 1998).

Com relação ao diagnóstico laboratorial da BIG, sabe-se que o mesmo depende de técnicas diretas envolvendo o isolamento e a identificação genômica ou fenotípica do vírus, e/ou de métodos indiretos destinados à detecção de anticorpos específicos (Di Fabio et al., 2000). As técnicas sorológicas objetivam, além do sorodiagnóstico, fazer também a avaliação da resposta imunológica vacinal. Normalmente os métodos indiretos são realizados a partir de *kits* comerciais de ELISA, entretanto todos são importados e de custo bastante elevado.

Embora sejam bastante utilizados, os métodos de ELISA atualmente existentes detectam anticorpos que reagem com todos os antígenos do VBIIG e, assim, não discriminam aqueles anticorpos que interagem com os sítios antigênicos mais específicos e relevantes como os que estão localizados na proteína N. Nesse sentido, torna-se interessante a utilização da nucleoproteína como principal antígeno quando se trata de diagnóstico e avaliação de resposta vacinal, uma vez que atua na replicação do vírus e na indução de resposta imune nas aves infectadas (Ignjatovic and Galli, 1994; Schelle et al., 2005).

A utilização de antígenos recombinantes possibilita que seja desenvolvida uma prova de diagnóstico mais específica, uma vez que se destacam por conferir elevada sensibilidade

e especificidade aos testes devido à maior concentração de antígeno imunoreativo e ausência de sítios inespecíficos, além de ser alternativa para reduzir custos de imunoenaios, pois são produzidos em sistemas de simples cultivo, rápida obtenção de antígenos e com baixo custo (Zhang et al., 2005).

O objetivo deste estudo foi produzir a proteína do nucleocapsídeo da cepa Massachusetts (M41) do VBIg, em *Escherichia coli*, para sua utilização em ELISA indireto.

2. Materiais e métodos

2.1 Propagação viral e preparação do RNA

Uma amostra brasileira com o mesmo perfil da cepa Massachusetts 41 (M41- CNPSA – EMBRAPA – Concórdia, SC) do VBIg foi propagada em ovos embrionados SPF com nove dias de incubação, na cavidade córioalantoide (CA), sendo o líquido colhido e estocado a -70 °C, até o momento do uso. O ácido nucléico das amostras obtido de suspensões oriundas do líquido córioalantoide (LCA) foi extraído com a utilização de Trizol® LS Reagent (Invitrogen™), de acordo com as recomendações do fabricante.

2.2 Amplificação do gene para a proteína N por RT-PCR

A partir do RNA viral extraído da suspensão de LCA infectado com a amostra do mesmo perfil da estirpe M41 do VBIg, foi obtido o cDNA por transcrição reversa (RT), usando oligonucleotídeos randômicos para, em seguida, ser amplificada pela reação em cadeia da polimerase (PCR) toda a *orf* do gene da proteína N. Com base na sequência do gene da proteína N da estirpe M41 do VBIg (“GenBank” n° de acesso - M28566) foram desenhados os *primers forward* e *reverse*. Sítios de clivagem para *XhoI* e *KpnI* foram

introduzidos no *primer forward* (5'- CCGCTCGAGATGGCAAGCGGTAAGGCAA – 3') e *reverse* (5' – GGGGTACCTCAAAGTTCATTCTCTCCTA – 3'), respectivamente.

A PCR foi realizada nas condições de desnaturação inicial de 95 °C por 7 minutos, 70 °C por 1 minuto, 45 ciclos de 94 °C por 1 minuto, 50 °C por 1 minuto e 72 °C por 4 minutos, com extensão final de 72 °C por 10 minutos.

2.3 Clonagem da região codificadora do gene para a proteína N

O produto amplificado foi purificado através do GFX PCR DNA e Gel Band Purification Kit (GE Healthcare, USA), de acordo com as especificações do fabricante. O produto da PCR e o vetor de expressão em *E. coli*, pAE, foram digeridos com enzimas de restrição *XhoI* e *KpnI*, e então ligados com T4 DNA ligase (Thermo Scientific). O produto da ligação foi utilizado para transformar, por choque térmico, a cepa TOP10F de *E. coli*. Os transformantes foram selecionados em placas com meio Luria Bertani (1% de triptona, 0,5% de extrato de levedura, 0,5% de NaCl e 2% de Agar) contendo 100 µg/mL de ampicilina (Sigma Aldrich).

2.4 Expressão da proteína N recombinante (rN)

Clones transformantes da linhagem BL21 DE3 Star de *E. coli* foram selecionados e, em seguida, cultivados em 10 mL de meio LB contendo 100 µg/mL ampicilina, sob agitação de 250 rpm a 37 °C, durante 16 horas. Em seguida, todo o volume (10 mL) foi transferido para 200 mL de meio LB contendo ampicilina na mesma concentração anterior, sendo incubado a 37 °C sob agitação de 200 rpm. Quando a densidade óptica da cultura atingiu aproximadamente 0,8 em um comprimento de onda de 600 nm, a expressão da rN foi induzida pela adição de IPTG (isopropil β-D-1-tiogalactopiranosídeo) na concentração final de 0,5 mM. A cultura, depois da adição do agente de indução, foi incubada por mais 3 horas

a 37 °C sob agitação de 200 rpm, sendo, ao final, submetida ao processo de extração de proteínas, conforme os procedimentos de solubilização.

Para analisar a expressão da proteína recombinante, o cultivo foi centrifugado a 10000 x g durante 10 minutos. O *pellet* celular obtido foi ressuspenso em tampão de lavagem Akta Wash (0,234% de NaH₂PO₄, 2,92% de NaCl e 0,068% de Imidazole) adicionado de lisozima, submetido à sonicação por sete ciclos de 20 segundos a 60 Hz e então centrifugado novamente. As amostras foram preparadas para posterior análise da expressão em SDS-PAGE e caracterização por *Western Blot* frente ao anticorpo monoclonal anti-histidina (Sigma Aldrich).

2.5 Pannel de soros aviários

Um total de 389 amostras de soros de galinha, já previamente identificados pelo laboratório Mercolab (Garibaldi, RS), responsável por diagnóstico de BIG pelo *kit* comercial de ELISA (IDEXX IBV Ab Test), foram testadas frente ao ELISA rN e os resultados posteriormente comparados. Além disso, soros confirmados como positivos para a doença de Newcastle foram utilizados a fim de analisar a especificidade do teste.

Das amostras testadas, havia soros que eram provenientes de animais vacinados e não vacinados, sendo possível também analisar as informações com relação ao histórico das aves.

2.6 Desenvolvimento do ELISA-rN indireto

Como antígeno foi utilizada a rN purificada por cromatografia de afinidade em resina “Ni Sepharose™ High performance” (GE Healthcare) e posteriormente quantificada por Qubit™ (Thermo Fisher Scientific). A fim de determinar o melhor parâmetro a ser utilizado

no diagnóstico, teste de diluição dos soros e concentrações de proteína por cavidade foi realizado.

Microplacas de 96 cavidades (Nunc MaxiSorp®) foram sensibilizadas com 100 ng de rN em um volume de 100 µL por poço e incubadas *overnight* a 4 °C. As placas foram lavadas com PBS-T por três vezes, bloqueadas com solução de leite em pó 5% em PBS-T e deixadas em estufa a 37 °C por 1 hora. Após realizadas as lavagens com PBS-T, os soros diluídos 1:200 em PBS-T foram adicionados em duplicata nos poços, e as placas incubadas novamente a 37 °C por 1 hora. O anticorpo secundário anti-IgY conjugado com peroxidase foi diluído 1:10.000 em PBS-T e adicionado em todos os poços das placas após as três lavagens, seguido de incubação a 37 °C por 1 hora e meia. No último passo foram realizadas cinco lavagens e a reação foi revelada por adição de OPD (o-Phenylenediamine dihydrochloride). A reação foi interrompida com a solução de H₂SO₄ 2N e analisada em espectrofotômetro com comprimento de onda de 492 nm.

2.7 Repetibilidade e especificidade do ELISA-rN

Para avaliar a repetibilidade do ELISA-rN, três lotes de proteína N recombinante foram produzidos e purificados em tempos diferentes, sendo então utilizados como antígeno para sensibilizar a placa de ELISA. Para cada antígeno foi utilizado um total de 9 soros, sendo então calculada a média e o desvio padrão para avaliação do resultado. Já para avaliação da especificidade do teste, soros negativos para VBIg e positivos para Newcastle foram utilizados no ELISA-rN.

3. Resultados

3.1 Construção do vetor de expressão e transformação de *E. coli*. O fragmento esperado de 1.240 pb (Fig. 1A) foi amplificado na reação de PCR utilizando os *primers* desenhados para obtenção do gene correspondente à região codificadora da proteína N. O vetor pAE/n (Fig. 1B) foi utilizado para transformar *E. coli* TOP10F (Invitrogen), sendo as colônias confirmadas como recombinantes através da análise de restrição com as enzimas utilizadas na clonagem. Então, a cepa BL21 Star de *E. coli* (Invitrogen) foi transformada com pAE/n, após submetida ao processo de indução da expressão da proteína recombinante.

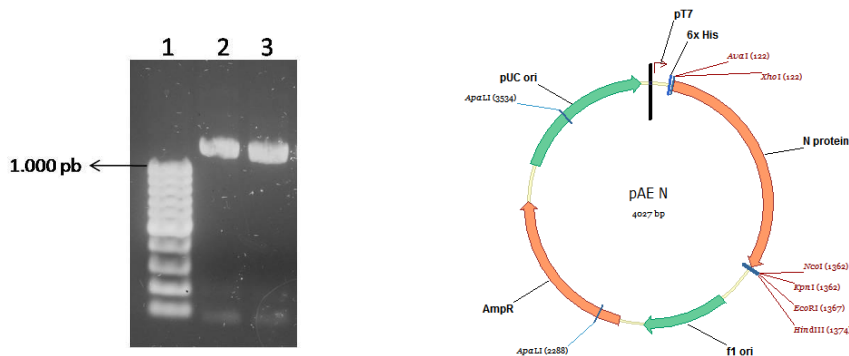


FIG 1 AMPLIFICAÇÃO E CLONAGEM DO GENE DA PROTEÍNA N DO VBIG. A) ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE 1% PARA VISUALIZAR A AMPLIFICAÇÃO DO FRAGMENTO CORRESPONDENTE AO GENE DA PROTEÍNA N. 1- MARCADOR 100 PB, 2 E 3- AMOSTRA M41. B) MAPA ESQUEMÁTICO DO VETOR PAE/N OBTIDO NO SOFTWARE VECTOR NTI 11.

A proteína N recombinante foi obtida de forma solúvel, sendo dispensada a etapa de *refolding* e, após purificada, obtendo-se um rendimento final de aproximadamente 10 mg/L de cultivo. O resultado da análise por meio de eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) demonstrou a presença de duas bandas uma cuja massa molecular correspondeu a aproximadamente 45 kDa e outra de 55 kDa (Fig. 2A). O mesmo ocorreu quando foi utilizado na reação de *Western blotting* frente a anticorpo monoclonal Anti-6HIS, revelando uma banda referente à proteína de interesse (Fig. 2B).

