RAPHAEL MAUSBACH SIMÃO

**DETECÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE CORONAVIRUS AVIÁRIO EM AVES
SILVESTRES DE CATIVEIRO**

São Paulo

2017

RAPHAEL MAUSBACH SIMÃO

**DETECÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE CORONAVIRUS AVIÁRIO EM AVES
SILVESTRES DE CATIVEIRO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Departamento:

Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal

Área de concentração:

Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses

Orientador (a): Profa. Dra. Helena Lage Ferreira

São Paulo
2017

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. 3466
FMVZ

Simão, Raphael Mausbach
Detecção e caracterização de coronavírus aviário em aves silvestres de cativeiro /
Raphael Mausbach Simão. -- 2017.
58 f. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, São Paulo, 2017.

Programa de Pós-Graduação: Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses.

Área de concentração: Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses.

Orientador: Profa. Dra. Helena Lage Ferreira.

1. Coronavírus. 2. Aves silvestres. 3. Vigilância. I. Título.

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Detecção e caracterização de coronavírus aviário em aves silvestres de cativeiro.", protocolada sob o CEUA nº 2309251114, sob a responsabilidade de **Helena Lage Ferreira e equipe; Raphael Mausbach Simão** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (CEUA/FMVZ) na reunião de 23/03/2016.

We certify that the proposal "Molecular detection and characterization of avian coronavirus in wild captive birds.", utilizing 150 Birds (150 males), protocol number CEUA 2309251114, under the responsibility of **Helena Lage Ferreira and team; Raphael Mausbach Simão** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the School of Veterinary Medicine and Animal Science (University of São Paulo) (CEUA/FMVZ) in the meeting of 03/23/2016.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa**

Vigência da Proposta: de **02/2015** a **12/2016**

Área: **Medicina Veterinária Preventiva E Saúde Animal**

Origem: **Amostras biológicas estocadas**

Espécie: **Aves**

sexo: **Machos**

idade: **a**

N: **150**

Linhagem: **N/A**

Peso: **a**

Resumo: As aves silvestres são consideradas importantes reservatórios de diferentes vírus aviários que podem afetar as aves comerciais. Dessa forma, o monitoramento das aves silvestres é fundamental para garantir a sanidade dos plantéis avícolas Brasileiros e Argentinos. Nos últimos anos, o número de espécies de aves nas quais os coronavírus aviários foram encontrados dobrou. Contudo, poucos estudos envolvendo a detecção de coronavírus aviários em aves de cativeiro e aves silvestres ou sinantrópicas foram realizados no Brasil. Assim, o presente estudo tem como principal objetivo identificar a presença dos coronavírus aviários em aves silvestres no Brasil e caracterizá-los molecularmente através do sequenciamento gênico dos genes S1 e RdRp. Para tanto, serão coletadas amostras de 150 aves sinantrópicas, totalizando 300 amostras (150 suabes orofaríngeas e 150 suabes cloacais). As amostras serão testadas através do teste de RRT-PCR para a detecção do gene URT do IBV bem como uma RT- nested PCR para a detecção do gene RdRp para a detecção dos coronavírus aviários. As amostras positivas serão submetidas ao sequenciamento gênico dos genes S1 e RdRp e a análise filogenética será realizada comparando as sequências obtidas pelos dois países com as sequências disponíveis nos bancos de dados mundiais. Portanto, o presente estudo será de grande importância para a compreensão dos coronavírus circulantes em aves silvestres no Brasil.

Local do experimento:

São Paulo, 24 de janeiro de 2017

Profa. Dra. Denise Tabacchi Fantoni
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

Roseli da Costa Gomes
Secretaria Executiva da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: Simão, Raphael Mausbach

Título: Detecção e caracterização de coronavírus aviário em aves silvestres de cativeiro.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Data: ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

AGRADECIMENTOS

Aos meus amados pais José Roberto e Silvia Helena por todo apoio e constante estímulo, sem eles, permito-me acreditar que nada disso teria sido possível.

Ao meu irmão Matheus, com toda certeza o melhor irmão que alguém poderia ter.

À minha querida orientadora Dra. Helena Lage Ferreira, que não poupou esforços e se mostrou sempre interessada no meu desenvolvimento científico e pessoal, obrigado pela confiança.

À minha avó Mary e minhas tias Rose e Raquel.

Ao Dr. Paulo Anselmo Nunes Felipe, professor de graduação e grande amigo, pessoa que despertou meu interesse pela pesquisa.

À Julia, minha grande irmã. Não existem palavras para expressar o que criamos nesses 2 anos, você me ajudou em todos os momentos e sempre me apoiou, até mesmo nos momentos mais difíceis, sempre com muita clareza e muita paciência. Essa é uma daquelas amizades que acontece poucas vezes. Não sei se algum dia conseguirei te agradecer por tudo.

Ao Alexandre, grande parceiro para qualquer tipo de conversa.

À Laís, amiga desde a primeira semana do mestrado, pessoa pela qual criei grande carinho, durante esses 2 anos, passamos por momentos de desespero e extrema alegria.

Ao Guilherme, que sempre me ajudou e que também se tornou um grande amigo.

À Patrícia Tatemoto, irmã de VPS, com toda certeza, jamais esquecerei das caminhadas, partos na suinocultura, nossas risadas, nossas conversas e jantares na casa.

Ao Fernando e Júlio, considero vocês demais.

Ao Thiago e David, grandes amigos que ganhei na pós e que levarei para a vida toda.

À Marisol, Luana e Mariana, amigas que tornaram minhas noites na casa do VPS muito mais divertidas, sempre dispostas a escutar e a conversar sobre todos os assuntos, isso me fará muita falta.

À Bruna, que mesmo conhecendo a pouco tempo se tornou uma grande amiga.

Aos amigos do laboratório: João, Bruna, Jéssica, Lucas, Geovanna, Alessandra, Livia, Carol e Izabelle.

Ao Nuno, grande amigo e de uma clareza surpreendente sobre a vida.

À todo o pessoal do LVA da UNICAMP: Leo, Gabi, Carol, Paulo e Matheus. Em especial o Leo, que me ajudou várias vezes e que foi de vital importância para a realização deste trabalho.

À Professora Dra. Clarice Weis Arns, por permitir a utilização do espaço e dos equipamentos do LVA e pelos ensinamentos.

Ao LANAGRO pelas doações de ovos SPF, e à Maria Angela Orsi, por todos ensinamentos.

Às Professoras Trícia e Lara, sempre atenciosas e dispostas a auxiliar.

Ao Diogo e Júlio, amigos de Ilha Solteira.

À Livia, minha fisioterapeuta, que tornou essa jornada menos dolorosa, literalmente.

À Prof. Msc Diana Nascimento, grande amiga e com toda certeza grande responsável pelo meu ingresso na pós-graduação

Ao Prof. Msc Marcelo Castro, eterno mestre.

Ao Prof. Dr. Reinaldo Orsi, um professor excepcional e um grande amigo.

Ao Marcelo e Pedro, irmãos de graduação e que mesmo com o passar dos anos a amizade continua a mesma.

Ao Professor Dr. Paulo Eduardo Brandão, que sempre se mostrou disposto a me auxiliar e pessoa por quem tenho grande admiração.

Ao Danival, pessoa que sempre me ajudou no VPS.

À CAPES pela bolsa.

À todos que colaboraram direta ou indiretamente com a realização do meu trabalho, assim como meu crescimento profissional e pessoal.

À você, que por qualquer motivo estiver lendo este trabalho.

“É muito melhor lançar-se em busca de conquistas grandiosas, mesmo expondo-se ao fracasso, do que alinhar-se com os pobres de espírito, que nem gozam muito, nem sofrem muito, porque vivem numa penumbra cinzenta, onde não conhecem nem vitória, nem derrota. ”

Theodore Roosevelt

RESUMO

SIMÃO, R. M. Detecção e caracterização molecular de coronavírus aviários em amostras de aves de cativeiro. [Detecção e caracterização molecular de coronavírus aviários em amostras de aves de cativeiro]. 2017.58 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

As aves silvestres são consideradas importantes reservatórios de diversos vírus aviários que podem afetar aves comerciais. Dessa forma, o monitoramento das aves silvestres é fundamental para garantir a sanidade dos plantéis avícolas brasileiros. Nos últimos anos, o número de espécies de aves nas quais os coronavírus aviários foram encontrados aumentou vertiginosamente em diversos países. Contudo, poucos estudos envolvendo a detecção de coronavírus aviários em aves de cativeiro e aves silvestres ou sinantrópicas foram realizados no Brasil. Assim, o presente estudo teve como objetivo identificar a presença dos coronavírus aviários em aves silvestres no Brasil e caracterizá-los molecularmente. As amostras foram testadas através do teste de RRT-PCR para detecção do gene UTR do IBV, bem como uma *nested*-PCR para detecção do gene S1 dos coronavírus aviários. O sequenciamento de alto desempenho foi utilizado para caracterizar os vírus detectados. No total, foram testadas 300 amostras de aves silvestres (147 suabes orofaríngeas e 153 suabes cloacais). No total, 27 amostras foram positivas pelo teste RRT-PCR. Duas amostras de Anseriformes das amostras positivas no teste de RRT-PCR foram selecionadas para sequenciamento de alto desempenho. Em ambas as amostras sequenciadas foi constatada a co-infecção pelos vírus da bronquite infecciosa e vírus da doença de Newcastle. A análise das amostras demonstrou alta identidade com vírus vacinais, o que demonstra que estirpes vacinais utilizadas na imunização de aves de produção circulam em aves silvestres e de produção de subsistência.

Palavras-chave: Coronavirus. Vigilância. Aves silvestres.

