RUY DIEGO CHACÓN VILLANUEVA

Desenvolvimento de reações de semi-*nested* PCR para o diagnóstico do vírus da Bronquite Infecciosa das Aves e sequenciamento de amostras brasileiras

São Paulo

2018

RUY DIEGO CHACÓN VILLANUEVA

Desenvolvimento de reações de semi-*nested* PCR para o diagnóstico do vírus da Bronquite Infecciosa das Aves e sequenciamento de amostras brasileiras

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental e Comparada da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Ciências

Departamento:

Patologia

Área de concentração:

Patologia Experimental e Comparada

Orientador:

Prof. Dr. Antonio José Piantino Ferreira

São Paulo

2018

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T. 3605
FMVZ

Chacón Villanueva, Ruy Diego

Desenvolvimento de reações de semi-nested PCR para o diagnóstico do vírus da Bronquite Infecciosa das Aves e sequenciamento de amostras brasileiras / Ruy Diego Chacón Villanueva. – 2018.

90 f. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Patologia, São Paulo, 2018.

Programa de Pós-Graduação: Patologia Experimental e Comparada.

Área de concentração: Patologia Experimental e Comparada.

Orientador: Prof. Dr. Antonio José Piantino Ferreira.

1. Bronquite Infecciosa das Aves. 2. BR-I. 3. Massachusetts. 4. Proteína da espícula. 5. Semi-Nested PCR. I. Título.

RESUMO

CHACÓN VILLANUEVA, R. D. **Desenvolvimento de reações de semi-nested PCR para o diagnóstico do vírus da Bronquite Infecciosa das Aves e sequenciamento de amostras brasileiras.** [Development of hemi-nested PCR reactions for the diagnosis of Avian Infectious Bronchitis virus and brazilian samples sequencing]. 2018. 90 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.

A Bronquite Infecciosa das Aves (BIG) é uma das doenças respiratórias aviárias de maior impacto na avicultura mundial. No Brasil, as estirpes BR-I (GI-11) e Massachusetts (GI-1) são as mais prevalentes nos planteis avícolas. O presente estudo teve como objetivos desenvolver reações de semi-nested PCR para o diagnóstico das estirpes BR-I e Mass, em amostras brasileiras obtidas durante o período de 2016 e 2017. Foram desenvolvidas duas reações de semi-nested PCR tendo como alvo a subunidade 1 do gene S, específicas para as estirpes BR-I e Mass. O limiar de detecção foi de 10^4 cópias de DNA/ μ L nas duas reações (3,76fg/ μ L na reação exclusiva de BR-I; e 5,58fg/ μ L e 5,57fg/ μ L na reação duplex de BR-I e Mass, respectivamente). Posteriormente, foram avaliados 572 *pools* de órgãos procedentes das 5 regiões do Brasil. Dentre estas amostras, 62,24% foram positivas para Coronavírus, sendo o alvo desta reação a região 3'UTR. A reação de semi-nested PCR específica detectou a estirpe BR-I em 84,83% das amostras positivas para Coronavírus. A reação de semi-nested PCR duplex detectou 65,44% das amostras positivas para a estirpe BR-I; 7,35% positivas para a estirpe Mass e co-infecção da estirpe BR-I com Mass em 17,65% das amostras. Após a análise dos controles positivos (vacinas Mass e BR-I) no BLASTn, do resultado do sequenciamento dos produtos de PCR, da análise filogenética, da similaridade de nucleotídeos e a dedução em aminoácidos, foi confirmado o agrupamento esperado das sequências detectadas pelas reações PCR dirigidas para a estirpe BR-I ou Mass. Estes resultados confirmaram a presença predominante da estirpe BR-I, e em menor número, da estirpe Mass nos planteis avícolas do Brasil. As reações desenvolvidas no presente estudo serão valiosas no diagnóstico e na monitoria da doença.

Palavras-chave: Bronquite Infecciosa das Aves. BR-I. Massachusetts. Proteína da espícula. Semi-Nested PCR.

ABSTRACT

CHACÓN VILLANUEVA, R. D. **Development of hemi-nested PCR reactions for the diagnosis of Avian Infectious Bronchitis virus and brazilian samples sequencing.** [Desenvolvimento de reações de semi-*nested* PCR para o diagnóstico do vírus da Bronquite Infecciosa das Aves e sequenciamento de amostras brasileiras]. 2018. 90 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.