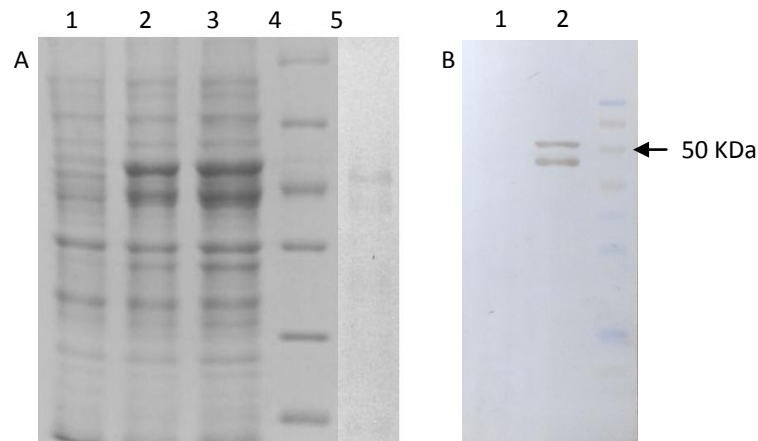


FIG 2 (A) AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DA PROTEÍNA rN. A PROTEÍNA rN PRODUZIDA EM *E. COLI* FOI ANALISADA POR SDS-PAGE 12% CORADO COM COMASSIE BRILLIANT BLUE R-250. 1- CEPA *E. COLI* BL21 STAR, 2- CULTIVO DE rN NÃO INDUZIDO, 3- CULTIVO DE rN INDUZIDO, 4- MARCADOR DE MASSA MOLECULAR (THERMO SCIENTIFIC), 5- rN PURIFICADA. (B) CARACTERIZAÇÃO DA PROTEÍNA rN. A PROTEÍNA rN PRODUZIDA EM *E. COLI* FOI CARACTERIZADA POR WESTERN BLOTTING FRENTE AO ANTICORPO MONOCLONAL ANTI-6XHIS. 1- rN, 2- MARCADOR PRÉ-CORADO (THERMO SCIENTIFIC)

3.2 ELISA indireto

Os resultados do ELISA rN foram comparados aos soros caracterizados pelo ELISA IDEXX. A análise dos soros foi feita a partir da Característica de Operação do Receptor (ROC) com 95% de confiança intervalar (CI) (Fig. 3). Dos 244 soros positivos, 220 foram positivos pelo ELISA rN, obtendo-se assim, um resultado de sensibilidade de 90,16%. Dos 145 soros negativos, 131 soros confirmaram o resultado negativo pelo rN ELISA, resultando em um valor de especificidade de 90,34%. O valor de área foi de 0,9588 e $p < 0,001$.

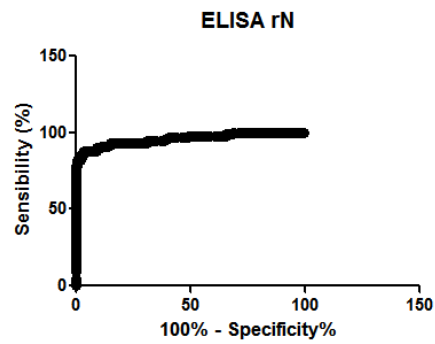


Fig 3 ANÁLISE ATRAVÉS DA CURVA ROC DO ELISA COM A RN COMPARADO AO IDEXX, OBTENDO 90,16% DE SENSIBILIDADE E 90,34% DE ESPECIFICIDADE.

3.3 Teste de repetibilidade e especificidade

Os resultados do ELISA sensibilizado com os três lotes diferentes de produção da rN demonstrou que as reações observadas entre os soros testados foram semelhantes, indicando uma estabilidade do antígeno (Fig. 4). Todos os soros positivos para Newcastle foram negativos no ELISA produzido nesse estudo, sugerindo especificidade.

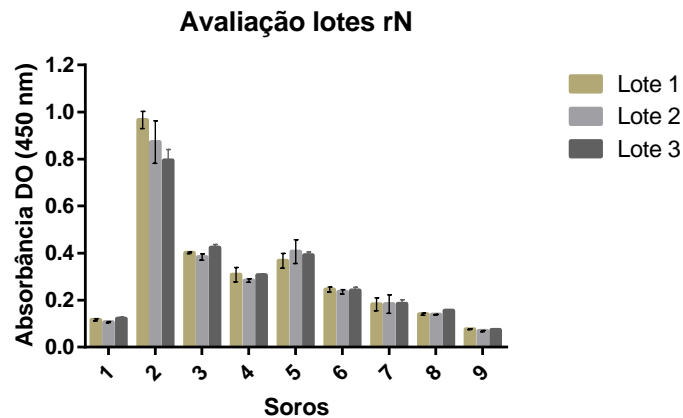


Fig 4 AVALIAÇÃO DE DIFERENTES LOTES DE PRODUÇÃO DE RN EM ELISA INDIRETO UTILIZANDO SOROS POSITIVOS E NEGATIVOS PARA VBIG

3.4 Confirmação dos soros discrepantes por *Western Blot*

Todos os soros que foram negativos no teste comercial e positivos pelo teste com rN foram submetidos ao teste de *Western Blot* utilizando a proteína rN como antígeno. Desses, todos reagiram com a proteína N, confirmando a positividade encontrada no ELISA (Fig. 5).

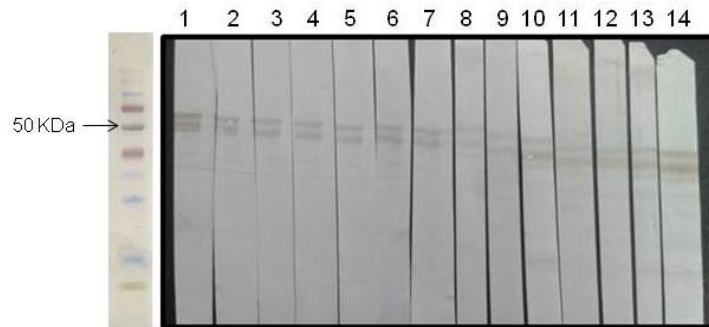


FIG 5 REAÇÃO DA PROTEÍNA rN EM *WESTERN BLOT* FRENTE A SOROS DE AVES NEGATIVOS PELO ELISA IDEXX. 1-14: SOROS NEGATIVOS PELO IDEXX E POSITIVOS POR ELISA rN.

3.5 Análise categórica dos soros

Para os soros que foram utilizados durante o estudo, de acordo com o histórico descrito nos laudos emitidos, foi possível traçar um status sorológico com relação à presença de anticorpos oriundos da vacinação ou infecção natural. Foram divididos soros em três categorias diferentes: aves de postura comercial, aves matrizes e frangos de corte. De acordo com a tabela 1, podemos observar que tanto o ELISA comercial como da proteína rN detectaram anticorpos nas aves de postura e matrizes, confirmando, dessa forma, que as aves estão adquirindo anticorpos oriundos da vacinação, tanto com vacinas vivas como inativadas. Já para os frangos de corte, de 70 soros cujas aves não foram vacinadas, 49 apresentaram anticorpos, o que nos leva a inferir que essa resposta ocorreu frente a uma infecção natural.

TABELA 1. ANÁLISE DOS SOROS TESTADOS EM ELISA COMERCIAL E ELISA rN CLASSIFICADOS QUANTO À CATEGORIA E À PRESENÇA DE ANTICORPOS PARA VBIg.

Categoria (n)	Animais vacinados		Animais não vacinados	
	Acs ELISA comercial	Acs ELISA rN	Acs ELISA IDEXX	Acs ELISA rN
Postura (n = 41)	41	41	0	0
Matriz (n = 27)	4	26	0	0
Frangos de corte (n = 195)	24 (24)	22 (24)	51 (88)	43 (88)

4. Discussão

O desenvolvimento de técnicas de diagnóstico mais eficazes vem sendo estudado, não só para detectar a doença, mas também para controlar e monitorar a vacinação realizada nas aves (Di Fabio et al., 2000; et al., 2008). Para tal, a nucleoproteína vem sendo a principal proteína de escolha para realização de teste de detecção de anticorpos em animais, uma vez que tem papel importante na geração de anticorpos no momento da infecção ou através da vacinação. Além disso, é altamente conservada, o que a torna interessante para utilização em teste de diagnóstico (Cavanagh, 2007). O mesmo acontece no vírus da síndrome respiratória e reprodutiva de suínos (PRRS), para o qual um estudo utilizando a proteína N recombinante na detecção de anticorpos por meio de ELISA demonstrou ser eficaz (Seuberlich et al., 2002). De acordo com Witte et al. (2000), a nucleoproteína do PRRS demonstrou ser altamente imunogênica e capaz de produzir anticorpos rapidamente após infecção pelo vírus.

Assim como já reportado por Chen et al. (2003) e Zhang et al. (2005), que também clonaram o gene da proteína N correspondente a 1.200 pb, obtiveram a proteína rN do VBIg apresentando duas bandas, uma de 50 kDa e outra de 45 kDa, onde a menor banda parece ser a forma truncada do antígeno, resultado esse que também foi encontrado no presente

estudo por análise em SDS-PAGE e *Western blot*. Ainda, em um ELISA desenvolvido utilizando a rN, os resultados obtidos demonstraram que o teste pode ser adotado como diagnóstico para VBIg, substituindo técnicas de custo elevado para o produtor (Schelle et al., 2005).

Em nosso estudo, pelo rendimento de rN por litro de cultivo de *E. coli* em caldo LB (10 mg/L), poderíamos sensibilizar 1.000 placas de ELISA, possibilitando a avaliação de aproximadamente 45.000 soros em duplicata. Vale ressaltar que a rN foi obtida na forma solúvel, o que minimiza custos de produção e garante a preservação de epítomos conformacionais. Por outro lado, o teste comercial disponível no mercado utiliza como antígeno o VBIg inteiro, o que necessita de propagação viral, bem como demais manipulações, necessitando de laboratórios com biossegurança adequada.

Em estudo realizado por Ghadakchi et al (2005), utilizando como antígeno para ELISA o VBIg inteiro, obtiveram especificidade de 94% e sensibilidade de 89%, resultados semelhantes aos obtidos no presente estudo, porém com proteína recombinante, que dispensa o processo de propagação e obtenção do vírus, tornando o teste mais simples de ser elaborado.

O ELISA elaborado por Lugovskaya et al. (2006), contendo dois fragmentos da proteína N recombinante em *E. coli*, apresentou uma especificidade de 87,36% e sensibilidade de 93,81%, não sendo essas inferiores ao teste de rotina que utiliza o vírus e apresenta 88,97% de especificidade e 92,86% de sensibilidade. Nosso estudo apresentou resultados de sensibilidade e especificidade semelhantes, 90,16% e 90,34% respectivamente, ressaltando a eficácia na utilização da nucleoproteína de VBIg para a detecção de anticorpos nos soros das aves. Porém, resultados inferiores de sensibilidade podem ser devido ao antígeno utilizado, uma vez que o ELISA comercial utiliza o vírus inteiro

para sensibilizar a placa, possibilitando a detecção de anticorpos contra outros antígenos do VBIg, com destaque para a proteína S (Pradhan et al., 2014).

Ainda, nossos resultados são mais promissores do que os encontrados por Pradhan et al. (2014), cujo antígeno utilizado também foi a rN, porém ela foi obtida na forma insolúvel, ao contrário do nosso antígeno que foi obtido na fração solúvel do cultivo, o que facilita a sua recuperação e dispensa etapas de *refolding* da proteína. Ainda, nossa proteína demonstrou ter reprodutibilidade de resultados mesmo quando obtida em diferentes tempos de produção e purificação, resultado esse que não é visualizado em estudos com antígenos recombinantes.