ABSTRACT

SIMÃO, R. M. **Molecular detection and characterization of avian coronavirus in samples from captive birds.** [Molecular detection and characterization of avian coronavirus in samples from captive birds]. 2017. 58 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

Wild birds are an important reservoir of different viruses that can affect poultry. Viral surveillance in wild birds is, thus, extremely important to ensure the poultry health in Brazil. In recent years, the number of species of birds in which avian coronaviruses have been found skyrocketed in several countries. However, few studies involving the detection of avian coronaviruses in captive wild birds or wild life birds were conducted in Brazil. Thus, the present study aimed to identify the presence of avian coronaviruses in Brazil and characterize them molecularly. Samples were tested by RRT-PCR test for detection of the UTR gene of IBV, as well as a nested-PCR for detection of S1 gene. In total, 300 samples of wild birds (147 oropharyngeal swabs and 153 cloacal swabs) were tested. In total, 27 samples were positive in RT-PCR assay. Two positive samples in RRT-PCR assay were selected for Next-generation sequencing. In both sequenced samples, co-infection with infectious bronchitis virus and Newcastle disease virus was found. The analysis of samples showed identity with vaccinal strains used in immunization of commercial flocks circulate in wild birds and subsistence flocks.

Keywords: Coronavirus. Surveillance. Wild birds.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura e morfologia dos coronavírus.....	16
Figura 2. Desenho esquemático do genoma dos coronavírus e transcrição dos RNAs subgenômicos.....	18
Figura 3. Desenho esquemático da replicação dos gammacoronavírus	19
Figura 4. Árvore filogenética das variantes de VBI circulantes em diversas partes do mundo, baseada no gene S1	20
Figura 5. Diferenças entre as regiões do gene S1 que são utilizadas para o sequenciamento em diversas posições do genoma de IBV realizada por diferentes estudos	26
Figura 6. Gel de agarose 1,5% das amostras positivas pelo teste específico de RRT-PCR para detecção de VBI foram testadas pelo teste RT-PCR convencional	42
Figura 7. Análise Filogenética das amostras CA11T e Ganso OP pelo método Maximum Likelihood.....	44

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Oligonucleotídeos e sondas utilizados para amplificação do material genético dos testes moleculares	35
Quadro 2. Amostras inoculadas em ovos SPF	36
Quadro 3. Número de acesso das amostras utilizadas para análise filogenética da amostra CA11T	39
Quadro 4. Número de acesso das amostras utilizadas para análise filogenética da amostra GANSO OP	39
Quadro 5. Amostras positivas no RRT-PCR para VBI separadas por Ordem animal.....	40

LISTA DE ABREVIATURAS

VBI: Vírus da Bronquite Infecciosa

PIB: Produto interno bruto

ICTV: Comitê Internacional de Taxonomia dos Vírus

MERS: Síndrome Respiratória do Oriente Médio

SARS: Síndrome Respiratória Aguda Grave

NSP: Proteína não estrutural

RNA: Ácido ribonucléico

RdRp: RNA-polimerase RNA dependente

S1: Subunidade um da proteína S

S2: Subunidade dois da proteína S

UTR: Região não traduzida

HVR: Região hipervariável

RRT-PCR: Reação em cadeia da polimerase da transcrição reversa em tempo real

CEUA: Comitê de Ética no Uso de Animais

FMVZ: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

ICMBio: Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade

SISBIO: Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade

USP: Universidade de São Paulo

DNA: Ácido desoxirribonucleico

dsDNA: Ácido desoxirribonucleico de fita dupla

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	JUSTIFICATIVA	30
3	OBJETIVOS	31
3.1	OBJETIVO GERAL.....	31
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	31
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	32
4.1	COLETA DE AMOSTRAS	32
4.2	AMOSTRAS PADRÃO	32
4.3	PURIFICAÇÃO DO RNA VIRAL	33
4.4	AMPLIFICAÇÃO POR RRT-PCR	33
4.5	AMPLIFICAÇÃO POR RT-PCR.....	33
4.6	VALIDAÇÃO DOS TESTES.....	34
4.7.	SEQUENCIAMENTO DOS FRAGMENTOS AMPLIFICADOS	35
4.8	ISOLAMENTO DE AMOSTRAS POSITIVAS EM OVOS SPF	36
4.9	PRÉ-TRATAMENTO DAS AMOSTRAS PARA O SEQUENCIAMENTO NGS 37	
4.10	PREPARO DAS BIBLIOTECAS.....	37
4.11	ANÁLISE DE DADOS E ANÁLISE FILOGENÉTICA.....	38
5	RESULTADOS	39
5.1	DETECÇÃO DAS AMOSTRAS.....	40
5.2	SEQUENCIAMENTO DAS AMOSTRAS.....	42
5.3	ANÁLISE FILOGENÉTICA	43
6	DISCUSSÃO	45
7	CONCLUSÕES	49
8	REFERÊNCIAS	50

1 INTRODUÇÃO

A bronquite infecciosa das galinhas é uma das principais doenças virais que causam estas perdas à avicultura comercial. Trata-se de uma doença altamente contagiosa e com uma grande gama de genótipos, o que torna seu controle extremamente desafiador. Estas características inerentes ao vírus da bronquite infecciosa (VBI) proporcionam a este a possibilidade de rápida disseminação e acometimento de um número elevado de aves (GELB JR et al., 2005). Aves de corte geralmente apresentam sinais respiratórios como tosse, espirro, estertores traqueais e aumento de secreção nasal e ocular, já em aves de postura, frequentemente são observados sinais como mortalidade, diminuição na taxa de postura e ovos com defeitos na casca (CAVANAGH, 2007; JANG et al., 2007; MA et al., 2012).

O vírus da bronquite infecciosa pertence à grande família viral dos coronavírus está classificada dentro da ordem *Nidovirales*, família *Coronaviridae*. O nome *Coronavirus* foi proposto em 1968, oriundo de sua morfologia, que quando observada no microscópio eletrônico, lembra o formato de uma coroa solar (TYRRELL et al., 1968). Recentemente, novos coronavírus foram relatados e geraram uma reclassificação da família *Coronaviridae* em duas subfamílias: *Torovirinae* e *Coronavirinae*. A subfamília *Coronavirinae* foi subdividida em quatro gêneros: *Alphacoronavirus*, *Betacoronavirus*, *Gammacoronavirus*, e *Deltacoronavirus* (ICTV, 2014). *Alphacoronavirus* e *Betacoronavirus* são encontrados principalmente em mamíferos (DONG et al., 2007), sendo que, no grupo dos *Betacoronavirus*, estão agrupadas as doenças de alto potencial zoonótico, como a Síndrome Respiratória Aguda Grave (SARS) e Síndrome respiratória por coronavírus do Oriente Médio (MERS) (DE GROOT et al., 2013; HU et al., 2015). Já os *Gammacoronavirus* e *Deltacoronavirus* foram detectados tanto em aves quanto em mamíferos (MIHINDUKULASURIYA et al., 2008; WOO et al., 2009; WOO et al., 2012).

Os coronavírus aviários são envelopados e seu genoma é composto por uma fita simples de RNA de sentido positivo, simetria helicoidal e podem apresentar forma esférica ou pleomórfica, sendo que seu envelope tem aproximadamente 120 nm de diâmetro, com projeções glicoprotéicas

(espículas) de 20 nm (Figura 1). O genoma desses vírus possui aproximadamente 27.600 nucleotídeos, e codifica três proteínas estruturais majoritárias: a glicoproteína de superfície (S - espícula), a proteína de membrana (M), a do nucleocapsídeo (N) e uma quarta estrutural denominada pequena proteína de membrana (E), que está associada com o envelope viral em pequenas quantidades, sendo essencial para a formação da partícula viral (CAVANAGH, 2005; CALLISON et al., 2006). O gene do complexo replicase, composto por 16 subunidades virais (exceto VBI – 15 subunidades), incluindo o gene da RNA polimerase dependente de RNA (RdRp), fica situado próximo a extremidade 5', ocupa aproximadamente dois terços do genoma vírion (BRANDÃO; LOVATO; SLHESSARENKO, 2012). Esses vírus apresentam uma grande variabilidade antigênica devido às altas taxas de recombinação de 10^{-3} , assim como os vírus de Influenza (JACKWOOD; HALL; HANDEL, 2012).

Figura 1. Estrutura e morfologia dos coronavírus

Fonte: (MASTERS; PERLMAN, 2013)

A: Tomografia crio eletrônica de virions de hepatite viral murina (MHV). **B:** Desenho esquemático da partícula viral com as principais proteínas estruturais, S (proteína de espícula), M (proteína de membrana), E (proteína de envelope) e N (proteína de nucleocapsídeo).

A proteína S é determinante para o tropismo celular da estirpe envolvida e patogênese consequente (GALLAGHER; BUCHMEIERT, 2001). Esta proteína é composta por aproximadamente 3400 nucleotídeos é clivada em 2 subunidades, na qual a S₁ é responsável pela ligação ao receptor celular e a S₂ pela fusão a membrana celular do hospedeiro (BELOUZARD et al., 2012).

Trata-se de uma proteína de fusão de classe I, que possui a característica de clivagem em duas subunidades, que ocorre após o seu contato com as proteases da célula hospedeira em uma subunidade distal e uma subunidade ancorada a membrana viral, um acontecimento essencial para a fusão a membrana da célula hospedeira (BOSCH et al., 2003). A S₁ também é principal proteína responsável pela indução de resposta imune do hospedeiro e da produção de anticorpos neutralizantes (CAVANAGH; ELUS; COOK, 1997),

Dentro do envelope está localizado o *core* de ribonucleoproteína, o qual contém o genoma de RNA e a proteína N. A proteína do nucleocapsídeo (N) é uma fosfoproteína com aproximadamente 50 a 60 kDa de peso molecular que junto com o RNA genômico, forma o nucleocapsídeo. A proteína N confere ao RNA genômico certa proteção contra as ribonucleases e possui domínios de ligação ao RNA, à membrana e a fosfolipídios que facilitariam a formação das partículas virais. A ligação da proteína N com terminações 5' e 3' do RNA viral sugere que esta participa na modulação do RNA viral pela capacidade de se ligar à membrana, possibilitando a formação de complexos de transcrições. A proteína N também é capaz de incitar a resposta celular. Embora o domínio terminal de proteínas N (N-NTD) se ligue a todas as formas de polímeros ácido nucleicos (RNA simples e de cadeia dupla e DNA simples e de cadeia dupla), a especificidade por RNA sobre DNA é provavelmente fornecida pelo contexto (localização do complexo replicase), em vez de seletividade bioquímica (SAIKATENDU et al., 2007).