Avian Infectious Bronchitis (IB) is one of the avian respiratory diseases with the greatest impact on poultry farming worldwide. In Brazil, strains BR-I (GI-11) and Massachusetts (GI-1) are the most prevalent in poultry flocks. The present study aimed to develop semi-nested PCR reactions for the diagnosis of IBV BR-I and Mass strains, in Brazilian samples obtained during the period of 2016 and 2017. Two semi-nested PCR reactions targeting the 1 subunit of the S gene were developed, specific for BR-I and Mass strains. The detection threshold was 10^4 copies of DNA/ μ L in both reactions (3,76fg/ μ L in the exclusive BR-I reaction; and 5,58fg/ μ L and 5,57fg/ μ L in the duplex reaction of BR-I and Mass, respectively). Subsequently, 572 organ pools from the 5 regions of Brazil were evaluated. Among these samples, 62,24% were positive for Coronavirus, being the target of this reaction the 3'UTR region. The specific semi-nested PCR reaction detected the BR-I strain in 84,83% of the Coronavirus positive samples. The duplex semi-nested PCR reaction detected 65,44% of the samples positive for the BR-I strain, 7,35% positive for Mass strain, and co-infection of the BR-I and Mass strain in 17,65% of the samples. After the analysis of the positive controls (Mass and BR-I vaccines) in BLASTn, the result of the sequencing of the PCR products, phylogenetic analysis, nucleotide similarity and amino acid deduction, was confirmed the expected clustering of the sequences detected by the PCR reactions directed to BR-I and Mass strains. These results confirm the predominant presence of the BR-I strain, and to a lesser extent, the Mass strain in Brazilian poultry flocks. The reactions developed in the present study will be valuable in the diagnosis and monitoring of the disease.

Keywords: Avian Infectious Bronchitis. BR-I. Massachusetts. Spike protein. Hemi-Nested PCR.

1 INTRODUÇÃO

A indústria avícola representa um dos pilares da economia brasileira devido à grande e cada vez mais precoce produção de carne, ovos e derivados. O Brasil ocupa a segunda posição em produção e a primeira em exportação de carne de frango ao nível mundial (ABPA, 2017). Os sistemas de criação com altas densidades populacionais influenciam no aparecimento de surtos de doenças no plantel avícola que acarretam perdas econômicas muito significativas. As doenças mais frequentemente presentes são aquelas que se manifestam com sinais respiratórios, entre as quais a Bronquite Infecciosa das Aves, também chamada de Bronquite Infecciosa das Galinhas (BIG), é uma das que causam maior impacto (IGNJATOVIĆ; SAPATS, 2000). Além disso, é comum se encontrar quadros respiratórios de etiologia complexa, com a participação concomitante de mais de um agente infeccioso, levando a um agravamento do quadro e complexidade na diferenciação dos agentes causadores (ROUSSAN; HADDAD; KHAWALDEH, 2008; HUTTON et al., 2017).

O agente etiológico da BIG provoca alterações patológicas no trato respiratório superior, e foi associado a outros sinais clínicos, por apresentar tropismo e replicação viral em diferentes tipos celulares (FAN et al., 2012). Desde a primeira descrição do quadro clínico nos Estados Unidos (SCHALK; HAWN, 1931) e a primeira descrição etiológica cinco anos depois (BEACH; SCHALM, 1936), inúmeros casos clínicos e de surtos da doença foram publicadas a cada ano, em todo o mundo, influenciado enormemente pelas características do genoma deste vírus RNA, de fita simples, que apresenta altas taxas de mutação e recombinação entre estirpes, levando à evolução e geração constante de novos genótipos e sorotipos (JACKWOOD; YOUSEF; HILT, 1997; DE WIT; COOK; VAN DER HEIJDEN, 2011). No Brasil, o vírus da bronquite infecciosa (IBV) foi isolado pela primeira vez em 1957 (HIPOLITO, 1957), em Belo Horizonte, Minas Gerais. No entanto, apenas em 1975 o aparecimento da doença, com o quadro clínico correspondente à BIG foi observado. E, em consequência, esta doença foi descrita em todos os Estados e regiões de produção avícola do Brasil (SILVA, 2010). Em 1979 foi licenciada a importação e a fabricação de vacinas contra o IBV da estirpe Massachusetts (Mass). Esta vacina foi eficaz durante alguns anos, mas por reação de soroneutralização se observou o aparecimento de estirpes variantes (DI FABIO et al., 2000). Em 2011, com o

sequenciamento de nucleotídeos das regiões hipervariáveis 1 e 2 do gene S1, foi descrito o predomínio da estirpe BR-I no plantel avícola brasileiro (CHACÓN et al., 2011). A partir de 2016 foi autorizada a fabricação e a distribuição da primeira vacina contra o IBV da estirpe BR-I, classificada como pertencente ao grupo I- 11 (GI-11), segundo a classificação feita por Valastro et al. (2016).