Cabe ressaltar que, no presente estudo, ao compararmos nosso ELISA rN com o ELISA comercial, foi possível verificar que alguns soros negativos pelo teste comercial foram confirmados como positivos, no ELISA rN e *Western Blot*, resultado esse que é preocupante, uma vez que em um lote de aves não é desejado um resultado falso negativo.

Além da utilização da nucleoproteína em diagnóstico, ELISA utilizando a proteína S já foi descrito por Ding et al. (2015), o qual também foi comparado com um *Kit* comercial, revelando sensibilidade e especificidade de 92,38% e 89,83%, respectivamente. Porém, a proteína N, antígeno de escolha para nosso estudo, apresenta vantagens para utilização em técnicas de diagnóstico, pois durante a infecção viral a produção da proteína N é mais abundante do que a proteína S, com uma razão molar de 6:1 (N:S) (Zhou and Collisson, 2000), além de apresentar importante papel na replicação e montagem do vírus (Cavanagh, 1983).

Os resultados obtidos no presente estudo demonstraram que muitas aves não vacinadas apresentam anticorpos contra VBIg, o que nos leva a acreditar que os métodos de prevenção e controle não estão sendo efetivamente aplicados e que o vírus tem circulado

nos aviários. Esses dados causam preocupação, uma vez que esses frangos de corte podem ser grandes disseminadores do vírus e, por ficarem alojados por pouco tempo, acabam não apresentando a sintomatologia oriunda da infecção.

Sabe-se que das aves que possuem os anticorpos maternos, aproximadamente 97% podem estar protegidas contra infecção por VBIg no primeiro dia de vida. No entanto, essa proteção pode ter um declínio de aproximadamente 30% até os 7 dias, demonstrando a limitada duração dessa proteção (Mondal and Naqi, 2001). Para isso, o ideal seria que todas as aves reprodutoras fossem monitoradas quanto ao nível de anticorpos, através de ELISA, e o mesmo fosse realizado com a prole oriunda dessas aves, a fim de obter monitoramento e estratégia de vacinação mais eficazes, que possibilitasse a correta vacinação das aves quando os níveis de anticorpos estivessem em declínio.

5. Conclusões

A proteína N recombinante produzida em *E. coli* foi obtida como esperado, confirmando sua expressão e posterior purificação. A utilização da proteína rN como antígeno no ELISA foi capaz de detectar anticorpos anti-VBIg obtendo-se um teste com valores elevados de sensibilidade e especificidade (em torno de 90%).

Esses resultados demonstram que um teste utilizando apenas uma porção do vírus da bronquite infecciosa pode ser capaz de detectar anticorpos em soros de aves, sendo uma alternativa que visa a diminuição do custo do diagnóstico e monitoramento vacinal, permitindo, assim, a garantia de um maior acesso deste teste aos aviários e a consequente redução das perdas econômicas decorrentes da infecção pelo VBIg.

6. Referências

- Bournsnel, M.E., Binns, M.M., Foulds, I.J., Brown, T.D., 1985. Sequences of the nucleocapsid genes from two strains of avian infectious bronchitis virus. *J Gen Virol* 66 (Pt 3), 573–580.
- Cavanagh, D., 2007. Coronavirus avian infectious bronchitis virus. *Vet. Res.* 38, 281–297. doi:10.1051/vetres:2006055
- Cavanagh, D., 1983. Coronavirus IBV: further evidence that the surface projections are associated with two glycopolypeptides. *J. Gen. Virol.* 64 (Pt 8), 1787–1791. doi:10.1099/0022-1317-64-8-1787
- Cavanagh, D., Elus, M.M., Cook, J.K., 1997. Relationship between sequence variation in the S1 spike protein of infectious bronchitis virus and the extent of cross-protection in vivo. *Avian Pathol.* 26, 63–74. doi:10.1080/03079459708419194
- Chen, H., Coote, B., Attree, S., Hiscox, J.A., 2003. Evaluation of a nucleoprotein-based enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of antibodies against infectious bronchitis virus. *Avian Pathol.* 32, 519–526. doi:10.1080/0307945031000154125
- Di Fabio, J., Rossini, L.I., Orbell, S.J., Paul, G., Huggins, M.B., Malo, A., Silva, B.G., Cook, J.K., 2000. Characterization of infectious bronchitis viruses isolated from outbreaks of disease in commercial flocks in Brazil. *Avian Dis.* 44, 582–589.
- Ding, M., Wang, H., Cao, H., Fan, W., Ma, B., Xu, P., Zhang, A., Yang, X., 2015. Development of a multi-epitope antigen of S protein-based ELISA for antibodies detection against infectious bronchitis virus. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 79, 1287–1295. doi:10.1080/09168451.2015.1025692
- Montassier, M.D.F., Montassier, S., Nucleotídeos, S.D.E., Genes, D.O.S., 2008. 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, Univers.
- Ignjatovic, J., Galli, L., 1994. The S1 glycoprotein but not the N or M proteins of avian infectious bronchitis virus induces protection in vaccinated chickens. *Arch. Virol.* 138, 117–134.
- Lugovskaya, N.N., Scherbakov, a V, Yakovleva, a S., Tsyvanyuk, M. a, Mudrak, N.S., Drygin, V. V, Borisov, a V, 2006. Detection of antibodies to avian infectious bronchitis virus by a recombinant nucleocapsid protein-based enzyme-linked immunosorbent assay. *J. Virol. Methods* 135, 292–6. doi:10.1016/j.jviromet.2006.03.019
- Macnaughton, M.R., Madge, M.H., Davies, H.A., Dourmashkin, R.R., 1977. Polypeptides of the surface projections and the ribonucleoprotein of avian infectious bronchitis virus. *J Virol* 24, 821–825.

- Mendonça, J.F.P., Martins, N.R.D.S., Carvalho, L.B. De, Sá, M.E.P. De, Melo, C.B. De, 2009. Bronquite infecciosa das galinhas: conhecimentos atuais, cepas e vacinas no Brasil. *Ciência Rural* 39, 2559–2566. doi:10.1590/S0103-84782009005000195
- Mondal, S., Naqi, S., 2001. Maternal antibody to infectious bronchitis virus: its role in protection against infection and development of active immunity to vaccine. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 79, 31–40. doi:10.1016/S0165-2427(01)00248-3
- Muneer, M.A., Newman, J.A., Halvorson, D.A., Sivanandan, V., Nagaraja, K. V, Coon, C.N., 1988. Efficacy of infectious bronchitis virus vaccines against heterologous challenge. *Res. Vet. Sci.* 45, 22–27.
- Ndifuna, A., Waters, A.K., Zhou, M., Collisson, E.W., 1998. Recombinant nucleocapsid protein is potentially an inexpensive, effective serodiagnostic reagent for infectious bronchitis virus. *J. Virol. Methods* 70, 37–44. doi:10.1016/S0166-0934(97)00170-5
- Pradhan, S.K., Kamble, N.M., Pillai, A.S., Gaikwad, S.S., Khulape, S.A., Reddy, M.R., Mohan, C.M., Kataria, J.M., Dey, S., 2014. Recombinant nucleocapsid protein based single serum dilution ELISA for the detection of antibodies to infectious bronchitis virus in poultry. *J. Virol. Methods* 209, 1–6. doi:10.1016/j.jviromet.2014.08.015
- Raj, G.D., Jones, R.C., 1997. Infectious bronchitis virus: Immunopathogenesis of infection in the chicken. *Avian Pathol.* 26, 677–706. doi:10.1080/03079459708419246
- Schelle, B., Karl, N., Ludewig, B., Siddell, S.G., Thiel, V., 2005. Selective replication of coronavirus genomes that express nucleocapsid protein. *J. Virol.* 79, 6620–6630. doi:10.1128/JVI.79.11.6620-6630.2005
- Seo, S.H., Collisson, E.W., 1997. Specific cytotoxic T lymphocytes are involved in in vivo clearance of infectious bronchitis virus. *J. Virol.* 71, 5173–7.
- Seuberlich, T., Tratschin, J.D., Thur, B., Hofmann, M. a, 2002. Nucleocapsid protein-based enzyme-linked immunosorbent assay for detection and differentiation of antibodies against European and North American porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Clin Diagn Lab Immunol* 9, 1183–1191. doi:10.1128/CDLI.9.6.1183
- Sneed, L.W., Butcher, G.D., Parr, R., Wang, L., Collisson, E.W., 1989. Comparisons of the structural proteins of avian infectious bronchitis virus as determined by western blot analysis. *Viral Immunol.* 2, 221–227.
- Williams, A.K., Li, W., Sneed, L.W., Collisson, E.W., 1992. Comparative analyses of the nucleocapsid genes of several strains of infectious bronchitis virus and other coronaviruses. *Virus Res.* 25, 213–222. doi:10.1016/0168-1702(92)90135-V
- Witte, S.B., Chard-Bergstrom, C., Loughin, T.A., Kapil, S., 2000. Development of a recombinant nucleoprotein-based enzyme-linked immunosorbent assay for

quantification of antibodies against porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 7, 700–702.

Zhang, D.Y., Zhou, J.Y., Fang, J., Hu, J.Q., Wu, J.X., Mu, A.X., 2005. An ELISA for antibodies to infectious bronchitis virus based on nucleocapsid protein produced in *Escherichia coli* 2005, 336–344.

Zhou, M., Collisson, E.W., 2000. The amino and carboxyl domains of the infectious bronchitis virus nucleocapsid protein interact with 3' genomic RNA. *Virus Res.* 67, 31–39.

5.2 Artigo 3

Produção e caracterização de anticorpos monoclonais contra a nucleoproteína do vírus da bronquite infecciosa das galinhas

Paula Fonseca Finger, Carolina Georg Magalhães, Marcos Roberto Ferreira, Marcelo Mendonça, Paulo Augusto Esteves, Fábio Pereira Leivas Leite, Ângela Nunes Moreira, Fabricio Rochedo Conceição

Será submetido à revista Journal of Virological Methods

Produção e caracterização de anticorpos monoclonais contra a nucleoproteína do vírus da bronquite infecciosa das galinhas

Paula Fonseca Finger, Carolina Georg Magalhães, Marcos Roberto Ferreira, Marcelo Mendonça, Paulo Augusto Esteves, Fábio Pereira Leivas Leite, Ângela Nunes Moreira, Fabricio Rochedo Conceição

RESUMO

A bronquite infecciosa das galinhas (BIG) é uma doença altamente contagiosa que acomete galinhas, é causada pelo vírus da bronquite infecciosa (VBI) e ocasiona grandes prejuízos na avicultura. A nucleoproteína (N) está associada ao genoma viral para formar o nucleocapsídeo e é alvo de estudos visando o diagnóstico uma vez que apresenta a sequência bem conservada entre diferentes sorotipos do vírus. O presente estudo foi realizado com o objetivo de desenvolver anticorpos monoclonais contra a proteína N (nucleocapsídeo). O gene da nucleoproteína foi amplificado a partir da cepa vacinal *Massachusetts* e clonado em vetor pAE para posterior expressão em *Escherichia coli*. A proteína recombinante (rN) foi expressa na cepa BL21 Star, obtida na forma solúvel, sendo então utilizada para as imunizações dos camundongos. Camundongos BALB/c receberam 8 inoculações com a proteína rN e, a partir da fusão de células SP2/O e os esplenócitos dos animais imunizados, obtivemos cinco hibridomas secretores de MAbs anti-rN. Dois MAbs nomeados de B7 e E2, os quais demonstraram reações mais fortes por ELISA, foram melhor caracterizados. Através da isotipagem, pode-se determinar que ambos pertencem ao isotipo IgM. A titulação dos MAbs B7 e D3 por ELISA utilizando a proteína rN como antígeno, demonstrou um título de 1:51.200 e 1:25.600, respectivamente. Além disso, os MAbs B7 e E2 foram positivos em ELISA indireto e *Western blot* contra o vírus vacinal de BIG e a proteína recombinante. Quando testados contra os vírus de Gumboro e Newcastle, não foi verificada nenhuma reação por *Western blot*, demonstrando serem específicos. Desta forma, os MAbs anti-rN de VBI obtidos neste estudo podem ser futuramente utilizados em teste de diagnóstico para a bronquite infecciosa das galinhas.