A proteína E dos coronavírus é uma proteína de membrana integral que juntamente com a proteína M desempenha um importante papel na montagem viral. A proteína E, quando expressa sozinha ou quando expressa em conjunto com a proteína M forma partículas semelhantes às dos vírus (WEISS; NAVAS-MARTIN, 2005). De acordo com um estudo realizado por pesquisadores americanos, surpreendentemente foi possível selecionar um MHV recombinante com uma deleção do gene da proteína E, tal MHV recombinante apresentou baixa infecciosidade e baixa taxa de replicação, o que indica que embora não seja essencial, a proteína E desempenha um papel importante na produção do vírus infeccioso (KUO; MASTERS, 2003).

A proteína M tem como sua principal função a montagem da partícula viral, na qual interage com outras proteínas de membrana no local de brotamento da

nova partícula viral, esta proteína pode adotar duas conformações, na qual, a conformação alongada está aparentemente associada à rigidez da membrana e um grande número de espículas, já a conformação compacta parece estar associada a grande flexibilidade da membrana e baixa quantidade de espículas (NEUMAN et al., 2011). Um estudo realizado demonstrou que a glicoproteína M apresenta pouca imunogenicidade e que não induziu nenhum tipo de proteção e aves imunizadas com um purificado da proteína M, e que foram necessárias pelo menos quatro aplicações para induzir a produção de anticorpos (IGNJATOVIC; GALLI, 1994).

Além destas proteínas, os *Coronavirus* ainda possuem o gene replicase - que ocupa aproximadamente dois terços do genoma - que codifica duas poliproteínas denominadas pp1a e pp1ab que são clivadas por proteinases virais e resultam em 16 proteínas não estruturais (Nsp1-Nsp16), exceto os *Gammacoronavirus* que não possuem a Nsp1 (ARMESTO; CAVANAGH; BRITTON, 2009). O gene da replicase é o único que é traduzido diretamente do genoma viral, todos os outros são traduzidos a partir de sgRNAs (Figura 2) (MASTERS; PERLMAN, 2013).

Figura 2. Desenho esquemático do genoma dos coronavirus e transcrição dos RNAs subgenômicos

Fonte: (VIRALZONE, 2016)

A replicação viral inicia-se com a ligação da proteína S aos receptores celulares, em seguida é realizada a fusão entre o vírus e a célula hospedeira (Figura 3). Aparentemente, para o VBI esta fusão é dependente de pH ácido, no qual o pH ótimo é 5.0, assim como para o vírus da Influenza (CHU, V. C. et al., 2006). Uma vez dentro do citoplasma, ocorre o desnudamento viral e o RNA genômico é liberado e dá início a sua replicação, no qual o complexo replicase é traduzido na proteína RdRp responsável pela transcrição de um RNA antígenômico que servirá de molde para síntese do RNA de sentido genômico que será incorporado a partícula viral e também a transcrição de sgRNAs que serão traduzidos nas outras proteínas necessárias para a montagem viral. A proteína N liga-se ao RNA genômico e segue em direção ao retículo endoplasmático rugoso (RER) no qual as proteínas M, E e S já estão inseridas, em seguida passa pelo complexo de golgi onde todas as proteínas são associadas e formam vesículas que acumulam as partículas virais que são transportadas até a membrana plasmática e são liberadas por exocitose.

Figura 3. Desenho esquemático da replicação dos gammacoronavírus

Fonte: (DECARO, 2011).

Replicação viral dos gammacoronavírus. S (proteína de espícula), M (proteína de membrana), E (proteína de envelope), N (proteína de nucleocapsídeo) e NS (proteínas não-estruturais).

O VBI foi descrito pela primeira vez nos Estados Unidos em 1930 (MONTASSIER, 2010). No Brasil, o primeiro relato ocorreu em 1957 (HIPÓLITO, 1957).

A variabilidade genética deste vírus culmina com o surgimento de uma enorme variedade de genótipos, que já foram isolados a partir de amostras de aves domésticas e silvestres, e descritos em todo o mundo (Figura 4), por meio do sequenciamento do gene S1, uma das principais ferramentas utilizadas para o estudo deste vírus (DE WITT; COOK; VAN DER, 2010).

Figura 4. Árvore filogenética das variantes de VBI circulantes em diversas partes do mundo, baseada no gene S1

Fonte: (DE WITT; COOK; VAN DER, 2010)

As aves silvestres, especialmente aves aquáticas migratórias, aves de rapina e passeriformes, são frequentemente consideradas reservatórios ou até mesmo vetores de diversos patógenos aviários potencialmente deletérios as aves comerciais, dentre os quais o VBI se insere, o que ressalta a importância do monitoramento das aves silvestres para a manutenção da sanidade avícola. (ALEXANDER, 2007; CHU, D. K. et al., 2011; CHA; YU; ZSAK, 2013). Esses vírus já foram detectados em diversas espécies de aves, inclusive silvestres (CAVANAGH, 2005), sendo que alguns deles apresentam uma alta identidade entre os VBI e são identificados como VBI-like (LIU et al., 2005).

Os VBI-like já foram detectados em diversas espécies de aves silvestres das ordens *Anseriformes*, *Charadriiformes* e *Galliformes* (HUGHES et al., 2009; TARNAGDA et al., 2011; DOMANSKA-BLICHARZ et al., 2014). Outros autores têm relatado outros coronavírus aviários que apresentam uma baixa identidade de nucleotídeos com os VBI em diversas ordens de aves, como *Galliformes*, *Anseriformes*, *Columbiformes*, *Charadriiformes*, *Passeriformes*, *Pelacaniformes*, *Ciconiiformes* e *Pssitaciformes* (JONASSEN et al., 2005; CULVER; BRITTON; CAVANAGH, 2008; MURADRASOLI et al., 2009; FELIPPE et al., 2010; KIM; OEM, 2014). Um estudo recente inclusive demonstra a circulação de um novo genótipo de coronavírus aviário em patos geneticamente similar aos que circulam em aves silvestres aquáticas e distintos dos VBI-like (CHEN et al., 2013). Dessa forma, a epidemiologia dos *Gammacoronavírus* aviários ainda necessita ser esclarecida.

No Brasil, diversos estudos apontam uma alta prevalência de VBI em aves comerciais (TORRES et al., 2013) demonstrando inclusive um genótipo brasileiro distinto de outros países (VILLARREAL et al., 2007; FRAGA et al., 2013; MOURA-ALVAREZ et al., 2013). Interessante ressaltar que poucos estudos envolvendo a detecção de coronavírus aviários em aves de cativeiro (CARDOSO et al., 2011) e aves silvestres ou sinantrópicas (FELIPPE et al., 2010) foram realizados no Brasil. O conhecimento sobre os vírus circulantes em aves silvestres torna-se de suma importância para a avaliação à avicultura comercial bem como sobre a epidemiologia desses vírus.

O *Gallus gallus domesticus* era considerado o único hospedeiro natural do vírus da bronquite infecciosa das galinhas. Agora, sabe-se que este vírus

pode infectar perus ou faisões, ao observar-se um marcado grau de semelhança entre o coronavírus de galinhas, perus e faisões (CAVANAGH et al., 2002).

Estirpes do tipo Massachussets têm sido isoladas nos Estados Unidos, América Latina, Europa e na Ásia desde 1940 e até o presente (JACKWOOD, 2012; AL-SHEKAILI; BAYLIS; GANAPATHY, 2015). No Brasil, o VBI foi isolado pela primeira vez no Brasil em 1957 (HIPÓLITO, 1957). Apenas uma única estirpe vacinal é atualmente liberada para uso pertence ao genótipo Massachussets para o controle desse vírus na avicultura comercial. As estirpes mais utilizadas têm origem holandesa como a Massachussets H120, H52 e H90, sendo que o “H” representa “*Holland*” e os números correspondem o número de passagens em ovos SPF (BIJLENGA et al., 2004).

No entanto, a maioria dos países tem identificado novas variantes naturais de sua região (DE WITT; COOK; VAN DER, 2010). Assim, alguns estudos demonstraram que uma variante brasileira tem circulado e evoluído a campo desde 1988 indicando que, muito provavelmente, as variantes isoladas com sorotipos diferentes dos utilizados nas vacinas estão emergindo (VILLARREAL et al., 2007; FELIPPE et al., 2010; CHACON et al., 2011; FRAGA et al., 2013). O comportamento biológico e epidemiológico da variante brasileira começa a ser estudado para auxiliar nos programas de controle da VBI, evidenciado pela utilização da vacinação monovalente com a vacina do sorotipo Massachussets (MONTASSIER, 2010). A intensidade da resposta imune celular e humoral, e sua habilidade de conferir efetiva proteção é dependente da dose de vacina viva atenuada administrada do sorotipo Mass (M41) (OKINO et al., 2014).

Diversos sorotipos circulam nos Estados Unidos, além do tipo de VBI Massachussets originalmente identificado no início dos anos 1950 (FABRICANT, 1951; 1998). O sorotipo Connecticut foi o primeiro sorotipo distinto do Massachussets isolado nos Estados Unidos e este não apresentava proteção cruzada e também não era neutralizado pelo soro para a estirpe Massachussets (JUNGHERR; CHOMIAK; LUGINBUHL, 1956). Anos depois, o sorotipo DE072 foi identificado em uma granja de poedeiras nos Estados Unidos (MONDAL; LUCIO-MARTINEZ; NAQI, 2001). A estirpe Q1 tem sido a mais comumente reportada na Argentina (COOK et al., 2014). Dezenas de outros sorotipos foram isolados na África, Ásia, Índia, Austrália, Europa e América do Sul. Surtos de bronquite infecciosa ocorrem frequentemente, mesmo em planteis vacinados. As

estirpes de vírus isolados observados a partir desses focos são frequentemente, mas nem sempre, um sorotipo diferente do tipo de utilizado na confecção da vacina, o que demonstra que vários sorotipos podem co-circular em uma determinada região (CAVANAGH; GELB JR., 2008).