Levando em consideração a complexidade e impacto deste agente, é fundamental um monitoramento epidemiológico constante, assim como, os mais precisos, rápidos e eficazes métodos para a detecção e tipificação do IBV, para que as medidas mais apropriadas de prevenção e controle da doença sejam aplicadas. A genotipagem baseada nas técnicas de biologia molecular mediante a reação em cadeia pela polimerase (PCR) representa uma das ferramentas mais amplamente utilizadas para a detecção e identificação da estirpe do vírus pela sua rapidez e sensibilidade.

7. CONCLUSÕES

Baseado nos resultados e discussões, podemos concluir o seguinte:

- A reação de semi-*nested* PCR para a detecção da estirpe brasileira do IBV (BR-I) foi validada e mostrou alto desempenho, comprovado pelas análises de sensibilidade, especificidade, filogenética e de similaridade de sequências de nucleotídeos.
- A reação de *duplex* semi-*nested* PCR para a detecção simultânea das estirpes brasileira (BR-I) e Massachusetts (Mass) do IBV demonstrou a sua validade e alto desempenho, comprovado pelas análises de sensibilidade, especificidade, filogenética e de similaridade de sequências de nucleotídeos.
- O método de diagnóstico da região 3'UTR para a detecção de Coronavírus mostrou a sua utilidade nos estudos de triagem do IBV.
- O IBV é altamente prevalente, persistente, e disperso em todas as regiões e sistemas de criação no Brasil.
- No Brasil, existe um predomínio da estirpe BR-I do IBV em comparação a estirpe Massachusetts.
- A implementação de análises filogenéticas incluindo apropriadamente todas as estirpes representativas do IBV no mundo, demonstrou um agrupamento muito prático e efetivo para o desenho de *primers* para diagnóstico.
- A análise das sequências de nucleotídeos, dos produtos amplificados das reações de semi-*nested* PCR de amostras do Brasil, mostraram 3 subgrupos com associação geográfica.
- A maior similaridade da vacina da estirpe BR-I em comparação a outras estirpes e vacinas comerciais sugere uma maior probabilidade de sucesso na proteção na avicultura brasileira.

REFERÊNCIAS

- ABPA. Relatório Anual da ABPA 2017. **Associação Brasileira de Proteína Animal**, p. 68, 2017.
- ALEXANDER, D. J.; GOUGH, R. E. Isolation of avian infectious bronchitis virus from experimentally infected chickens. **Research in Veterinary Science**, v. 23, n. 3, p. 344–347, 1977.
- ALMEIDA, D. O. et al. Avian infectious bronchitis and deep pectoral myopathy-A case control study. **Poultry Science**, v. 91, n. 12, p. 3052–3056, 2012.
- AMBALI, A. G.; JONES, R. C. Early pathogenesis in chicks of infection with an enterotropic strain of infectious bronchitis virus. **Avian Diseases**, v. 34, n. 4, p. 809–817, 1990.
- BALESTRIN, E. et al. Infectious bronchitis virus in different avian physiological systems - A field study in Brazilian poultry flocks. **Poultry Science**, v. 93, n. 8, p. 1922–1929, 2014.
- BEACH, J. R.; SCHALM, O. W. A Filterable Virus, Distinct from that of Laryngotracheitis, the Cause of a Respiratory Disease of Chicks. **Poultry Science**, v. 15, n. 3, p. 199–206, 1936.
- BERRY, D. M. et al. The structure of infectious bronchitis virus. **Virology**, v. 23, p. 403–407, 1964.
- BIJLENGA, G. et al. Development and use of the H strain of avian infectious bronchitis virus from the Netherlands as a vaccine: A review. **Avian Pathology**, v. 33, n. 6, p. 550–557, 2004.
- BOS, E. C. W. et al. Mutational analysis of the murine coronavirus spike protein: Effect on cell-to-cell fusion. **Virology**, v. 214, n. 2, p. 453–463, 1995.
- CAPUA, I. et al. Co-circulation of four types of infectious bronchitis virus (793/B, 624/I, B1648 and Massachusetts). **Avian Pathology**, v. 28, n. 6, p. 587–592, 1999.
- CARRANZA, C. et al. Genetic characterisation and analysis of infectious bronchitis virus isolated from Brazilian flocks between 2010 and 2015. **British Poultry Science**, v. 58, n. 6, p. 610–623, 2017.
- CAVANAGH, D. et al. Location of the amino acid differences in the SI spike glycoprotein subunit of closely related serotypes of infectious bronchitis virus. **Avian Pathology**, v. 21, n. 1, p. 33–43, 1992.
- CAVANAGH, D. et al. Longitudinal field studies of infectious bronchitis virus and avian pneumovirus in broilers using type-specific polymerase chain reactions. **Avian Pathology**, v. 28, n. 6, p. 593–605, 1999.