Palavras-chave: VBI, BIG, nucleoproteína, anticorpos monoclonais.

1. Introdução

A bronquite infecciosa das galinhas (BIG) é uma doença altamente contagiosa que ocasiona grandes perdas na avicultura (Cavanagh, 2007). O vírus acomete as aves de todas as idades e pode replicar-se em diversos tecidos, ocasionados sintomas respiratórios, digestivos, queda na produção e qualidade dos ovos (Pena et al., 2005).

A prevenção da BIG é de grande importância econômica para a indústria avícola devido a alta morbidade e a queda na produção associadas à doença. Para tal, vacinas são amplamente utilizadas no mundo todo, porém surtos da doença ainda ocorrem com frequência, sugerindo que pode ocorrer baixa proteção cruzada entre os sorotipos do vírus da bronquite infecciosa das galinhas (VBIG) (Bande et al., 2015).

O vírus da bronquite infecciosa (VBI) é o agente etiológico da BIG, o qual é pertencente à família *Coronaviridae*, gênero *Coronavirus*, que possui genoma RNA de fita simples, não segmentado, com sentido positivo e 27,6 Kilobases (Kb) de comprimento (Cavanagh et al., 1997). O genoma desse vírus codifica para quatro proteínas estruturais, proteína do nucleocapsídeo (N), proteína de superfície (S), proteína do envelope (E) e proteína da membrana (M). A nucleoproteína (N) está associada ao genoma viral para formar o nucleocapsídeo, uma proteína de 409 aminoácidos com uma massa molecular de cerca de 50 KDa (Bourisnell et al., 1985; Macnaughton et al., 1977). Geralmente, tal proteína apresenta alta identidade entre as diferentes cepas de IBV (91±96.5%), sendo uma proteína bastante imunogênica e abundantemente expressa durante o processo de infecção viral (Williams et al., 1992). Em vista disso, a proteína N do IBV reúne um número significativo de atributos para ser utilizada como antígeno de eleição em métodos de diagnóstico sorológicos para detecção de anticorpos desta enfermidade e, tem sido vem sendo estudada, demonstrando ser um alvo importante no diagnóstico da doença (Ndifuna et al., 1998; Williams et al., 1992).

O desenvolvimento de anticorpos monoclonais (MAbs) contra o VBI é de grande importância para incrementar o diagnóstico clínico. Ensaios sorológicos, como ELISA de captura, podem ser utilizados para detecção do antígeno em amostras clínicas, tornando o diagnóstico mais rápido e específico. Além disso, os MAbs têm sido utilizados para identificar epítomos lineares ou para mimetizar os epítomos do agente da infecção. Por exemplo, em estudo realizado por Han et al. (2013) utilizaram dois MAbs contra a proteína do nucleocapsídeo do VBI produzidos pela técnica de *phage display*, que foram capazes de identificar cepas heterólogas de VBI.

Devido à importância da utilização de MAbS para a bronquite infecciosa das galinhas, nosso estudo desenvolveu anticorpos monoclonais contra a nucleoproteína do vírus, produzida de forma recombinante em sistema procarioto. Os MAbS produzidos em nosso estudo podem ser de grande utilidade no diagnóstico da doença utilizando técnicas imunológicas.

2. Materiais e Métodos

2.1. Clonagem da Nucleoproteína e Preparação do antígeno:

O RNA viral estirpe M41 do IBV (Massachusetts) foi extraído da suspensão de LCA (Líquido Cório-alantóide) infectado, obtendo-se o cDNA por transcrição reversa (RT) e, em seguida, foi amplificada pela reação em cadeia da polimerase (PCR) o gene da proteína N. Com base na sequência do gene da proteína N da estirpe M41 do IBV (GenBank nº de acesso - M28566) foram desenhados os *primers forward* e *reverse* para a completa amplificação do gene que codifica para a proteína desejada. Sítios de clivagem para *XhoI* e *KpnI* foram introduzidos no *primer forward* (5' - CCGCTCGAGATGGCAAGCGGTAAGGCAA – 3') e *reverse* (5' – GGGGTACCTCAAAGTTCATTCTCTCCTA – 3'), respectivamente.

O produto amplificado na PCR foi purificado através do GFX PCR DNA e Gel Band Purification Kit (GE Healthcare, USA), de acordo com as especificações do fabricante. O produto da PCR e o vetor de expressão em *E. coli*, pAE, foram digeridos com enzimas de restrição *XhoI* e *KpnI* (Invitrogen), e então ligados com T4 DNA – ligase (Thermo Scientific). O produto da ligação foi utilizado para transformar, por choque térmico, a cepa TOP10F de *E. coli*. Os transformantes foram selecionados em placas com meio Luria Bertani (1% de triptona, 0,5% de extrato de levedura, 0,5% de NaCl e 2% de Agar) contendo 100 µg/mL de ampicilina (Sigma Aldrich).

O plasmídeo recombinante foi inserido em *E. coli* BL21 Star e cultivado em meio Luria Bertani (LB) contendo 100 µg/mL ampicilina. A cultura, depois da adição do agente de indução, foi incubada por mais 3 horas a 37 °C sob agitação de 200 rpm.

O *pellet* celular obtido da expressão foi ressuspendido em tampão de lavagem Akta Wash (0,234% de NaH₂PO₄, 2,92% de NaCl e 0,068% de Imidazole) adicionado de lisozima (Sigma Aldrich), submetido à sonicação por sete ciclos de 20 segundos a 60 Hz e então centrifugado novamente.

2.2. Produção de Monoclonal para Nucleoproteína recombinante de VBI

Para produção dos MAbs, camundongos da linhagem BALB/c, fêmeas, com seis semanas de idade foram inoculadas intraperitonealmente (i.p) com 100 µg de proteína recombinante (rN) homogeneizado (1:1) com adjuvante completo de Freund (ACF, Sigma Aldrich). Após duas semanas, foi realizada uma segunda inoculação, porém a rN foi acrescida de adjuvante incompleto de Freund (AIF, Sigma Aldrich) e seguiu-se a administração via i.p semanalmente, por mais 8 semanas. Três dias antes da última inoculação, o camundongo que demonstrou um maior título de anticorpos em ELISA indireto realizado com a proteína rN, recebeu um “booster” de imunizações com a proteína recombinante via i.p. e intravenosa. No dia da fusão, o animal inoculado foi eutanasiado e teve o baço removido em ambiente estéril. O baço foi macerado em meio de cultivo incompleto (MI), centrifugado a 1000 x g por 8 min e as células suspensas em MI, sendo novamente centrifugadas. Ao final de três centrifugações para a remoção dos debris, as células foram suspensas em 10 mL de MI. Após as lavagens, os esplenócitos foram fusionados com células de mieloma Sp2/O-Ag14 na presença de 50% (w/v) de polietilenoglicol (PEG) 1450 (Sigma), adicionado durante 1 minuto e, em seguida, um volume de 9 mL de MI foi acrescentado durante 5 minutos. As células foram centrifugadas a 1000 x g por 10 min, ressuspensas em 50 mL de meio DMEM contendo hipoxantina ($1 \times 10^{-6} \text{M}$), aminopterina ($4 \times 10^{-9} \text{M}$) e timidina ($1,6 \times 10^{-7} \text{M}$) (HAT; Sigma) e 20% de soro fetal bovino, sendo então distribuídas em 5 placas de cultivo celular (0,1 mL/cavidade). As placas foram incubadas a 37 °C em estufa contendo 5% de CO₂.

2.3. Caracterização dos anticorpos monoclonais

Os MAbs que reagiram positivamente com o antígeno da proteína N recombinante no ELISA indireto foram selecionados. Esses clones de hibridomas reagentes no ELISA foram inoculados nos camundongos previamente sensibilizados com Pristane (Sigma-Aldrich) para produção de fluído ascítico. Os MAbs foram purificados por cromatografia de afinidade utilizando coluna de proteína A- Sefarose (GE Healthcare), e a classe de cada MAb foi determinada por ELISA utilizando o Kit de Isotipagem (Sigma). Após purificação, os MAbs foram titulados através de ELISA indireto com a proteína rN e quantificados por Qubit™ (Thermo Fisher Scientific).

Para confirmar a caracterização e especificidade dos MAbs, foi realizada a eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) e posterior análise por *Western blotting* transferindo para uma membrana de nitrocelulose (Hybond ECL) a proteína rN, a amostra do vírus VBIG e uma amostra do vírus da Bouba aviária. As membranas foram bloqueadas com 5% de leite em pó em PBS-T por 1 h. Após três lavagens com tampão PBS-T, as membranas foram incubadas com dois diferentes MAbs anti-rN (B7 e E2) por 1 h. Posterior às lavagens, as membranas foram incubadas com anticorpo de cabra anti-mouse IgG total conjugado com peroxidase diluído 1:4000 (Sigma) por 1 h, seguido por desenvolvimento de reação de cor por DAB (3,3 diaminobenzidine, Sigma).

Além desses testes, também foi realizado um ELISA utilizando diferentes antígenos aviários, bem como o VBIG, a fim de verificar a ocorrência de alguma reação inespecífica dos MAbs. Para isso, microplaca de 96 cavidades (Nunc MaxiSorp®) foi sensibilizada com uma dose da vacina contra Gumboro, uma dose da vacina contra Newcastle, uma dose da vacina contra BIG e 100 ng de rN. Após a sensibilização overnight a 4 °C, a placa foi lavada com solução de PBS-T por 3 vezes e bloqueada com solução de BSA 0,1% (Albumina bovina sérica em PBS-T) e incubada por 1 hora a 37 °C. Após, foram adicionados os MAbs na diluição 1:500, sendo a placa incubada por 1 hora a 37 °C. Posteriormente foram realizadas mais 3 lavagens com PBS-T e o conjugado anti-mouse IgG total foi adicionado na diluição de 1:4000, incubando por mais 1 hora a 37 °C. No último passo foram realizadas cinco lavagens e a reação foi revelada por adição de OPD (o-Phenylenediamine dihydrochloride). A reação foi interrompida com a solução de H₂SO₄ 2 N e analisada em espectrofotômetro com comprimento de onda de 492 nm.

3. Resultados

A expressão do fragmento correspondente a 1200 pb do gene que codifica para a proteína N foi amplificado por RT-PCR (dados não mostrados). A nucleoproteína recombinante foi expressa em *E. coli* cepa BL21 Star, extraída e purificada de forma solúvel, reagindo frente a soro monoclonal Anti-Histidina (Sigma-Aldrich) no Western Blot (Figura 1).