Um estudo realizado em 2008 demonstrou o 4/91 como um dos genótipos predominantes na Espanha e que este circula no país desde 1992. Curiosamente, o estudo também mostra uma importante mudança na dinâmica da subpopulação do vírus ao longo do tempo com uma clara substituição de genótipos predominantes na Espanha, uma vez que o genótipo 4/91 foi prevalente no país durante a década de noventa e surpreendentemente deixou de ser o principal após o aparecimento de um novo genótipo, o Itália 02 que se tornou o genótipo predominante no final desta mesma década. Vale ressaltar que no final dos anos noventa as vacinas contra a 4/91 começaram a ser comercializadas na Espanha. Portanto, é provável que a vacinação contra o genótipo 4/91 tenha sido muito bem-sucedido, a fim de conseguir um controle de infecções causadas por este genótipo no país visto que foi observado uma redução drástica no isolamento do 4/91 de casos clínicos. Por outro lado, é tentador especular que o *status* imunológico das aves contra o 4/91 poderia ter proporcionado um ambiente em que o novo genótipo variante Itália 02 tinha maior vantagem, contribuindo para um estabelecimento mais rápido e disseminação desse sorotipo pela Espanha (DOLZ et al., 2008).

Um estudo sobre a epidemiologia do vírus da bronquite infecciosa na Bélgica no período de 1986 até 1995 e apresentou resultados que sugerem a provável cocirculação do tipo de vírus vacinal e cepas selvagens, uma vez que ambas foram coletadas a partir de galinhas vacinadas e não vacinadas. De fato, dois dos 12 isolados da cepa Massachusetts (linhagens 86/71 e 92/974), a partir de frangos de corte vacinados de 22 e 35 dias de idade, apresentavam cepa vacinal de Massachusetts que foi evidenciado pelo fato de que sua sequência UTR apresentar característica típica da sequência original encontrado em no vírus vacinal Massachusetts e suas proteínas de espícula S₁, ou seja, o isolamento de cepas semelhantes a do tipo Massachusetts vacinal em plantéis não vacinados é mais um indício da circulação de cepas vacinais (MEULEMANS et al., 2001).

Na Ásia, a estirpe PDRC/Pune/Ind/1/00 foi isolada de animais com manifestações clínicas respiratórias e renais em 2005, na Índia. Este isolado apresentou similaridade inferior a 40% na sequência da proteína S₁ àquelas estirpes circulantes nas Américas como a D1466, Mex/1765 e DE072, no entanto, quando comparada com a estirpe 6/82 circulante na Europa, chegou a apresentar similaridade próxima a 68%. Este novo genótipo que apresenta uma sequência única de S₁ e pode ter emergido da recombinação das variantes já conhecidas e circulantes em outros países e continentes com variantes circulantes na região ou estirpes vacinais (BAYRY et al., 2005). Em 2004, um novo genótipo nefropatogênico de VBI identificado como QX, circulante em plantéis vacinados e não vacinados na China. A similaridade entre estas amostras e outras 16 estirpes circulantes variou de 60 a 81% mostrando que tratava-se de um novo genótipo circulante (LIU; KONG, 2004). Em 2009, no Japão, foi isolado um novo genótipo do VBI designado JP-IV, com base na análise do gene S1 (MASE et al., 2010). Neste estudo também foi realizada a vírus neutralização, nenhum dos soros utilizados contra as estirpes circulantes JP-II, JP-III e 4/91 neutralizou os efeitos deste novo genótipo (JP-IV), sugerindo que a antigenicidade deste isolado é diferente a dos outros conhecidos no Japão.

A investigação epidemiológica das infecções VBI demonstra que a propagação de uma estirpe de uma zona ou país para outro pode ser devido, pelo menos em parte, a sua introdução imprópria pela comercialização de aves e migração de aves selvagens (CAVANAGH, 2005).

As diferenças de genótipos do VBI devem-se as variações na sequência de aminoácidos de duas regiões da subunidade S₁, chamadas de regiões hipervariáveis (HRV) (MONTASSIER, 2010). Desse modo, diferenças sutis na sequência de nucleotídeos do gene codificador da proteína S₁, podem dar origem a novos sorotipos que podem infectar animais previamente expostos a outros sorotipos do mesmo vírus (CAVANAGH; NAQI, 2003). Estas diferenças que ocorrem na porção S1 são responsáveis pela grande variedade de sorotipos de VBI e devem-se, principalmente, a alterações que comumente estão entre 20-25% na sequência de nucleotídeos e de até 50% na sequência de aminoácidos, o que ressalta a importância dos estudos sobre o gene codificador da proteína S (CAVANAGH et al., 2005).

No Brasil, amostras de campo tem sido classificadas como dois genótipos distintos por apresentarem baixa similaridade quando comparadas a amostras de referência, sendo classificadas como BR-I (CHACON et al., 2011). Recentemente, um estudo demonstrou o surgimento de um novo genótipo, denominado BR-II, que apresenta pelo menos oito substituições na sequência de aminoácidos no gene S1 em comparação com cepas vacinais Mass (FRAGA et al., 2013).

É notório que o VBI possui uma enorme variedade de estirpes virais geneticamente distintos, no entanto, não há consonância quanto ao método de comparação das sequências do vírus uma vez que, as regiões alvos dos primers utilizados variam entre os grupos de pesquisa (Figura 5) (DE WITT; COOK; VAN DER, 2010). Recentemente, foi proposta a comparação utilizando apenas as sequências completas do gene S1 depositadas no Genbank entre os anos de 1937 e 2013, no total, foram utilizadas 1518 sequências, o que resultou na definição de 6 genótipos distintos (G-I a G-VI) que abrangem 32 linhagens virais e um número de recombinantes entre elas (VALASTRO et al., 2016).

Figura 5. Diferenças entre as regiões do gene S1 que são utilizadas para o sequenciamento em diversas posições do genoma de IBV realizada por diferentes estudos

Fonte: (DE WITT; COOK; VAN DER, 2010)

O vírus da bronquite infecciosa apresenta um amplo e variado tropismo, e as manifestações clínicas da doença podem ser diversas, o principal sítio de replicação do vírus são as células do sistema respiratório, embora o vírus também apresente capacidade de replicação em outros tecidos tais como o trato respiratório, trato renal, trato urogenital e trato intestinal (LIMA, 2007; Di FABIO; BUITRAGO, 2009). No Brasil, o VBI foi detectado em plantéis de poedeiras a partir de amostras do trato gastrointestinal (METTIFOGO et al., 2014).

Diversos fatores integram a patogenia das doenças causadas pelos coronavírus, fatores intrínsecos como a idade e genética, sendo relatada uma maior ocorrência das cepas entéricas em animais jovens, no entanto, cepas respiratórias podem afetar aves de todas as idades, porém animais jovens apresentam sintomatologia mais grave. Fatores extrínsecos como nutrição e

fatores ambientais também estão relacionados a patogenia, sendo observado o aumento da mortalidade em aves com nefrite associada com o vírus da bronquite infecciosa que recebem altas doses de proteína em sua dieta, o estresse por frio também agrava a doença respiratória nas aves (BRYAN, 2009).

O diagnóstico de campo é apenas presuntivo com base na história clínica, lesões, disseminação e evolução rápida em torno de 2 a 3 dias. Há dois tipos de diagnóstico, o direto, em que se deve isolar o agente causal, e indireto pela soroconversão específica do vírus da bronquite infecciosa ou aumento do título de anticorpos (CUBILLOS, 2009). O diagnóstico deve incluir, se possível, a identificação do sorotipo ou genótipo do vírus, devido à grande variação antigênica exibido pelas diferentes estirpes de VBI e disponibilidade de vacinas destinadas a diferentes sorotipos (CAVANAGH; GELB JR., 2008).

O teste de RT-PCR é realizado diretamente a partir do material de galinhas infectadas ou após amplificação preliminar do vírus em ovos embrionados. O RT-PCR é suficientemente sensível para detectar o RNA viral a partir de suabes cloacais e de traqueia. Dito isto, pode-se obter um resultado positivo de PCR que não é suficiente para diagnóstico e para confirmação as sequências do produto do PCR, devem ser comparadas com as sequências correspondentes as estirpes da vacina utilizada naquele plantel (CAVANAGH; GELB JR., 2008).

Os métodos de genotipagem por RT-PCR substituíram em grande parte as técnicas de HI e SN para a determinação da identidade de uma estirpe. A base molecular de variação antigênica tem sido investigada, geralmente por sequenciação de nucleotídeos do gene que codifica para a proteína S, ou mais especificamente, a subunidade S₁ da proteína S, onde a maior parte dos epítomos aos quais os anticorpos neutralizantes são encontrados (KANT, 1992). As vantagens dos métodos de genotipagem incluem um tempo de resposta rápido e mais importante quando comparada aos testes de SN e HI, e a capacidade de detectar uma grande variedade de genótipos. A passagem em ovos embrionados pode ser necessária para aumentar o título viral antes da análise por RT-PCR (CAVANAGH; GELB JR., 2008).

O teste de RT-PCR específico para o gene S₁ pode ser usado para identificar isolados de campo como genótipos de IBV utilizando *primers* universais e genótipos específicos a partir das estirpes mais comuns. *Primers*

específicos do gene S₁ para os genótipos Massachusetts, Connecticut, Arkansas, JMK e DE/072/92 têm sido desenvolvidos (KEELER et al., 1998).