CAVANAGH, D. et al. Coronaviruses from pheasants (*Phasianus colchicus*) are genetically closely related to coronaviruses of domestic fowl (infectious bronchitis virus) and turkeys. **Avian Pathology**, v. 31, n. 1, p. 81–93, 2002.

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

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

CAVANAGH, D.; DAVIS, P. J.; MOCKETT, A. P. A. Amino acids within hypervariable region 1 of avian coronavirus IBV (Massachusetts serotype) spike glycoprotein are associated with neutralization epitopes. **Virus Research**, v. 11, n. 2, p. 141–150, 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, n. 1, p. 63–74, 1997.

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, n. 2, p. 153–162, 2011.

CHOMCZYNSKI, P. Single-Step Method of RNA Isolation by Acid Guanidinium Extraction. **Analytical Biochemistry**, v. 162, n. 1, p. 156–159, 1987.

CHOMCZYNSKI, P. A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cell and tissue samples. **BioTechniques**, v. 15, n. 3, p. 532–534, 536–537, 1993.

CONG, Y.; VERLHAC, P.; REGGIORI, F. The interaction between nidovirales and autophagy components. **Viruses**, v. 9, n. 7, p. 14, 2017.

COOK, J. K. Recovery of infectious bronchitis virus from eggs and chicks produced by experimentally inoculated hens. **Journal of Comparative Pathology**, v. 81, n. 2, p. 203–211, 1971.

CUBILLOS, A. et al. Characterisation of strains of infectious bronchitis virus isolated in Chile. **Avian Pathology**, v. 20, n. 1, p. 85–99, 1991.

DE WIT, J. J. Detection of infectious bronchitis virus. **Avian Pathology**, v. 29, n. 2, p. 71–93, 2000.

DE WIT, J. J.; COOK, J. K. A.; VAN DER HEIJDEN, H. M. J. F. Infectious bronchitis virus variants: a review of the history, current situation and control measures. **Avian Pathology**, v. 40, n. 3, p. 223–235, 2011.

DI FABIO, J. et al. Characterization of infectious bronchitis viruses isolated from outbreaks of disease in commercial flocks in Brazil. **Avian Diseases**, v. 44, n. 3, p. 582–589, 2000.

DI FABIO, J.; VILLAREAL, L. Bronquite infecciosa das galinhas. In: BERCHIERI, A. et al. (Eds.). . **Doenças das Aves**. 2ª Edição ed. São Paulo: Fundação APINCO de Ciência e Tecnologia, 2009. p. 631–650.

ECKERLE, L. D. et al. High fidelity of murine hepatitis virus replication is decreased in nsp14 exoribonuclease mutants. **Journal of Virology**, v. 81, n. 22, p. 12135–12144, 2007.

FABRICANT, J. The early history of infectious bronchitis. **Avian Diseases**, v. 42, n. 4, p. 648–650, 1998.

FAN, W. et al. Comparative dynamic distribution of avian infectious bronchitis virus M41, H120, and SAIBK strains by quantitative real-time RT-PCR in SPF chickens. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 76, n. 12, p. 2255–2260, 2012.

FELIPPE, P. A N. et al. Genetic diversity of avian infectious bronchitis virus isolated from domestic chicken flocks and coronaviruses from feral pigeons in Brazil between 2003 and 2009. **Avian Diseases Digest**, v. 5, n. 4, p. e11–e12, 2010.