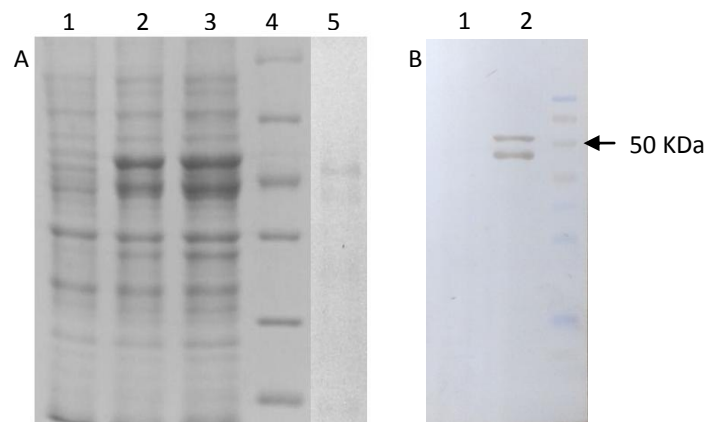


FIGURA 1 ANÁLISE DA EXPRESSÃO DA PROTEÍNA N A- ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA 12% 1- CEPA *E. COLI* BL21 STAR, 2- CULTIVO DE N NÃO INDUZIDO, 3- CULTIVO DE N INDUZIDO, 4- MARCADOR, 5- N PURIFICADA B- WESTERN BLOT FRENTE À ANTI-6XHis 1- CONTROLE NEGATIVO, 2- PROTEÍNA rN, 2- MARCADOR

Após a última imunização com a proteína recombinante, os soros dos camundongos foram titulados por ELISA indireto, o animal que apresentou título mais alto (1:25.600), foi escolhido para a fusão. Um total de cinco MAbs (B7, E2, D3, F5, F4), imortalizados produtores de anticorpos contra a proteína rN foram adquiridos. Na análise de isotipagem foi demonstrado que todos os MAbs são do subtipo IgM. Entretanto, somente 3 hibridomas, B7, D3 e E2, que foram obtidos de clonagens diferentes e continuaram reagindo positivamente no ELISA indireto contra rN, foram utilizados em caracterizações posteriores. Os hibridomas selecionados foram expandidos em tumores ascíticos em camundongos para a obtenção de maior quantidade de MAbs. Em seguida, os MAbs foram purificados através de cromatografia de afinidade em colunas de proteína A. Na análise de SDS-PAGE foram utilizados 3 MAbs e para o *Western Blot* utilizamos 2 MAbs para verificar reação dos mesmos frente ao VBig, rN e vírus da Boubá, os quais demonstraram um padrão de bandas característico de anticorpo da classe IgM (Figura 2), pois apresentaram duas bandas do mesmo padrão do isotipo IgM, o qual foi utilizado como controle no gel. Ainda, ambos reagiram com uma amostra de IBV clássica e a proteína recombinante, sem ocorrer reação com uma amostra do vírus de Boubá (Figura 3), confirmando a especificidade dos MAbs.

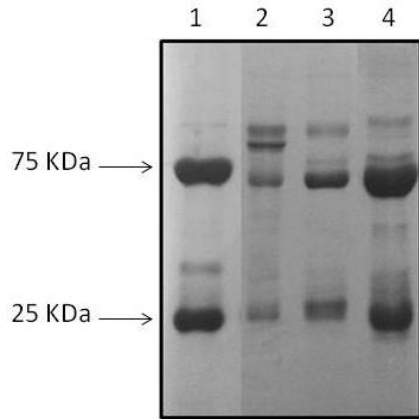


FIGURA 2 ANÁLISE DOS MABS POR ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA 12% 1- ANTICORPO IGM (CONTROLE), 2- MAB BIG-RN D3, 3- MAB BIG-RN B7, 4- MAB BIG-RN E2

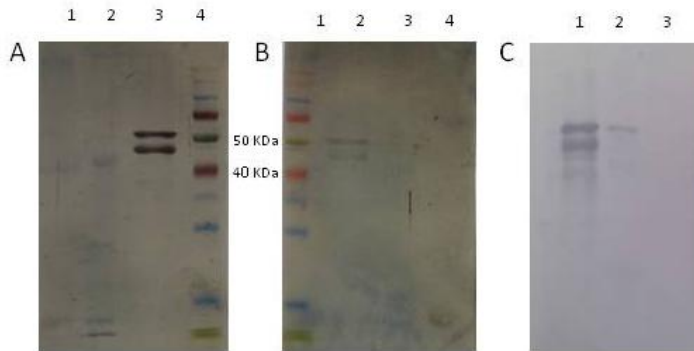


FIGURA 3 WESTERN BLOT UTILIZANDO OS MABS B7 E E2, E SORO POLICLONAL RN PRODUZIDO EM CAMUNDONGO. A - MAB B7 1- VÍRUS BOUBA, 2- VÍRUS BIG, 3- rN, 4- MARCADOR. B- MAB E2 1- MARCADOR, 2- rN, 3- VÍRUS BIG, 4- VÍRUS BOUBA. C- POLICLONAL 1- rN, 2- VÍRUS BIG, 3- VÍRUS BOUBA

Para determinar a curva de titulação, dois MAb foram utilizados (B7 e D3), sendo realizado um ELISA indireto utilizando como antígeno a proteína rN. As preparações de MAb foram ajustadas para a concentração de $0,7 \text{ mg.mL}^{-1}$, diluídas em base 2 e testadas em duplicata. A Fig. 4 demonstra as curvas de titulação da reação de cada um dos MAb e pode-se considerar que o MAb B7 foi o que obteve melhores resultados.

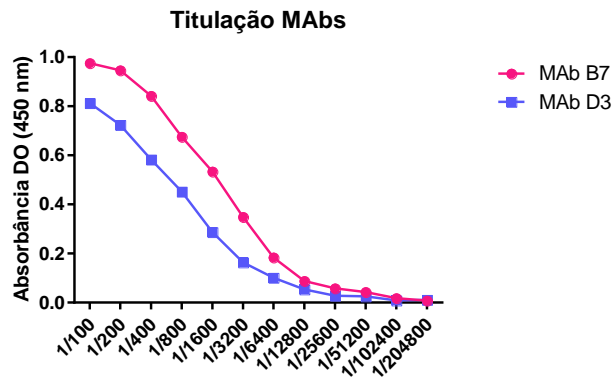


FIGURA 4 CURVA DE TITULAÇÃO DOS MABS B7 E D3 FRENTE À PROTEINA rN.

Com relação ao teste de especificidade, foram testados os MAbS B7, E2 e D3, demonstrando em todos uma maior reação frente à rN e VBIG, ao contrário dos vírus de Newcastle e Gumboro que obtiveram baixa reação (Fig. 5).

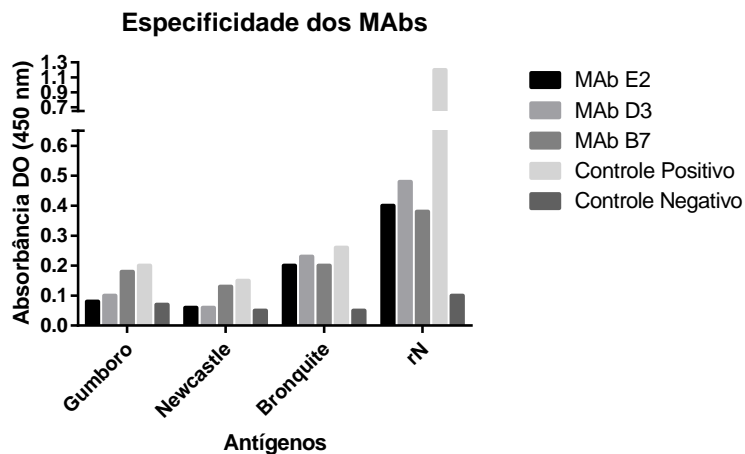


FIGURA 5 ELISA PARA AVALIAR A ESPECIFICIDADE DOS MABS ANTI-rN FRENTE A DIFERENTES ANTÍGENOS VACINAIS DE VÍRUS AVIÁRIOS

4. Discussão

A nucleoproteína do vírus da bronquite infecciosa é importante na geração de anticorpos no momento da infecção ou através da vacinação, é a mais abundante durante a infecção viral por VBIG, sendo a principal proteína de escolha para realização de teste de

detecção de anticorpos em animais (Breard et al., 2013). O mesmo acontece no vírus da síndrome respiratória e reprodutiva de suínos (PRRS), para o qual um estudo utilizando a proteína N recombinante na detecção de anticorpos por meio de ELISA demonstrou ser eficaz (Seuberlich et al., 2002). De acordo com Witte et al. (2000), a nucleoproteína do PRRS demonstrou ser altamente imunogênica e capaz de produzir anticorpos rapidamente após infecção pelo vírus.

O VBI, por ser um vírus RNA, apresenta eventos de mutação, porém, a proteína N é bastante conservada entre as diversas cepas do vírus e se mantém mesmo após esses eventos (Williams et al., 1992). Além disso, é conhecida por ser altamente imunogênica, sendo capaz de induzir a produção de anticorpos e linfócitos T efetores específicos, sobretudo com ação citotóxica (Seo and Collisson, 1997). Em virtude disso, a proteína N do VBI vem sendo estudada como um alvo importante no diagnóstico, uma vez que reúne um número significativo de atributos para se constituir no antígeno de eleição para o desenvolvimento de ensaios sorológicos a serem empregados na detecção/mensuração de anticorpos para essa enfermidade (Ndifuna et al., 1998). Sendo assim, a aplicação de anticorpos monoclonais contra essa proteína do vírus pode ser uma ferramenta de grande valor para a detecção direta do VBI em amostras teciduais suspeitas de infecção, por meio de técnicas de imunofluorescência, imunoperoxidase ou de ELISA (Ndifuna et al., 1998; Wit, 2000).

Com relação aos resultados obtidos na isotipagem dos MABs produzidos, era esperado que fossem do tipo IgG, uma vez que foram realizadas 8 inoculações, resultados esses que já foram descritos em outros estudos, nos quais os animais recebiam de 3 a 4 imunizações (Ignjatovic and McWaters, 1991; Naqi et al., 1993; Cardozo et al., 2001; Souza et al., 2001; Chen et al., 2011). Porém, o protocolo seguido foi o mesmo para o MAB controle de isotipo IgM, o qual foi utilizado como controle no SDS-PAGE, e também consistiu de um período longo de imunizações, a fim de obter uma maior afinidade dos anticorpos. Sabe-se que anticorpos do tipo IgM são importantes para utilização em ensaios de precipitação, testes que são bastante utilizados para detecção de antígeno VBI, como por exemplo teste de precipitação em Agar gel (AGP), no qual podem ser utilizados MABs do isotipo IgM (Fábio and Rossini, 2007).

Em estudo realizado por Souza et al. (2001) foram produzidos MABs contra as proteínas N e S2 do VBI, ambas da amostra M41. O anticorpo desenvolvido contra a S2 mostrou-se como uma boa ferramenta de diagnóstico do VBI, podendo ser aplicado em ensaios de rotina laboratorial independentemente do sorotipo, principalmente no diagnóstico diferencial para doenças que se confundem com a VBI. Enquanto o anticorpo contra a

proteína N demonstrou reconhecer uma região menos conservada entre as estirpes de VBI, podendo ser utilizado em estudos comparativos entre isolados do vírus.

Nos anos de 1990, iniciou-se os estudos que revelaram a grande diversidade de VBI que causavam a doença na China e, em estudo realizado por (Wu et al., 1998), através da utilização de anticorpos monoclonais, foi possível identificar as variantes patogênicas do vírus. Nos EUA não foi diferente, um estudo retrospectivo realizado por Jia et al. (2002) utilizando anticorpos monoclonais e análises moleculares da subunidade S1 do VBI, identificaram vírus diferentes da cepa vacinal que haviam sido isolados desde a década de 40. Estudos como esses já citados comprovam a importância da utilização dos MAb para a identificação antigênica dos vírus.