O controle dessa doença é baseado principalmente em vacinação embora muitas falhas ocorram devido às altas taxas de recombinações desses vírus, dificultando a (JACKWOOD; HALL; HANDEL, 2012).

O controle da bronquite infecciosa das galinhas obtido através da utilização de vacinas vivas atenuadas ou inativadas. As vacinas vivas atenuadas são obtidas após passagens seriadas do vírus de campos em ovos embrionados livres de patógenos específicos conhecidos como SPF (sigla, em inglês, *Specific Pathogen Free*) ou em cultivos celulares, à medida que são realizadas estas passagens, o vírus fica mais adaptado ao ovo embrionado/cultivo celular, mas perde patogenicidade para a ave, ou seja, mantém a capacidade de replicação nos tecidos das aves em menor grau que o vírus de campo sem causar a doença, esta replicação é necessária para induzir uma maior resposta imunitária das aves. Geralmente são utilizadas para prevenir e controlar infecções em frangos de corte e servir como primo vacinação de poedeiras comerciais e reprodutoras (DI FABIO; BUITRAGO, 2009).

É necessário lembrar que as vacinas vivas atenuadas devem se replicar na mucosa traqueal, portanto verifica-se uma situação crítica, pois vacinas muito atenuadas não conferem proteção aos animais e vacinas pouco atenuadas podem causar a doença. As vias de aplicação de vacinas vivas atenuadas são instilação ocular, aspersão, intranasal ou por água de bebida (CUBILLOS, 2009). Vacinas inativadas não possuem capacidade de replicação, de modo que a administração é realizada individualmente. Essas vacinas comumente são utilizadas em aves previamente imunizadas com vacinas vivas antes da postura com o intuito de induzir a produção de anticorpos a níveis elevados, uniformes e de longa duração que serão transmitidos à progênie (CAVANAGH; NAQI, 2003).

O grau e duração de proteção das aves imunizadas são dependentes de diversos fatores, tais como, a idade em que as aves foram vacinadas, os níveis de imunidade materna, a capacidade imunogênica da vacina utilizada, via de aplicação, virulência da estirpe que representará o desafio de campo, intervalo entre a vacinação e o desafio, assim como a imunocompetência do hospedeiro (DE WITT; COOK; VAN DER, 2010). Vacinas vivas atenuadas como a H120 têm sido utilizadas com sucesso nos últimos cinquenta anos, provavelmente pelo fato

de resultarem em uma proteção excelente quando desafiadas a sorotipos homólogos, no entanto, sua eficácia tem sido questionada devido ao surgimento de novos sorotipos heterólogos. O “H” representa Huyben, nome do proprietário da granja onde o vírus foi isolado pela primeira vez e os números correspondem às passagens em ovos SPF (BIJLENGA et al., 2004). Vacinas de origem holandesas sintetizadas a partir de amostras Massachussets são as mais difundidas, uma vez que, estirpes de campo do sorotipo Massachussets possuem distribuição mundial e continuam sendo relatadas (CAVANAGH; NAQI, 2003).

No Brasil, surtos de VBI em planteis vacinados são frequentes e geralmente são causados por sorotipos diferentes do sorotipo Massachussets, o único utilizado para vacinação no país (VILLARREAL et al., 2007). Atualmente o programa de controle de VBI no Brasil é ineficiente, pois é baseado somente na vacinação monovalente com o sorotipo Massachussets, enquanto, claramente outros sorotipos circulam pelo país, e surtos frequentes continuam a ser relatados (VILLARREAL et al., 2007; COLVERO et al., 2015).

Medidas de manejo como aplicação de sistemas como “tudo dentro e tudo fora” (*all in – all out*), desinfecção de galpões e incubadoras com produtos de amplo efeito residual e com períodos de descanso prolongado, amostragem de ambiente dos galpões podem auxiliar no controle e prevenção da bronquite infecciosa. Devem-se observar também as aves, principalmente no início do inverno, os sinais respiratórios das aves e os tipos de lesões apresentadas nas aves mortas, realizando o isolamento do vírus rapidamente, especialmente após aparição de sinais clínicos. O ideal é utilizar aves sentinelas, vacinadas contra os sorotipos predominantes na região, a fim de tentar isolar genótipos diferentes (CUBILLOS, 2009).

2 JUSTIFICATIVA

O Brasil é o maior exportador de carne de frango do mundo, ocupa também a posição de terceiro maior produtor ficando atrás apenas dos Estados Unidos e da China, sua produção tem uma expectativa de crescimento de 5% para o próximo ano, com um incremento na produção estimado em 4,8 milhões de toneladas. No Brasil, a avicultura emprega aproximadamente 3,6 milhões de pessoas, direta e indiretamente, e responde por aproximadamente 1,5% do Produto Interno Bruto (PIB) nacional. A importância social também pode ser observada no interior do país, principalmente nos estados do Sul e Sudeste, onde a produção de frangos é a principal atividade econômica (UBABEF, 2015). Além disso, o consumo de carne de frango no ano 2014 foi de 42,7kg de carne por habitante, um volume extremamente elevado e que tende a aumentar, uma vez que esse consumo no ano de 2000 era de apenas 29,9kg por habitante (UBABEF, 2015). Neste cenário, a sanidade dos plantéis avícolas brasileiros deve ser monitorada devido a sua importância econômica e da segurança alimentar alcançada nos últimos anos (MONTASSIER, 2010). Em um estudo recente foi demonstrado que o VBI causa um grande impacto econômico em aves de produção, custo que pode chegar a US\$ 251.4/ 1000 aves, no Brasil, ressaltando a importância do controle desta enfermidade (COLVERO et al., 2015). Em relação a esta sanidade, as doenças respiratórias estão associadas na avicultura a grandes perdas econômicas em todo o mundo, sendo as enfermidades virais reconhecidas como o maior desafio da avicultura moderna.

Dessa forma, a manutenção da sanidade avícola dos plantéis comerciais é imprescindível, tendo em vista a relevância da avicultura para a economia brasileira. Portanto, o presente estudo se revelou de grande importância para a compreensão dos coronavírus circulantes em aves silvestres no Brasil.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Identificação de coronavírus aviários em aves de cativeiro com potencial repercussão sanitária, e que permitam o direcionamento de medidas e/ou ações que visem preservar o status sanitário vigente.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a)** Investigar a presença de coronavírus aviários em amostras de aves de cativeiro utilizando testes moleculares
- b)** Analisar filogeneticamente as amostras identificadas buscando avaliar as relações filogenéticas com estirpes circulantes na natureza e/ou em criações comerciais;
- c)** Depositar as informações geradas em bancos de dados e constituir um banco de amostras de vírus circulantes que possam contribuir para o entendimento da epidemiologia destas infecções e para a sua profilaxia em criações comerciais.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 COLETA DE AMOSTRAS

No total o projeto utilizou 300 amostras, no qual 232 amostras foram coletadas em estudos prévios e 68 pelo presente estudo. As coletas dos estudos anteriores foram realizadas nos seguintes locais: Parque Ecológico Municipal de Americana “Eng. Cid Almeida Franco” localizado no município de Americana/SP, Casa das aves localizada no Município de Pirassununga/SP, Bosque dos Jequitibás localizado no município de Campinas/SP e no C.R.A.S do Parque Ecológico do Tietê localizado no Município de São Paulo/SP, com autorização da CEUA (CEUA-FZEA-USP nº 2012.1.170.74.0 e CEUA-FMVZ 5201050214) e ICMBio (SISBIO nº3475-1).

As 68 amostras coletadas na Associação Mata Ciliar, localizada no município de Jundiaí/SP, foram realizadas pelo presente estudo com autorização da CEUA (CEUA-FMVZ-USP nº 2309251114) e ICMBio (SISBIO nº 3475-1).

O total de 300 amostras é compreendido por 147 (49%) suabes orofaríngeas e 153 (51%) suabes cloacais. As 148 amostras de *Anseriformes* coletadas na Casa das Aves de Pirassununga/SP foram agrupadas em forma de pools, preparados com amostras de até 5 animais (SPACKMAN et al., 2013), alocados no mesmo recinto, da mesma espécie, sexo, tipo de suabe resultando em um total de 40 pools, sendo 20 de suabes orofaríngeas e 20 de suabes cloacais. As outras 152 amostras foram armazenadas individualmente.

4.2 AMOSTRAS PADRÃO

Para padronização do teste foi utilizada a vacina para bronquite infecciosa (Bio-Bronk Vet (H120), Laboratório Biovet S/A, Vargem Grande Paulista). Como controle de especificidade, foram utilizados os vírus da doença de Newcastle (NDV) (New-Vacin LaSota), Laboratório Biovet S/A, Vargem Grande Paulista),

metapneumovírus aviário subtipo A (Poulvac TRT, Zoetis Industria de Produtos Veterinários Ltda., Campinas), subtipo B (Nemovac, Merial Saúde Animal Ltda., Paulínia).

4.3 PURIFICAÇÃO DO RNA VIRAL

Os RNAs virais dos suabes coletados foram extraídos com o kit QIAmp Viral RNA Mini (Cat# 52906 – Qiagen) conforme as instruções do fabricante.

4.4 AMPLIFICAÇÃO POR RRT-PCR

A reação de RRT-PCR para a detecção do gene UTR do VBI foi baseada em sondas marcadas com fluorescência FAM. As sequências dos oligonucleotídeos e sondas foram baseadas em estudos anteriores (CALLISON et al., 2006). As sequências e o gene alvo estão descritos no quadro 1. A reação de RRT-PCR foi realizada com o Kit Taqman® Fast vírus 1-Step Master Mix (Cat# 4444432 – Life Technologies, Foster City) com volume total de 20µl, contendo 5µl do master mix, 10µl RT-PCR Grade Water, 1µl de cada oligonucleotídeo (senso e anti-senso), 0,5µl da sonda e 2,5µl de amostra. As reações foram realizadas com um ciclo de 5 minutos a 50°C para transcrição reversa, seguido por 1 ciclo de 20 segundos a 95°C para inativação da enzima RT e ativação da enzima Taq polimerase. Após essa etapa, foram efetuados 50 ciclos: 15 segundos a 95°C (denaturação) e 1 minuto a 60°C (detecção e anelamento). As reações foram realizadas no termociclador Roche Light Cycler 480II (Roche, Alemanha).