GUINDON, S. et al. New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: Assessing the performance of PhyML 3.0. **Systematic Biology**, v. 59, n. 3, p. 307–321, 2010.

GUO, Y. et al. Identification of a new region of SARS-CoV S protein critical for viral entry. **Journal of Molecular Biology**, v. 394, n. 4, p. 600–605, 2010.

HALL, T. A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium Series**, v. 41, p. 95–98, 1999.

HANDBERG, K. et al. Detection and strain differentiation of infectious bronchitis virus in tracheal tissues from experimentally infected chickens by reverse transcription-polymerase chain reaction. Comparison with an immunohistochemical technique. **Avian Pathology**, v. 28, n. 4, p. 327–335, 1999.

HASSAN, K. E. et al. Prevalence of avian respiratory viruses in broiler flocks in Egypt. **Poultry Science**, v. 95, n. 6, p. 1271–1280, 2016.

HIDALGO, H.; GALLARDO, R.; ROSENDE, S. Isolation of infectious bronchitis virus from broiler chickens in Chile. **Avian Diseases**, v. 20, n. 3, p. 601–603, 1976.

HIDALGO, H.; GALLARDO, R.; TORO, H. Antigenic and pathogenic properties of 3 isolates of infectious bronchitis virus recovered from inoculated birds. **Zentralblatt für Veterinärmedizin. Reihe B. Journal of Veterinary Medicine. Series B**, v. 33, n. 1, p. 26–35, 1986.

HIPOLITO, O. Isolamento e identificação do vírus da bronquite infecciosa das galinhas no Brasil. **Arquivo Escola Veterinária Universidade de Minas Gerais**, v. 10, p. 131–151, 1957.

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

HUTTON, S. et al. Detection of infectious bronchitis virus 793B, avian metapneumovirus, *Mycoplasma gallisepticum* and *Mycoplasma synoviae* in poultry in Ethiopia. **Tropical Animal Health and Production**, v. 49, n. 2, p. 317–322, 2017.

IGNJATOVIC, J. et al. Pathogenicity of Australian strains of avian infectious bronchitis virus. **Journal of Comparative Pathology**, v. 126, n. 2–3, p. 115–123, 2002.

IGNJATOVIC, J.; GALLI, L. The S1 glycoprotein but not the N or M proteins of avian infectious bronchitis virus induces protection in vaccinated chickens. **Archives of Virology**, v. 138, n. 1–2, p. 117–134, 1994.

IGNJATOVIĆ, J.; SAPATS, S. Avian infectious bronchitis virus. **Revue Scientifique et Technique (International Office of Epizootics)**, v. 19, n. 2, p. 493–508, 2000.

IMBERT, I. et al. The SARS-Coronavirus PLnc domain of nsp3 as a replication/transcription scaffolding protein. **Virus Research**, v. 133, n. 2, p. 136–148, 2008.

JACKWOOD, M. W.; DE WIT, S. J. Infectious bronchitis. In: SWAYNE, DE; GLISSON, JR; MCDOUGALD, LR; NOLAN, LK; SUAREZ, DL; NAIR, V. (Ed.). **Diseases of Poultry**. 13 ed. ed. Iowa: John Wiley & Sons, Inc., 2013. p. 139–159.

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

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, n. 21–22, p. 2730–2736, 2003.

JONES, R. M. et al. Development and validation of RT-PCR tests for the detection and S1 genotyping of infectious bronchitis virus and other closely related Gammacoronaviruses within clinical samples. **Transboundary and Emerging Diseases**, v. 58, n. 5, p. 411–420, 2011.

KATOH, K.; STANDLEY, D. M. MAFFT multiple sequence alignment software version 7: Improvements in performance and usability. **Molecular Biology and Evolution**, v. 30, n. 4, p. 772–780, 2013.

KOCH, G. et al. Antigenic domains on the peplomer protein of avian infectious bronchitis virus: Correlation with biological functions. **Journal of General Virology**, v. 71, n. 9, p. 1929–1935, 1990.

KUMAR, S.; STECHER, G.; TAMURA, K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. **Molecular Biology and Evolution**, v. 33, n. 7, p. 1870–1874, 2016.

LI, K. et al. Isolation of lactate dehydrogenase-elevating viruses from wild house mice and their biological and molecular characterization. **Virus Research**, v. 67, n. 2, p. 153–162, 2000.