Nos últimos anos, um grande número de MAb têm sido desenvolvidos para o diagnóstico de enfermidades causadas por Coronavírus. Em estudo realizado por Zou et al. (2015), foram produzidos monoclonais contra a glicoproteína S1 do VBI, os quais demonstraram reação cruzada com 10 cepas diferentes do vírus e não reagiram com outros vírus, tais como Newcastle e Influenza. Ainda, os MAb produzidos nesse estudo demonstraram ser do isotipo IgM, mesmo resultado encontrado no nosso estudo. O mesmo ocorreu com os MAb produzidos no presente estudo, uma vez que não apresentaram reação cruzada com vírus de Buba e Newcastle, podendo ser utilizados em testes de diagnóstico, como por exemplo do tipo ELISA.

Estudo semelhante foi realizado com a proteína N de SARS (Síndrome respiratória suína), cujo agente também trata-se de um Coronavírus. Nesse estudo realizado por He et al. (2005), a proteína recombinante foi utilizada para produzir os MAb e após a obtenção dos melhores anticorpos, foi realizado o teste de ELISA de captura, demonstrando que não houve resultados falso positivos ao testar 60 amostras de soro e também não houve reação cruzada com o VBI. Um ELISA de bloqueio foi desenvolvido por Chen et al. (2011) utilizando MAb frente ao VBI, o qual demonstrou sensibilidade de 98% e especificidade de 97,2% ao analisar 390 amostras. O teste detectou todos os sorotipos de VBI de Taiwan, mas não três isolados de outros sorotipos, nem soros contra a gripe aviária e outros patógenos. Este anticorpo tem potencial para ser utilizado em um método rápido e confiável para diagnóstico de infecções do VBI de isolados de campo em Taiwan.

Através da técnica de *phage display*, no estudo de Gibertoni (2010) foi construída uma biblioteca de fragmentos de anticorpos scFv recombinantes com reatividade para cepas heterólogas à vacinal H120 do VBI, sendo que os fragmentos de anticorpos monoclonais

recombinantes obtidos neste estudo, demonstraram a capacidade de reagir com a nucleoproteína de três diferentes estirpes do VBI.

Os resultados obtidos no *Western Blot* e titulação dos MAbs produzidos no presente estudo aparentemente demonstram que o MAb B7 possa ser mais específico, uma vez que apresentou reação mais intensa frente à rN e VBIg, bem como uma titulação maior do que o D3. Comparando os estudos já realizados, tanto com a proteína N quanto com as demais proteínas do VBIg, buscando um monoclonal de qualidade, acredita-se no potencial dos nossos MAbs para uso como ferramenta em testes de imunodiagnóstico para o VBIg.

Em conclusão, os anticorpos monoclonais produzidos neste estudo foram específicos para a proteína N recombinante de VBIg e, futuramente, esses poderão ser utilizados em teste de diagnóstico, facilitando a detecção da enfermidade nas aves.

Referências

- Bande, F., Arshad, S.S., Hair Bejo, M., Moeini, H., Omar, A.R., 2015. Progress and Challenges toward the Development of Vaccines against Avian Infectious Bronchitis. *J. Immunol. Res.* 2015, 1–12. doi:10.1155/2015/424860
- Bournsnel, M.E., Binns, M.M., Foulds, I.J., Brown, T.D., 1985. Sequences of the nucleocapsid genes from two strains of avian infectious bronchitis virus. *J Gen Virol* 66 (Pt 3), 573–580.
- Breard, E., Lara, E., Comtet, L., Viarouge, C., Doceul, V., Desprat, A., Vitour, D., Pozzi, N., Cay, A.B., De Regge, N., Pourquier, P., Schirrmeier, H., Hoffmann, B., Beer, M., Sailleau, C., Zientara, S., 2013. Validation of a commercially available indirect ELISA using a nucleocapside recombinant protein for detection of Schmallenberg virus antibodies. *PLoS One* 8, e53446. doi:10.1371/journal.pone.0053446
- Cardozo, R.M., Martins, N.R.S., Resende, J.S., Resende, M., Teixeira, A.A.P., Jorge, M.A., Souza, M.B., Epiphanyo, E.O.B., 2001. Produção e caracterização de anticorpos monoclonais contra o vírus da bronquite infecciosa das galinhas. *Arq. Bras. Med. Veterinária e Zootec.* 53, 290–298. doi:10.1590/S0102-09352001000300004
- Cavanagh, D., 2007. Coronavirus avian infectious bronchitis virus. *Vet. Res.* 38, 281–297. doi:10.1051/vetres:2006055
- Cavanagh, D., Elus, M.M., Cook, J.K., 1997. Relationship between sequence variation in the S1 spike protein of infectious bronchitis virus and the extent of cross-protection in vivo. *Avian Pathol.* 26, 63–74. doi:10.1080/03079459708419194

- Chen, H.-W., Wang, C.-H., Cheng, I.-C., 2011. A type-specific blocking ELISA for the detection of infectious bronchitis virus antibody. *J. Virol. Methods* 173, 7–12. doi:10.1016/j.jviromet.2010.12.016
- Fábio, J. Di, Rossini, L.I., 2007. Bronquite infecciosa das galinhas. 14^o Curso Sanidade Avícola Fort Dodge 19.
- Gibertoni, A.M., 2010. Construção de uma biblioteca de fragmentos de anticorpos monoclonais de galinhas com cadeia única (scFv) por phage display com reatividade cruzada para estirpes heterólogas do vírus da bronquite infecciosa aviária.
- Han, Z., Zhao, F., Shao, Y., Liu, X., Kong, X., Song, Y., Liu, S., 2013. Fine level epitope mapping and conservation analysis of two novel linear B-cell epitopes of the avian infectious bronchitis coronavirus nucleocapsid protein. *Virus Res.* 171, 54–64. doi:10.1016/j.virusres.2012.10.028
- He, Q., Du, Q., Lau, S., Manopo, I., Lu, L., Chan, S.-W., Fenner, B.J., Kwang, J., 2005. Characterization of monoclonal antibody against SARS coronavirus nucleocapsid antigen and development of an antigen capture ELISA. *J. Virol. Methods* 127, 46–53. doi:10.1016/j.jviromet.2005.03.004
- Ignjatovic, J., McWaters, P.G., 1991. Monoclonal antibodies to three structural proteins of avian infectious bronchitis virus: characterization of epitopes and antigenic differentiation of Australian strains. *J. Gen. Virol.* 72 (Pt 12), 2915–2922. doi:10.1099/0022-1317-72-12-2915
- Jia, W., Mondal, S.P., Naqi, S.A., 2002. Genetic and antigenic diversity in avian infectious bronchitis virus isolates of the 1940s. *Avian Dis.* 46, 437–441. doi:10.1637/0005-2086(2002)046[0437:GAADIA]2.0.CO;2
- Macnaughton, M.R., Madge, M.H., Davies, H.A., Dourmashkin, R.R., 1977. Polypeptides of the surface projections and the ribonucleoprotein of avian infectious bronchitis virus. *J. Virol* 24, 821–825.
- Naqi, S.A., Karaca, K., Bauman, B., 1993. A monoclonal antibody-based antigen capture enzyme-linked immunosorbent assay for identification of infectious bronchitis virus serotypes. *Avian Pathol.* 22, 555–564. doi:10.1080/03079459308418943
- Ndifuna, A., Waters, A.K., Zhou, M., Collisson, E.W., 1998. Recombinant nucleocapsid protein is potentially an inexpensive, effective serodiagnostic reagent for infectious bronchitis virus. *J. Virol. Methods* 70, 37–44. doi:10.1016/S0166-0934(97)00170-5
- PENA L.J. et al. Bronquite infecciosa das galinhas. *Arquivos do Instituto Biológico, São Paulo*, v.72, n.3, pp. 397-404, 2005.
- Seo, S.H., Collisson, E.W., 1997. Specific cytotoxic T lymphocytes are involved in in vivo clearance of infectious bronchitis virus. *J. Virol.* 71, 5173–7.
- Seuberlich, T., Tratschin, J.D., Thur, B., Hofmann, M. a, 2002. Nucleocapsid protein-based

- enzyme-linked immunosorbent assay for detection and differentiation of antibodies against European and North American porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Clin Diagn Lab Immunol* 9, 1183–1191. doi:10.1128/CDLI.9.6.1183
- Sneed, L.W., Butcher, G.D., Parr, R., Wang, L., Collisson, E.W., 1989. Comparisons of the structural proteins of avian infectious bronchitis virus as determined by western blot analysis. *Viral Immunol.* 2, 221–227.
- Souza, C.M., Rocha, F.R.T., Martins, N.R.S., Resende, J.S., Jorge, M.A., Rampinelli, A.P., 2001. Production of monoclonal antibodies against conserved components of infectious bronchitis virus. *Arq. Bras. Med. Veterinária e Zootec.* 53, 523–530. doi:10.1590/S0102-09352001000500002
- Williams, A.K., Li, W., Sneed, L.W., Collisson, E.W., 1992. Comparative analyses of the nucleocapsid genes of several strains of infectious bronchitis virus and other coronaviruses. *Virus Res.* 25, 213–222. doi:10.1016/0168-1702(92)90135-V
- Wit, J.J. De, 2000. Detection of infectious bronchitis virus 9457, 71–93.
- Witte, S.B., Chard-Bergstrom, C., Loughin, T.A., Kapil, S., 2000. Development of a recombinant nucleoprotein-based enzyme-linked immunosorbent assay for quantification of antibodies against porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 7, 700–702.
- Wu, Z.Q., Yang, Q.W., Fu, C., Zhao, X.Y., Ignjatovic, J., 1998. Antigenic and immunogenic characterization of infectious bronchitis virus strains isolated in China between 1986 and 1995. *Avian Pathol.* 27, 578–585. doi:10.1080/03079459808419387
- Zou, N., Wang, F., Duan, Z., Xia, J., Wen, X., Yan, Q., Liu, P., Cao, S., Huang, Y., 2015. Development and characterization of neutralizing monoclonal antibodies against the S1 subunit protein of QX-like avian infectious bronchitis virus strain Sczy3. *Monoclon. Antib. Immunodiagn. Immunother.* 34, 17–24. doi:10.1089/mab.2014.0081

6 Considerações Finais

- Foi possível obter a proteína N do VBIG a partir da expressão heteróloga em *Escherichia coli*.

- A proteína recombinante foi produzida de forma solúvel, o que facilita o seu processo de produção.

- O ELISA indireto foi padronizado com 100 ng de antígeno (rN) por cavidade, os soros das aves foram diluídos 1:200 e o anticorpo anti-IgY conjugado foi utilizado na diluição de 1:10.000.

- Através da comparação do ELISA rN com um ELISA comercial, foi possível obter uma sensibilidade de 90,16% e especificidade de 90,34%, valores esses que são aceitáveis para a técnica de diagnóstico.

- Após a comparação dos testes de ELISA, os soros que obtiveram resultados discrepantes entre os testes foram submetidos à técnica de *Western Blotting* frente à proteína rN, resultando em reações positivas para aqueles soros que eram ditos como negativos no teste comercial.

- Além dos dados de ELISA, foi possível analisar os soros quanto à categoria e vacinação, demonstrando que muitos frangos de corte não são vacinados para BIG e apresentam anticorpos contra VBIG. Por outro lado, as aves de postura e matrizes apresentam anticorpos oriundos da vacinação.