4.5 AMPLIFICAÇÃO POR RT-PCR

As reações de RT-PCR e nested-PCR para a detecção do gene S1 do VBI para posterior caracterização foram realizadas baseadas em oligonucleotídeos descritos em estudos anteriores, o tamanho dos fragmentos esperados eram respectivamente 572bp e 530bp (BOCHKOV et al., 2007).

As reações de RT-PCR foram realizadas utilizando o Kit SuperScript™ III One-Step RT-PCR System with Platinum™ Taq High Fidelity DNA Polymerase (Invitrogen®) com volume total de 25µl, contendo 12,5µl do Reaction Mix, 5,5µl de água ultrapura, 1µl de SuperScript™ III/Platinum™ Taq High Fidelity Enzyme Mix, 0,5µl de cada oligonucleotídeo a 20µM (senso e antissenso), 2µl de MgSO₄ (5mM), 0,5µl de RNaseout e 2,5µl de amostra. As reações foram realizadas com um ciclo de 30 minutos a 50°C para transcrição reversa, seguido por 1 ciclo de 5 minutos a 95°C para inativação da enzima RT e ativação da enzima Taq polimerase. Após essa etapa, foram efetuados 40 ciclos: 1 minuto a 95°C (denaturação), 1 minuto a 60°C (anelamento) e 1 minuto 72°C (extensão), seguido de 1 ciclo adicional de 72°C por 7 minutos para extensão final.

As reações de nested-PCR foram realizadas utilizando o kit Invitrogen™ Platinum™ Taq DNA Polymerase (Cat# número) com volume total de 50µl, contendo 35,8µl de água ultrapura, 5µl de 10X PCR buffer, 2µl de MgCl₂ (50mM), 1µl de dNTP mix (10mM), 1µl de cada oligonucleotídeo a 10µM (senso e antissenso), 0,2µl de Platinum™ Taq DNA Polymerase e 4µl do template de DNA da reação de RT-PCR. Estas reações foram realizadas com um ciclo de 95°C por 5 minutos, seguido por 40 ciclos: 95°C por 1 minuto, 55°C por 1 minuto e 72°C por 1 minuto e um ciclo para extensão final de 72°C por 7 minutos.

As reações de RT-PCR e nested-PCR foram realizadas no termociclador C100 Touch™ Thermal Cycler (Bio-Rad Laboratories, Inc.).

Os produtos da PCR foram visualizados pela luz ultravioleta (UV) após a eletroforese em gel agarose 1,5% contendo o corante SYBR safe (Life Technologies, Carlsbad, EUA) em tampão Tris-borato (pH 8.0) com marcador de peso molecular de 100pb (Amresco).

4.6 VALIDAÇÃO DOS TESTES

Para a validação dos testes de RT-PCR em tempo real (RRT-PCR), foi utilizada a vacina para bronquite infecciosa (Bio-Bronk Vet (H120), Laboratório Biovet S/A, Vargem Grande Paulista). Inicialmente, a vacina foi ressuspensa em 300µl de água ultrapura, em seguida foi realizada a purificação do ácido nucléico. Após a purificação, foram realizadas diluições seriadas na base 10 do RNA extraído em água ultrapura das concentrações de 6ng/µl a 6×10^{-10} ng/µl. A concentração da diluição 10^0 foi quantificada no espectrofotômetro DeNovix DS-11 (DeNovix Inc). A eficiência obtida foi de 1,983 e o *slope* -3.363. O limite de detecção foi encontrado na diluição de 10^{-9} (6ag/µl) no ciclo 36.92. Para calcular o ponto de corte da reação Ct (*Cycle Threshold*) foi utilizada a fórmula $Ct = \text{Média do ciclo da última diluição detectável} + (3 \times \text{desvio padrão})$, que foi calculado em $Ct = 40.94$. A especificidade dos testes foi determinada utilizando outros vírus respiratórios, como vírus da doença de Newcastle, metapneumovírus aviário. Conforme esperado, somente a amostra padrão de bronquite infecciosa foi amplificada.

Quadro 1. Oligonucleotídeos e sondas utilizados para amplificação do material genético dos testes moleculares

Alvo	Nome	Sequência	Referência
Gene UTR (IBV)	IBV5GU391	5'-GCTTTTGAGCCTAGCGTT-3'	(CALISSON et al. 2006)
	IBV5'GP	5'-FAM-CACCACCAGAACCTGTCACCTC-BHQ-3'	
	IBV5GL533	5'-GCCATGTTGTCACCTGTCTATTG-3'	
GENE S (IBV)	S7 Fw	5'-TACTACTACCAGAGTGC(C/T)TT-3'	(BOCHKOV et al., 2007)
	S6 Ver	5'-ACATC(T/A)TGTGCGGTGCCATT-3'	
	S9 Fw	5'-GATGGTTGGCATT(A/G)CA(C/T)GG-3'	
	S5 Ver	5'-GTGCCATTGACAAAATAAGC-3'	

Fonte: Simão, 2017.

4.7. SEQUENCIAMENTO DOS FRAGMENTOS AMPLIFICADOS

Os fragmentos que fossem amplificados por uma RT-PCR convencional e seriam submetidos ao sequenciamento parcial do gene S1 a partir de amostras positivas para VBI, com oligonucleotídeos específicos previamente descritos (BOCHKOV et al., 2007). As reações de sequenciamento seriam realizadas em triplicatas para garantir confiabilidade nas sequências geradas. Os fragmentos de PCR seriam purificados e as amostras e oligonucleotídeos enviados ao

Centro de Estudos do Genoma Humano da Universidade de São Paulo, conforme recomendações do Setor de Sequenciamento de DNA.

4.8 ISOLAMENTO DE AMOSTRAS POSITIVAS EM OVOS SPF

Algumas amostras detectadas pelo teste específico de RRT-PCR para VBI (Quadro 2) foram inoculadas em ovos embrionados de galinha SPF com 9 dias de incubação para tentativa de isolamento viral (OIE, 2014). Para tanto, 100uL foram inoculados pela via alantóide e os ovos foram monitorados diariamente durante 7 dias. Ao final dos sete dias ou com a identificação de mortalidade, o líquido alantóide foi coletado e estocado em freezer -80°C para análises posteriores (RRT-PCR específicos).

Quadro 2. Amostras inoculadas em ovos SPF

Código da Amostra	Espécie	Tipo de Suabe
AMC02T	<i>Aratinga leucophthalma</i>	Orofaringeano
AMC03C	<i>Aratinga leucophthalma</i>	Cloacal
AMC09T	<i>Megascops choliba</i>	Orofaringeano
AMC28T	<i>Falco sparverius</i>	Orofaringeano
AMC28C	<i>Falco sparverius</i>	Cloacal
AMC33T	<i>Amazona aestiva</i>	Orofaringeano
CA02T	<i>Aix galericulata</i>	Orofaringeano
CA03T	<i>Aix galericulata</i>	Orofaringeano
CA04T	<i>Aix galericulata</i>	Orofaringeano
CA04C	<i>Aix galericulata</i>	Cloacal
CA05T	<i>Aix galericulata</i>	Orofaringeano
CA07T	<i>Aix galericulata</i>	Orofaringeano
CA07C	<i>Aix galericulata</i>	Cloacal
CA09T	<i>Aix sponsa</i>	Orofaringeano
CA11T	<i>Aix galericulata</i>	Orofaringeano
CA13T	<i>Aix galericulata</i>	Orofaringeano
CA14T	<i>Aix galericulata</i>	Orofaringeano
CA14C	<i>Aix galericulata</i>	Cloacal
CA18T	<i>Chenonetta jubata</i>	Orofaringeano
A01T	<i>Aix galericulata</i>	Orofaringeano
A18C	<i>Aratinga leucophthalma</i>	Cloacal
A20T	<i>Aratinga leucophthalma</i>	Orofaringeano
A20C	<i>Aratinga leucophthalma</i>	Cloacal
A23C	<i>Aratinga leucophthalma</i>	Cloacal
A24T	<i>Aratinga leucophthalma</i>	Orofaringeano
A31T	<i>Ara chloropterus</i>	Orofaringeano
A32C	<i>Ara chloropterus</i>	Cloacal

Fonte: Simão, 2017.

4.9 PRÉ-TRATAMENTO DAS AMOSTRAS PARA O SEQUENCIAMENTO NGS

Duas amostras positivas pelo RRT-PCR foram selecionadas para a realização do NGS. Uma das amostras (CA11T – 4ª passagem), proveniente de um pool de amostras de suabes orofaríngeos da espécie *Aix galericulata*, era positiva para os vírus da bronquite infecciosa e o vírus de Newcastle. A outra amostra (ganso OP – 2ª passagem) selecionada se tratava de um suabe orofaríngeo coletado de uma ave (*Anser anser*) positiva para o vírus da doença de Newcastle. As amostras foram pré-tratadas independentemente, para evitar possível contaminação conforme protocolo descrito previamente em outro estudo (VAN BORM et al., 2016). O pré-tratamento foi dividido em duas etapas de purificação, uma física e outra química. Na primeira etapa, as amostras foram centrifugadas por 2 minutos a 8000g a 4°C, após, o sobrenadante foi filtrado em filtros de 0,45µm. Na segunda etapa as amostras foram submetidas a um tratamento com nuclease, usando o kit Turbo DNase (Ambion): 100µl da amostra filtrada, Turbo DNase (50U) e tampão 10X (1X) e depois incubadas por 1 hora a 37°C. Após o pré-tratamento das amostras, foi realizada a extração de RNA com o reagente TRIzol (Ambion – Life Technologies) para o rompimento das células seguido de 5 minutos de incubação em temperatura ambiente. Após, foi acrescido clorofórmio para ocorrer a separação das camadas orgânica, interfase e aquosa (RNA presente), seguido de outra incubação por 5 minutos em temperatura ambiente. Depois de uma centrifugação por 15 minutos a 12.000g a 4°C, a fase aquosa contendo o RNA, foi coletada e prosseguiu-se com os passos de uma extração de RNA regular usando o kit QIAamp RNA Mini (Qiagen). Os RNAs após esta etapa foram quantificados pelo espectrofotômetro DeNovix DS-11 (DeNovix Inc) e pelo fluorímetro Qubit (Invitrogen).