LI, L. et al. Structural lability in stem-loop 1 drives a 5' UTR-3' UTR interaction in coronavirus replication. **Journal of Molecular Biology**, v. 377, n. 3, p. 790–803, 2008.

MAEDA, J.; MAEDA, A.; MAKINO, S. Release of coronavirus E protein in membrane vesicles from virus- infected cells and E protein-expressing cells. **Virology**, v. 263, n. 2, p. 265–272, 1999.

MARANDINO, A. et al. Phylodynamic analysis of avian infectious bronchitis virus in South America. **Journal of General Virology**, v. 96, n. 2015, p. 1340–1346, 2015.

MATTHIJS, M. G. R. et al. Ability of Massachusetts-type infectious bronchitis virus to increase colibacillosis susceptibility in commercial broilers: a comparison between vaccine and virulent field virus. **Avian Pathology**, v. 32, n. 5, p. 473–481, 2003.

MEIR, R. et al. Identification of a novel nephropathogenic infectious bronchitis virus in Israel. **Avian Diseases**, v. 48, n. 3, p. 635–641, 2004.

MEULEMANS, G. et al. Epidemiology of infectious bronchitis virus in Belgian broilers: A retrospective study, 1986 to 1995. **Avian Pathology**, v. 30, n. 4, p. 411–421, 2001.

MEUNIER, J. C. et al. Analysis of the glycosylation sites of hepatitis C virus (HCV) glycoprotein E1 and the influence of E1 glycans on the formation of the HCV glycoprotein complex. **Journal of General Virology**, v. 80, n. 4, p. 887–896, 1999.

Minitab 17 Statistical Software. State College, PA: Minitab, Inc., , 2010. Disponível em: <www.minitab.com>

MOORE, K. M.; JACKWOOD, M. W.; HILT, D. A. Identification of amino acids involved in a serotype and neutralization specific epitope within the s1 subunit of avian infectious bronchitis virus. **Archives of Virology**, v. 142, n. 11, p. 2249–2256, 1997.

MORK, A. K. et al. Differences in the tissue tropism to chicken oviduct epithelial cells between avian coronavirus IBV strains QX and B1648 are not related to the sialic acid binding properties of their spike proteins. **Veterinary Research**, v. 45, n. 1, p. 1–10, 2014.

OKINO, C. H. et al. Infectious Bronchitis Virus: Detection and Vaccine Strain Differentiation by Semi-nested. **Brazilian Journal of Poultry Science**, v. 7, n. 1, p. 59–66, 2005.

OWEN, R. L. et al. Detection of viral antigen following exposure of one-day-old chickens to the Holland 52 strain of infectious bronchitis virus. **Avian Pathology**, v. 20, n. 4, p. 663–673, 1991.

PADILHA DE FRAGA, A. et al. A real-time reverse-transcription polymerase chain reaction for differentiation of Massachusetts vaccine and brazilian field genotypes of

avian infectious bronchitis virus. **Avian Diseases**, v. 60, n. 1, p. 16–21, 2016.

PADILHA FRAGA, A. et al. Emergence of a New Genotype of Avian Infectious Bronchitis Virus in Brazil. **Avian Diseases**, v. 57, n. 2, p. 225–232, 2013.

PEREIRA, C. G. et al. Distribution of infectious bronchitis virus strains in different organs and evidence of vertical transmission in natural infection. **Archives of Virology**, v. 161, n. 12, p. 3355–3363, 2016.

PETIT, C. M. et al. Palmitoylation of the cysteine-rich endodomain of the SARS-coronavirus spike glycoprotein is important for spike-mediated cell fusion. **Virology**, v. 360, n. 2, p. 264–274, 2007.

RAJ, G. D.; JONES, R. C. Infectious bronchitis virus: Immunopathogenesis of infection in the chicken. **Avian Pathology**, v. 26, n. 4, p. 677–706, 1997.

ROUSSAN, D. A.; HADDAD, R.; KHAWALDEH, G. Molecular survey of avian respiratory pathogens in commercial broiler chicken flocks with respiratory diseases in Jordan. **Poultry Science**, v. 87, n. 3, p. 444–448, 2008.

SAIF, L. J. Coronavirus immunogens. **Veterinary Microbiology**, v. 37, n. 3–4, p. 285–297, 1993.