- Anticorpos monoclonais foram produzidos frente à proteína N recombinante de VBIG e se mostraram eficientes em reagir tanto com a rN quanto com o VBIG, sem apresentar reação cruzada com outros vírus aviários (Bouba, Newcastle e Gumboro).

- Os imunobiológicos produzidos durante esse trabalho podem ser poderosas ferramentas para o diagnóstico e monitoramento da BIG.

Referências

ABDEL-MONEIM et al. High-Level Protein Expression Following Single and Dual Gene Cloning of Infectious Bronchitis Virus N and S Genes Using Baculovirus Systems. **Viral Immunology**, v. 27, pp. 75-81, 2014.

ABREU, J.T. et al. Molecular Studies of the Brazilian Infectious Bronchitis Virus Isolates. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, v. 12, pp.107-110, 2010.

AHMAD, Z.A. et al. scFv antibody: principles and clinical application. **Clinical and Developmental Immunology**, v. 2012, 15 p, 2012.

ALMEIDA, J. M. et al. **Impacto da bronquite infecciosa das aves no Brasil**. In: III Simpósio de sustentabilidade e ciência animal. 2013.

ANDRIS-WIDHOPF, J. et al. Methods for the generation of chicken monoclonal antibody fragments by phage display. **Journal of Immunology Methods**, v. 242, pp. 159–181, 2000.

ASSAYAG, M. S. J. **Características Patogênicas e Moleculares de Variantes Brasileiras do Vírus de Bronquite Infecciosa Inoculados em Aves Comerciais e SPF**. 2009. Thesis Doutorado (Microbiologia) – Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, São Paulo.

BACK, A. Bronquite Infecciosa das Galinhas. In: **Manual de Doenças de Aves**. Cascavel: Integração, 2010. p.35-39.

BALESTRIN, E. et al. Infectious bronchitis virus in different avian physiological systems - field study in Brazilian poultry flocks. **Poultry Science**, v. 93, pp. 1922-1929. 2014.

BANDE, F., ARSHAD, S.S., HAIR BEJO, M., MOEINI, H., OMAR, A.R. Progress and Challenges toward the Development of Vaccines against Avian Infectious Bronchitis. **Journal of Immunology Research**, v. 2015, pp. 1-12, 2015.

BERNARDINO, A. Programas de vacinação. In: MENDES, A.A; NAAS, I.A.; MACARI, M. (Eds.). Produção de frangos de corte. Campinas: FACTA, 2004. p.179-199.

BOOTS, A.M.H., BENAÏSSA-TROUW, B.J., HESSELINK, W., RIJKE, E., SCHRIER, C. & HENSEN, E.J. Induction of antiviral immune responses by immunisation with recombinant-DNA encoded avian coronavirus nucleocapsid protein. **Vaccine**, v. 10, pp. 119-124, 1992.

BOURSNELL, M.E., BINNS, M.M., FOULDS, I.J., BROWN, T.D. Sequences of the nucleocapsid genes from two strains of avian infectious bronchitis virus. **Journal of General Virology**, v. 66, pp. 573–580, 1985.

BREARD, E., LARA, E., COMTET, L., VIAROUGE, C., DOCEUL, V., DESPRAT, A., VITOUR, D., POZZI, N., CAY, A.B., DE REGGE, N., POURQUIER, P., SCHIRRMEIER, H., HOFFMANN, B., BEER, M., SAILLEAU, C., ZIENTARA, S. Validation of a commercially available indirect ELISA using a nucleocapsid recombinant protein for detection of Schmallenberg virus antibodies. **PLoS One** 8, 2013.

CARDOZO, R.M., MARTINS, N.R.S., RESENDE, J.S., RESENDE, M., TEIXEIRA, A.A.P., JORGE, M.A., SOUZA, M.B., EPIPHANIO, E.O.B.. Produção e caracterização de anticorpos monoclonais contra o vírus da bronquite infecciosa das galinhas. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 53, pp. 290–298, 2001.

CAVANAGH, D. Coronavirus IBV: structural characterization of the spike protein. **Journal of General Virology**, v. 64, pp. 2577-2583, 1983.

CAVANAGH, D. Coronavirus Avian Infectious Bronchitis Virus. **Veterinary Research**, v.38, pp. 281–97, 2007.

CAVANAGH, D. Coronavirus IBV: further evidence that the surface projections are associated with two glycopolypeptides. **Journal of General Virology**, v. 64, pp. 1787–1791, 1983.

CAVANAGH, D. et al. Amino acids within hypervariable region 1 of avian coronavirus IBV (Massachusetts serotype) spike glycoprotein are associated with neutralization epitopes. **Virus Research**, v. 11, pp. 141-50, 1988.

CAVANAGH, D., ELUS, M.M., COOK, J.K. 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, pp. 63–74, 1997.

CAVANAGH D, NAQI SA. Infectious bronchitis. In: Saif YM, Barnes HJ, Glisson JR, Fadly AM, McDougald LR, Swayne DE. Diseases of Poultry. 11 a ed. Ames: Iowa State Press; p. 101-119, 2003

CARON, L. F. Etiology and immunology of infectious bronchitis virus. **Revista Brasileira de Ciencia Avicola**, v. 12, pp. 115–119, 2010.

CHACÓN, J.L. et al. Epidemiological survey and molecular characterization of avian infectious bronchitis virus in Brazil between 2003 and 2009. **Avian Pathology**, v. 40, pp. 153-162, 2011.

CHEN, H., COOTE, B., ATTREE, S., HISCOX, J.A. Evaluation of a nucleoprotein-based enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of antibodies against infectious bronchitis virus. **Avian Pathology**, v. 32, pp. 519–526, 2003

CHEN, H.-W., WANG, C.-H., CHENG, I.-C. A type-specific blocking ELISA for the detection of infectious bronchitis virus antibody. **Journal of General Virology**, v. 173, pp. 7–12, 2011.

COOK, J. Bronquite infecciosa aviária: situação mundial e distribuição de sorotipos. In: SIMPÓSIO SOBRE SANIDADE AVÍCOLA, 1997, São Paulo. **Anais..** São Paulo: FACTA, 1997. p.13-27.

DARBYSHIRE, J. H.; PETERS, R.W. Humoral antibody response and assessment of protection following primary vaccination of chicks with maternally derived antibody against avian infectious bronchitis virus. **Research in Veterinary Science**, v. 38, pp. 14–21, 1985.

De WIT, J. et al. Efficacy of infectious bronchitis virus vaccinations in the field: association between the alpha-IBV IgM response, protection and vaccine application parameters. **Avian Pathology**, v.39, pp. 123-131, 2010.

De WIT, J. Detection of infectious bronchitis virus. **Avian Pathology**, v. 29, pp. 71–93, 2000.

DHAMA, K.D. et al. Emergence of Avian Infectious Bronchitis virus and its Variants Need Better Diagnosis, Prevention and Control Strategies. **Pakistan Journal of Biological Sciences**, v. 17, pp. 751-767, 2014.

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

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

DI FABIO, J.; ROSSINI, L.I. **Bronquite infecciosa das galinhas**. In: 14^o Curso de Sanidade Avícola Fort Dodge. Campinas – SP – Brasil, 2007.

DI FÁBIO, J; ROSSINI, L.I. Bronquite infecciosa das galinhas. In: BERCHIERI, J. R.; MACARI, M. (Ed.). Doença das aves. Campinas: FACTA, 2000. p.293-300.

DING, M., WANG, H., CAO, H., FAN, W., MA, B., XU, P., ZHANG, A., YANG, X. Development of a multi-epitope antigen of S protein-based ELISA for antibodies detection against infectious bronchitis virus. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 79, pp. 1287–1295, 2015.

FERNANDO, F.S. et al. Nephritis Associated with a S1 Variant Brazilian Isolate of Infectious Bronchitis Virus and Vaccine Protection Test in Experimentally Infected Chickens. **International Journal of Poultry Science**, v. 12, pp. 639-646, 2013.

FERNANDES, C.C. et al. Construção de uma biblioteca de fragmentos de anticorpos monoclonais de galinhas com cadeia única (scFv) por phage display com reatividade cruzada para estirpes heterólogas do vírus da bronquite infecciosa aviária. **Ciência Rural**, v. 40, pp. 1347-1353, 2010.

FRAGA, A.T. et al. Emergence of a New Genotype of Avian Infectious Bronchitis Virus in Brazil. **Avian Diseases**, v. 57, pp. 225-232, 2013.

GIBERTONI, A.M., 2010. Construção de uma biblioteca de fragmentos de anticorpos monoclonais de galinhas com cadeia única (scFv) por phage display com reatividade cruzada para estirpes heterólogas do vírus da bronquite infecciosa aviária. **Ciência Rural**, v. .40, n. 6, pp. 1347-1353, 2010.

GRAHAM, F.L. Adenovirus vectors for high-efficiency gene transfer into mammalian cells. **Trends in Immunology Today**, v. 21, pp. 426-428, 2000.

HAN, Z., ZHAO, F., SHAO, Y., LIU, X., KONG, X., SONG, Y., LIU, S. Fine level epitope mapping and conservation analysis of two novel linear B-cell epitopes of the avian infectious bronchitis coronavirus nucleocapsid protein. **Virus Research**, v. 171, pp. 54–64, 2013.

HE, Q., DU, Q., LAU, S., MANOPO, I., LU, L., CHAN, S.-W., FENNER, B.J., KWANG, J. Characterization of monoclonal antibody against SARS coronavirus nucleocapsid antigen and development of an antigen capture ELISA. **Journal of Virological Methods**, v. 127, pp. 46–53, 2005.

HUANG, S.H. et al. One-step immunochromatographic assay for the detection of *Staphylococcus aureus*. **Food Control**, v. 18, pp. 893–897, 2007.

ICTV, 2011. Virus Taxonomy: 2011. ICTV, Release.
<http://ictvonline.org/virusTaxonomy.asp?version=2011>.

IGNJATOVIC, J., MCWATERS, P.G. Monoclonal antibodies to three structural proteins of avian infectious bronchitis virus: characterization of epitopes and antigenic differentiation of Australian strains. **Journal of General Virology** v. 72, pp. 2915–2922, 1991.

IGNJATOVIC, J. & GALLI, L. Immune responses to structural proteins of avian infectious bronchitis virus. **Avian Pathology**, v. 24, pp. 313-332, 1995.

JACKWOOD M.W. et al. Molecular evolution and emergence of avian gammacoronaviruses. **Infection, Genetics and Evolution**, vol. 12, no. 6, pp. 1305–1311, 2012.

JIA, W., MONDAL, S.P., NAQI, S.A. Genetic and antigenic diversity in avian infectious bronchitis virus isolates of the 1940s. **Avian Diseases**, v. 46, pp. 437–441, 2002.

JOHNSON, M.A., et al. A recombinant fowl adenovirus expressing the S1 gene of infectious bronchitis virus protects against challenge with infectious bronchitis virus, **Vaccine**, v. 21, pp. 2730–2736, 2003.

JONES, R. C. Viral respiratory diseases (ILT, aMPV infections, IB): are they ever under control?. **British Poultry Science**, v. 51, n. 1, p. 1–11, 2010.

KEELER, C.; REED, K.; NIX, W.; GELB, J. Serotype identification of avian infectious bronchitis by RTPCR of the peplomer (S1) gene. **Avian Diseases**, v.42, p.275-284, 1998.