4.10 PREPARO DAS BIBLIOTECAS

A síntese de cDNA foi realizada a partir dos RNAs quantificados no item anterior com o kit SuperScript IV First-Strand cDNA Synthesis (Invitrogen, Carlsbad, EUA). A síntese do cDNA em dsDNA foi realizada utilizando o kit mRNA second strand synthesis (New England Biolabs, EUA). As bibliotecas foram preparadas com o kit NEXtera XT sample preparation (Illumina, EUA) e marcadas com os adaptadores do kit NEXtera XT index. Para avaliar a qualidade das bibliotecas, foi realizada a quantificação das bibliotecas preparadas com o kit SYBR FAST qPCR Master Mix (Kapa, USA) e DNA de referência para a quantificação). Foi realizado o preparo de um pool com todas as bibliotecas na concentração de 4nM e as bibliotecas foram denaturadas com o kit v3 600 ciclos (Illumina, EUA) com a concentração de 20pM para sequenciamento no equipamento MiSeq (Illumina, EUA). O sequenciamento foi realizado no Hemocentro, Ribeirão Preto.

4.11 ANÁLISE DE DADOS E ANÁLISE FILOGENÉTICA

Os arquivos FASTQ foram submetidos ao programa Geneious (versão 10.0.6) para o mapeamento sobre a amostra de referência (AY.31651) e obtenção das sequências consenso (KEARSE et al., 2012). As sequências foram alinhadas utilizando o programa Bioedit Sequence Alignment Editor versão 7.1.11 (HALL, 1999) e manipuladas utilizando o programa Clustal W (THOMPSON; HIGGINS; GIBSON, 1994) no programa MEGA versão 6.0 (TAMURA et al., 2013) e a similaridade das sequências foram comparadas com sequências depositadas no GenBank descritas nos Quadro 4 e 5. (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome). As análises filogenéticas foram realizadas de acordo com o método Maximum Likelihood como implementado pelo programa Tree finder (OKINO et al., 2014) e MEGA 6.0 (TAMURA et al., 2013). As árvores consenso foi inferidas com 1000 replicas (FELSENSTEIN, 1985). As árvores foram editadas no programa FigTree v1.4.2.

Quadro 3. Número de acesso das amostras utilizadas para análise filogenética da amostra CA11T

Número de Acesso	Nome da Amostra
DQ834384.1	Infectious bronchitis virus strain M41
NC001451.1	Avian infectious bronchitis virus
DQ646405.2	Infectious bronchitis virus isolate TW2575/98
KT203557.1	Infectious bronchitis virus isolate B17
AY514485.1	Infectious bronchitis virus serotype California 99
EU817497.1	Infectious bronchitis virus strain H52
EU525388.1	Infectious bronchitis virus strain A2
KR231009.1	Infectious bronchitis virus strain B1648
JF732903.1	Infectious bronchitis virus strain Sczy3
GU393338.1	Infectious bronchitis virus serotype JMK
GU393337.1	Infectious bronchitis virus serotype Iowa 97
GU393336.1	Infectious bronchitis virus serotype Holte
GU393335.1	Infectious bronchitis virus serotype H120
GU393334.1	Infectious bronchitis virus serotype Gray
GU393333.1	Infectious bronchitis virus serotype FL18288
GU393332.1	Infectious bronchitis virus serotype Delaware 072
KF460437.1	Infectious bronchitis virus isolate VicS-v
DQ834384.1	Infectious bronchitis virus strain M41

Fonte: Simão, 2017.**Quadro 4.** Número de acesso das amostras utilizadas para análise filogenética da amostra GANSO OP

Número de Acesso	Nome da Amostra
DQ834384.1	Infectious bronchitis virus strain M41
KX258195.1	Avian coronavirus isolate 23/2013
GU393337.1	Infectious bronchitis virus serotype Iowa97
GU393336.1	Infectious bronchitis virus serotype Holte
FJ904715.1	Infectious bronchitis virus strain Cal557 2003
DQ490206.1	Infectious bronchitis virus strain N1-62
GU393338.1	Infectious bronchitis virus serotype JMK
GU393334.1	Infectious bronchitis virus serotype Gray
DQ490215.1	Infectious bronchitis virus strain V2-02
KF377577.1	Infectious bronchitis virus strain 4/91 vaccine
FN430415.1	Infectious bronchitis virus NGA/A116E7/2006
KF696629.1	Infectious bronchitis virus strain Connecticut vaccine
FJ904719.1	Infectious bronchitis virus strain Conn46_1991
DQ160004.1	Pigeon coronavirus strain PSH050513
KR608272.1	Infectious bronchitis virus isolate LDT3-A
GQ504721.2	Infectious bronchitis virus strain Arkansas Vaccine
DQ646405.2	Infectious bronchitis virus isolate TW2575/98
AY646283.1	Avian infectious bronchitis virus partridge/GD/S14/2003
EU359649.1	Infectious bronchitis virus strain ArkDPI-derived commercial vaccine C

Fonte: Simão, 2017.

5 RESULTADOS

5.1 DETECÇÃO DAS AMOSTRAS

O total de 300 amostras testadas é formado por 147 (49%) suabes orofaríngeas e 153 (51%) de suabes cloacais, coletados de aves pertencentes a ordens dos *Anseriformes* (158/52,67%), *Psittaciformes* (84/28%), *Strigiformes* (36/12%), *Piciformes* (16/5,34%), *Falconiformes* (4/1,33%) e *Cariamiformes* (2/0,66%). No total, 27 amostras foram positivas, sendo algumas em forma de pool e outras em forma individual, para o teste de RRT-PCR para VBI. Das amostras detectadas, 13 pools (36,07%) das amostras de *Anseriformes*, 10 (11,94%) de *Psittaciformes*, 1 (2,77%) de *Strigiformes*, 2 (50%) de *Falconiformes*. Os animais das ordens *Piciformes* e *Cariamiformes* não apresentaram resultados positivos. Os resultados obtidos pelo teste de RRT-PCR das amostras positivas para VBI estão descritos detalhadamente no quadro 3.

Quadro 5. Amostras positivas no RRT-PCR para VBI separadas por Ordem animal

Ordem	Espécie	Tipo de Suabe	Ct	Local de Coleta
<i>Anseriformes</i>	<i>Aix galericulata</i>	Orofaringeano	37.80	PE
	<i>Aix galericulata</i>	Orofaringeano	32.43	CA *
	<i>Aix galericulata</i>	Orofaringeano	34.69	CA*
	<i>Aix galericulata</i>	Orofaringeano	36.54	CA*
	<i>Aix galericulata</i>	Cloacal	34.65	CA*
	<i>Aix galericulata</i>	Orofaringeano	36.50	CA*
	<i>Aix galericulata</i>	Orofaringeano	34.41	CA*
	<i>Aix galericulata</i>	Cloacal	36.24	CA*
	<i>Aix galericulata</i>	Orofaringeano	36.75	CA*
	<i>Aix galericulata</i>	Orofaringeano	37.37	CA*
	<i>Aix galericulata</i>	Orofaringeano	37.70	CA*
	<i>Aix galericulata</i>	Cloacal	36.56	CA*
	<i>Aix sponsa</i>	Orofaringeano	36.04	CA*
	<i>Chenonetta jubata</i>	Cloacal	38.95	CA*
<i>Psittaciformes</i>	<i>Aratinga leucophtalma</i>	Orofaringeano	36.60	PE
	<i>Aratinga leucophtalma</i>	Orofaringeano	37.57	PE
	<i>Aratinga leucophtalma</i>	Cloacal	35.89	PE
	<i>Aratinga leucophtalma</i>	Cloacal	36.67	PE
	<i>Aratinga leucophtalma</i>	Orofaringeano	37.62	PE
	<i>Aratinga leucophtalma</i>	Orofaringeano	37.98	AMC

	<i>Aratinga leucophthalma</i>	Cloacal	36.13	AMC
	<i>Amazona aestiva</i>	Orofaringeano	34.76	AMC
	<i>Ara chloropterus</i>	Orofaringeano	38.24	PE
	<i>Ara chloropterus</i>	Cloacal	37.49	PE
<i>Strigiformes</i>	<i>Megascops choliba</i>	Orofaringeano	37.32	AMC
<i>Falconiformes</i>	<i>Falco sparverius</i>	Orofaringeano	37.99	AMC
	<i>Falco sparverius</i>	Cloacal	34.88	AMC

Fonte: Simão, 2017.

*= Amostras testadas em forma de pools. **Ct:** Cycle Threshold.

Local de Coleta: (PE) Pq. Ecológico Eng. Cid Almeida Franco, (CA) Casa das Aves e (AMC) Associação Mata-Ciliar.

As amostras positivas no RRT-PCR foram testadas no RT-PCR convencional, no entanto, provavelmente pela baixa carga viral presente nestas amostras, não foi observada amplificação do material genético (Figura 6).

Figura 6. Gel de agarose 1,5% das amostras positivas pelo teste específico de RRT-PCR para detecção de VBI foram testadas pelo teste RT-PCR convencional

Fonte: Simão, 2017.