SCHALK, A. F.; HAWN, M. C. An Apparently New Respiratory Disease of Baby Chicks. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 78, p. 413–423, 1931.

SCHULTZE, B.; CAVANAGH, D.; HERRLER, G. Neuraminidase treatment of avian infectious bronchitis coronavirus reveals a hemagglutinating activity that is dependent on sialic acid-containing receptors on erythrocytes. **Virology**, v. 189, n. 2, p. 792–794, 1992.

SHULLA, A.; GALLAGHER, T. Role of spike protein endodomains in regulating coronavirus entry. **Journal of Biological Chemistry**, v. 284, n. 47, p. 32725–32734, 2009.

SID, H.; BENACHOUR, K.; RAUTENSCHLEIN, S. Co-infection with multiple respiratory pathogens contributes to increased mortality rates in algerian poultry flocks. **Avian Diseases**, v. 59, n. 3, p. 440–446, 2015.

SILVA, E. Infectious bronchitis in Brazilian chickens: current data and observations of field service personnel. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, v. 12, n. 3, p. 197–203, 2010.

SIMON-LORIERE, E.; HOLMES, E. C. Why do RNA viruses recombine? **Nature Reviews Microbiology**, v. 9, n. 8, p. 617–626, 2011.

SLATER-HANDSHY, T. et al. HCV E2 glycoprotein: Mutagenesis of N-linked glycosylation sites and its effects on E2 expression and processing. **Virology**, v. 319, n. 1, p. 36–48, 2004.

SPENCER, K. A. et al. Role of phosphorylation clusters in the biology of the coronavirus infectious bronchitis virus nucleocapsid protein. **Virology**, v. 370, n. 2, p. 373–381, 2008.

TARNAGDA, Z. et al. Prevalence of infectious bronchitis and newcastle disease virus among domestic and wild birds in H5N1 outbreaks areas. **Journal of Infection in Developing Countries**, v. 5, n. 8, p. 565–570, 2011.

TORO, H.; VAN SANTEN, V. L.; JACKWOOD, M. W. Invited Review: Genetic Diversity and Selection Regulates Evolution of Infectious Bronchitis Virus. **Avian Diseases Digest**, v. 7, n. 3, p. e1–e2, 2012.

TRIPET, B. et al. Structural characterization of the SARS-coronavirus spike S fusion protein core. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 20, p. 20836–20849, 2004.

VALASTRO, V. et al. S1 gene-based phylogeny of infectious bronchitis virus: An attempt to harmonize virus classification. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 39, p. 349–364, 2016.

VENNEMA, H. et al. Nucleocapsid-independent assembly of coronavirus-like particles by co-expression of viral envelope protein genes. **The EMBO Journal**, v. 15, n. 8, p. 2020–2028, 1996.

VILLARREAL, L. Y. B. et al. Molecular characterization of infectious bronchitis virus strains isolated from the enteric contents of brazilian laying hens and broilers. **Avian Diseases**, v. 51, n. 4, p. 974–978, 2007.

VILLARREAL, L. Y. B. et al. Molecular Epidemiology of Avian Infectious Bronchitis in Brazil from 2007 to 2008 in Breeders, Broilers, and Layers. **Avian Diseases**, v. 54, n. 2, p. 894–898, 2010.

WANG, A. C. et al. Isolation, pathogenicity, and H120 protection efficacy of infectious bronchitis viruses isolated in Taiwan. **Avian Diseases**, v. 40, n. 3, p. 620–625, 1996.

WANG, C. H.; HUANG, Y. C. Relationship between serotypes and genotypes based on the hypervariable region of the S1 gene of infectious bronchitis virus. **Archives of Virology**, v. 145, n. 2, p. 291–300, 2000.

WEISS, S. R.; NAVAS-MARTIN, S. Coronavirus pathogenesis and the emerging pathogen severe acute respiratory syndrome. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 69, n. 4, p. 635–664, 2005.

WISSINK, E. H. J. et al. Significance of the oligosaccharides of the porcine reproductive and respiratory syndrome virus glycoproteins GP2a and GP5 for infectious virus production. **Journal of General Virology**, v. 85, n. 12, p. 3715–3723, 2004.

ZANELLA, A. et al. Avian infectious bronchitis: Characterization of new isolates from Italy. **Avian Diseases**, v. 47, n. 1, p. 180–185, 2003.