KILBOURNE, E. D. Host determination of viral evolution: a variable tautology. In: *The evolutionary biology of viruses*. S. S. Morse, ed. Raven Press Ltd., New York. pp. 253–271, 1994.

KIMURA, M. *The neutral theory of molecular evolution*. Cambridge: University Press, Cambridge, U.K. 1983. 367p.

KING, DJ.; C AVANAGH, D. Infectious Bronchitis. In: CALNEK, B.W.; BARNES, H.J.; BEARD, C.W.; REID, W.M.; YODER JUNIOR, H.W. (Eds.). **Diseases of poultry**. 9.ed. Ames: Iowa State University Press, 1991. p.471-484.

LEE, H. et al. Characterization of a novel live attenuated infectious bronchitis virus vaccine candidate derived from a Korean nephropathogenic strain. **Vaccine**, v. 28, pp. 2887–2894, 2010.

LEE, N. et al. A major outbreak of severe acute respiratory syndrome in Hong Kong. **New England Journal of Medicine**, v. 348 , pp. 1986-1994, 2003.

LIM, T.H. et al. Live attenuated nephropathogenic infectious bronchitis virus vaccine provides broad cross protection against new variant strains. **Poultry Science**, v. 91, pp. 89-94, 2012.

LIN, Y. et al. Neutralization Analysis of a Chicken Single-Chain Variable Fragment Derived from an Immune Antibody Library Against Infectious Bronchitis Virus. **Viral Immunology**, v. 28, pp. 397-404, 2015.

LUCIANO, R.L. **Técnicas para o diagnóstico da bronquite infecciosa das galinhas**. 2010. Disponível em: <http://www.infobibos.com/Artigos/2010_2/bronquite/index.htm>.

MACNAUGHTON, M.R., MADGE, M.H., DAVIES, H.A., DOURMASHKIN, R.R. Polypeptides of the surface projections and the ribonucleoprotein of avian infectious bronchitis virus. **Journal of Virology**, v. 24, pp. 821–825, 1977.

MCKINLEY, E.T. et al. Avian coronavirus infectious bronchitis attenuated live vaccines undergo selection of subpopulations and mutations following vaccination. **Vaccine**, v.26, pp.1274- 1284, 2008.

MCKINLEY, E.T et al. Attenuated live vaccine usage affects accurate measures of virus diversity and mutation rates in avian coronavirus infectious bronchitis vírus. **Virus Research**, v. 158, pp. 225-234, 2011.

MEIR R. Immune responses to mucosal vaccination by the recombinant S1 and N proteins of infectious bronchitis virus. **Viral Immunology**, v. 25, pp. 55–62, 2012.

MINSKAIA, E. Discovery of an RNA virus 3'->5' exonuclease that is critically involved in coronavirus RNA synthesis. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 103, pp. 5108–5113, 2006.

MONDAL, S.P.; NAQI, S.A. Maternal antibody to infectious bronchitis virus: its role in protection against infection and development of active immunity to vaccine. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 79, pp. 31–40, 2001.

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. 105p. Thesis (Doutorado em Microbiologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo.

MONTASSIER, H. J. Molecular epidemiology and evolution of avian infectious bronchitis virus. **Revista Brasileira de Ciencia Avicola**, v. 12, pp. 87–96, 2010.

MUNEER, M.; NEWMAN, J.; HALVORSON, D.; SIVANANDAN, V.; NAGARAJA, K.; COON, C. Efficacy of infectious bronchitis virus vaccines against heterologous challenge. **Research in Veterinary Science**, v.45, n.1, p.22-27, 1988.

NAQI, S.A., KARACA, K., BAUMAN, B. A monoclonal antibody-based antigen capture enzyme-linked immunosorbent assay for identification of infectious bronchitis virus serotypes. **Avian Pathology**, v. 22, pp. 555–564, 1993.

NDIFUNA, A., WATERS, A.K., ZHOU, M., COLLISSON, E.W. Recombinant nucleocapsid protein is potentially an inexpensive, effective serodiagnostic reagent for infectious bronchitis virus. **Journal of Virology Methods**, v. 70, pp. 37–44, 1998.

OIE - ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE ANIMAL. **Avian Infectious Bronchitis**. 2013. Available from: <<http://www.oie.int>>. Accessed: Sep. 10, 2015.

PENA L.J. et al. Bronquite infecciosa das galinhas. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.72, n.3, pp. 397-404, 2005.

PRADHAN, S.K. et al. ELISA; Recombinant nucleocapsid protein based single serum dilution ELISA for the detection of antibodies to infectious bronchitis virus in poultry. **Journal of virological methods**, v. 209, pp. 1-6, 2014.

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. Thesis - Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte. ICTV, 2015. Virus Taxonomy: 2011.

RUSSELL, W.C. Update on adenovirus and its vectors. **Journal of General Virology**, v. 81, pp. 2573–2604, 2000.

SASIPREEYAJAN, J. et al. Efficacy of different vaccination programs against thai QX-like infectious bronchitis virus. **Thai Journal of Veterinary Medicine**, v. 42, pp. 73–79, 2012.

SEO, S.H. et al. Adoptive transfer of infectious bronchitis virus primed $\alpha\beta$ T cells bearing CD8 antigen protects chicks from acute infection. **Virology**, v. 269, pp. 183–189, 2000.

SEO, S.H., COLLISSON, E.W. Specific cytotoxic T lymphocytes are involved in in vivo clearance of infectious bronchitis virus. **Journal of Virology**, v. 71, pp. 5173–7, 1997.

SEUBERLICH, T., TRATSCHIN, J.D., THUR, B., HOFMANN, M. A. Nucleocapsid protein-based enzyme-linked immunosorbent assay for detection and differentiation of antibodies against European and North American porcine reproductive and respiratory syndrome virus. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 9, pp. 1183–1191, 2002.

SNYDER, D.B. et al. Rapid serological profiling by enzyme – linked immunosorbent assay III. Simultaneous measurements of antibody titers to infectious bronchitis , infectious bursal disease, and Newcastle disease viruses in a single serum dilution. **Avian Diseases**, v. 25, p. 213-222, 1983.

SNEED, L.W., BUTCHER, G.D., PARR, R., WANG, L., COLLISSON, E.W. Comparisons of the structural proteins of avian infectious bronchitis virus as determined by western blot analysis. **Viral Immunology**, v. 2, pp. 221–227, 1989.

SOUZA, C.M., ROCHA, F.R.T., MARTINS, N.R.S., RESENDE, J.S., JORGE, M.A., RAMPINELLI, A.P. Production of monoclonal antibodies against conserved components of infectious bronchitis virus. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 53, pp. 523–530, 2001.

TORO, H. et al. Protective avian influenza in ovo vaccination with non-replicating human adenovirus vector. **Vaccine**, v. 25, pp. 2886–2891, 2007.

TORO, H. et al. Genetic diversity and selection regulates evolution of infectious bronchitis virus. **Avian Diseases**, v. 56, pp. 449–455, 2012.

TREVISOL, I.M. ; JAENISCH, F. R. F. . Estudos da Embrapa: Bronquite Infecciosa das Galinhas: Crise Atual. Avicultura Industrial (Porto Feliz. Impresso, São Paulo, p. 14 - 20, 2010.

TREVISOL, I.M. Bronquite Infecciosa. In: SIAV - Salão Internacional da Avicultura e 23º Congresso Brasileiro de Avicultura, 2013, São Paulo/ SP. Anais: SIAV - Salão Internacional da Avicultura e 23º Congresso Brasileiro de Avicultura. São Paulo/SP. p. 1-5.

VILLARREAL, LYB. et al. Molecular Orchitis in Roosters with Reduced Fertility Associated with Avian Infectious Bronchitis Virus and Avian Metapneumovirus Infections. **Avian Diseases**, v. 51, pp. 900–904, 2007.

WANG, C. H. An ELISA for antibodies against infectious bronchitis virus using an S1 spike polypeptide. **Veterinary Microbiology**, v.85, p.333-342, 2002.

WANG, L. et al. Evolutionary implications of genetic variations in the S1 gene of infectious bronchitis virus. **Virus Research**, v. 34, pp. 327–338, 1994.

WICKRAMASINGHE, A.I.N., et al. The avian coronavirus spike protein. **Virus Research**, v. 194, pp. 37–48, 2014.

WILLIAMS, A.K., LI, W., SNEED, L.W., COLLISSON, E.W., 1992. Comparative analyses of the nucleocapsid genes of several strains of infectious bronchitis virus and other coronaviruses. **Virus Research**, v. 25, pp. 213–222, 1992.

WIT, J.J. DE. Detection of infectious bronchitis virus. **Avian Pathology**, v. 9457, pp. 71–93, 2000.

WITTE, S.B., CHARD-BERGSTROM, C., LOUGHIN, T.A., KAPIL, S. Development of a recombinant nucleoprotein-based enzyme-linked immunosorbent assay for quantification of antibodies against porcine reproductive and respiratory syndrome virus. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 7, pp. 700–702, 2000.


WU, Z.Q., YANG, Q.W., FU, C., ZHAO, X.Y., IGNJATOVIC, J. Antigenic and immunogenic characterization of infectious bronchitis virus strains isolated in China between 1986 and 1995. **Avian Pathology**, v. 27, pp. 578–585, 1998.

YI, L.; CHENG, S. Preparation and Identification of a Single-chain Variable Fragment Antibody Against Canine Distemper Virus. **Monoclonal Antibodies in Immunodiagnosis and Immunotherapy**, v. 34, pp. 228-232, 2015.

ZHANG, J., et al. A Simple and Rapid Strip Test for Detection of Antibodies to Avian Infectious Bronchitis Virus . **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 72, pp. 883–886, 2010.

ZOU, N., WANG, F., DUAN, Z., XIA, J., WEN, X., YAN, Q., LIU, P., CAO, S., HUANG, Y. Development and characterization of neutralizing monoclonal antibodies against the S1 subunit protein of QX-like avian infectious bronchitis virus strain Sczy3. **Monoclonal Antibodies in Immunodiagnosis and Immunotherapy**, v. 34, pp. 17–24, 2015.

Anexos

 SuínoseAves	Certificado de Conduta Etica	ETICA 1/1
---	------------------------------	---------------------

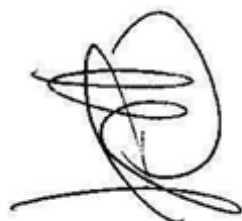
Certificado

Certificamos que o Protocolo nº 010/10, sob título "DESENVOLVIMENTO DE IMUNOBIOLOGICOS VISANDO A IMUNIZAÇÃO E DETECÇÃO DO VÍRUS DA BRONquite INFECCIOSA AVIÁRIA (IBV)" sob a responsabilidade de Paulo Augusto Esteves está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal, adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), TENDO SIDO APROVADO PELO Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/CNPSA) em reunião realizada em 31/08/2009.

Certificate

We certify that the Protocol nº 010/10, with the title of "DESENVOLVIMENTO DE IMUNOBIOLOGICOS VISANDO A IMUNIZAÇÃO E DETECÇÃO DO VÍRUS DA BRONquite INFECCIOSA AVIÁRIA (IBV)" is in agreement with the Ethical Principles in Animal Research adopted by Brazilian College of Animal Experimentation (COBEA) and was approved by the Embrapa Swines and Poultry Ethical Committee for Animals utilization in experimentation (CEUA/CNPSA) in 08/31/2009.

Concórdia, 22/12/2010



Paulo Augusto Esteves
Presidente CEUA/CNPSA