A1 – Marcador, 2 – Controle negativo, 3 – Controle positivo, 4 – AMC 9T, 5 – AMC 28T, 6 – AMC 28C, 7 – AMC 33T, 8 – CA14T, 9 – CA02T, 10 – CA09T.; B) 1 – Marcador, 2 – Controle positivo, 3 – Controle negativo, 4 – CA02T, 5 – CA09T, 6 – CA11T.; C) 1 – Marcador, 2 – Controle positivo, 3 – Controle negativo, 4 – A01T, 5 – A18C, 6 – A20T, 7 – A20TII, 8 – A20C, 9 – A23C, 10 – A24T, 11 – A31T, 12 – A32C.

5.2 SEQUENCIAMENTO DAS AMOSTRAS

A amostra CA11T foi selecionada e submetida para o sequenciamento NGS, esta amostra era positiva para VBI e NDV nos testes de RRT-PCR. Uma

outra amostra de um ganso, Ganso OP (*Anser anser*) positiva para NDV, também foi submetida ao NGS, e surpreendentemente foi detectado o VBI. Ambas as amostras apresentaram coinfecção com os vírus de VBI e NDV.

A amostra CA11T apresentou 1.353.162 leituras, que foram mapeadas em cima da sequência de referência AY.31651, para a tentativa de montagem do genoma do VBI, o resultado obtido a partir do programa GENEIOUS apresentou 69 leituras, correspondentes ao VBI.

A amostra Ganso OP apresentou 1.640.612 leituras, que também foram mapeadas utilizando a sequência AY.31651 como referência, com um resultado final de 31.419 leituras correspondentes ao VBI.

5.3 ANÁLISE FILOGENÉTICA

Para a análise filogenética da amostra CA11T (Figura 7A), foi utilizado o fragmento de 492bp correspondente à região entre os nucleotídeos 13781-14273 do gene RdRp (ZHANG et al., 2010). Esta amostra de *Aix galericulata*, não vacinado, apresentou identidade de 99% na região do gene RdRp com as sequências H120 (GU393335.1), Delaware 072 (GU393332.1) e B17 (KT203557.1).

Figura 7. Análise Filogenética das amostras CA11T e Ganso OP pelo método Maximum Likelihood

A. Amostra CA11T nomeada de IBV/Aix galericulada/Brazil/Pirassununga/2016/CA11T●. Análise filogenética inferida utilizando o método de máxima verossimilhança e bootstrap de 1000 réplicas, baseado no modelo de Tamura-nei. A árvore com maior probabilidade de log (-1747.0335) é mostrada. A porcentagem de árvores nas quais as amostras se agrupam é mostrada ao lado dos

ramos. As árvores iniciais para a pesquisa heurística foram obtidas automaticamente aplicando algoritmos Neighbor-Join e BioNJ a uma matriz de distâncias emparelhadas estimadas usando a abordagem de Máxima Probabilidade Composta (MCL) e selecionando a topologia com o valor de verossimilhança logaritmica superior. A análise envolveu 18 sequências de nucleotídeos. Houve um total de 492 posições no conjunto final de dados. As análises foram feitas utilizando o MEGA7. **B.** Amostra ganso OP nomeada como IBV/Anser anser/Brazil/Jundia-SP/2016/ganso OP ● destacada em vermelho. Análise filogenética inferida utilizando o método de máxima verossimilhança e bootstrap de 1000 réplicas, baseado no modelo de Tamura-nei. A árvore com maior probabilidade de log (-4797.8585) é mostrada. A porcentagem de árvores nas quais as amostras se agrupam é mostrada ao lado dos ramos. As árvores iniciais para a pesquisa heurística foram obtidas automaticamente aplicando algoritmos Neighbor-Joining e BioNJ a uma matriz de distâncias emparelhadas estimadas usando a abordagem de Máxima Probabilidade Composta (MCL) e selecionando a topologia com o valor de verossimilhança logaritmica superior. A análise envolveu 20 sequências de nucleotídeos. Houve um total de 873 posições no conjunto final de dados. As análises foram feitas utilizando o MEGA7.

A análise filogenética da amostra Ganso OP (Figura 7B) foi realizada utilizando 873 nt do fragmento entre a posição de 21.476nt a 22.349nt correspondente ao gene S2 do VBI (ZHANG et al., 2010). Esta amostra apresentou identidade de 100% na região do gene S2 com a sequência 23/2013 (BRANDAO et al., 2016).

6 DISCUSSÃO

O VBI é conhecido como um vírus de rápida dispersão e que acomete rapidamente aves que não foram imunizadas (DE WITT; COOK; VAN DER, 2010). Este vírus apresenta uma grande gama de estirpes geneticamente distintas, o que torna o seu controle desafiador (CAVANAGH, 2007).

De acordo com a literatura, o teste de RRT-PCR para o gene UTR de IBV é um teste extremamente sensível e específico para a detecção do VBI e pode ser utilizado como uma rápida ferramenta para detecção e diferenciação de outros patógenos respiratórios possivelmente envolvidos em surtos (CALLISON et al., 2006). Nossos resultados demonstram um grande número de amostras positivas para o VBI no teste de RRT-PCR em amostras de diversas origens como centros de triagem, zoológicos e criatórios comerciais, o que nos mostra que o vírus continua circulando. No entanto, a detecção pelo RT-PCR não foi possível, mesmo após consecutivas passagens em ovos embrionados,

provavelmente devido à baixa carga viral presente nestas amostras. A dinâmica de excreção viral em aves silvestres demonstra que a frequência de eliminação dos vírus pode variar entre diferentes as diferentes espécies, recentemente um estudo realizado com Influenza Aviária de Baixa Patogenicidade (LPAI) indica que a eliminação dos vírus ocorre de maneira variável. Interessantemente, também foi observado que a amostra H7N3 apresentava baixa infectividade, talvez pela baixa adaptação aos ovos embrionados e permissividade do hospedeiro frente a amostra (COSTA et al., 2011).

Durante muitos anos acreditou-se que o único hospedeiro do VBI fosse o *Gallus gallus*, no entanto, diversos trabalhos têm detectado a presença destes vírus em aves silvestres de vida livre e de cativeiro (CAVANAGH et al., 2002). Nas últimas décadas os coronavírus aviários foram detectados em aves de diversas ordens como *Anseriformes*, *Charadriiformes*, *Galliformes*, *Columbiformes*, *Passeriformes*, *Pelacaniformes*, *Ciconiiformes* e *Pssitaciformes* (JONASSEN et al., 2005; CULVER; BRITTON; CAVANAGH, 2008; HUGHES et al., 2009; MURADRASOLI et al., 2009; DOMANSKA-BLICHAZ et al., 2010; FELIPPE et al., 2010; TARNAGDA et al., 2011). Nossos resultados demonstraram amostras positivas oriundas de quatro ordens, *Anseriformes*, *Psittaciformes*, *Strigiformes* e *Falconiformes*, e um total de 8 espécies diferentes. Nossos resultados reiteram a circulação de coronavírus aviários em aves silvestres.

A presença do VBI foi detectada principalmente em suabes orofaríngeas, o que demonstra que o vírus foi detectado principalmente na cavidade oral destas aves. A replicação do VBI ocorre principalmente em células epiteliais do trato respiratório superior, inicialmente nas células ciliadas da traqueia, e por este motivo, as partículas virais podem ser encontradas com maior facilidade em amostras em amostras coletadas do trato respiratório (DHINAKAR; JONES, 1997). Outro fator que pode ter influenciado na dificuldade de detecção e isolamento do VBI em amostras de suabes cloacais pode estar relacionada ao fato de que amostras cloacais podem apresentar uma grande quantidade de fatores de inibição de PCR, e que a quantidade e tipo de inibidor encontrado em amostras de aves silvestres pode variar de acordo com a dieta, habitat e localização geográfica (DAS et al., 2009).

O comércio ilegal de aves silvestres não apresenta risco somente no âmbito de conservação das espécies, mas também um risco de disseminação de diversos patógenos, que podem resultar em surtos de enfermidades que geram grandes perdas econômicas ou doenças com potencial zoonótico (KARESH et al., 2005). A amostra proveniente de um exemplar da espécie *Amazona aestiva*, positiva para o teste de RRT-PCR para VBI, foi coletada de uma ave apreendida por fiscais da polícia ambiental em um local onde outras aves estavam armazenadas e seriam posteriormente comercializadas no mercado ilegal. Nossos achados corroboram com o fato de que o comércio ilegal de aves se tornou um potencial meio de disseminação de patógenos. Vale ressaltar que o comércio ilegal de animais silvestres mundial cresceu muito nos últimos anos e é considerado o segundo maior mercado ilegal, que movimenta quantias entre 5-20 bilhões de dólares anualmente, ficando atrás apenas do mercado ilegal de drogas (WYLER; SHEIKH, 2008).

Interessantemente, amostras coletadas de aves comercializadas como aves ornamentais também foram positivas para o VBI. A amostra CA11T, apresentou alta identidade com amostras reconhecidas como potenciais receptoras de recombinações adquiridas horizontalmente, neste estudo também foi demonstrado que as recombinações ocorrem por todo genoma do VBI (THOR et al., 2011). Esta amostra também apresentou alta identidade com uma amostra isolada de aves de produção na Índia (KIRUBAHARAN et al., 2015) o que levanta a questão sobre como a imunização com vacinas atenuadas é realizada atualmente, uma vez que claramente, estirpes vacinais recombinadas com amostras de campo estão circulando em aves silvestres e de produção.

A amostra Ganso OP, apresentou alta identidade com isolados de aves de produção (BRANDAO et al., 2016), embora não haja informações sobre a vacinação desta aves. O gene S2 é conservado nos coronavírus, principalmente quando comparado com o gene S1, onde estão localizadas as três regiões hipervariáveis (CAVANAGH et al., 1992; KANT, 1992). Em ambas amostras sequenciadas, não houve cobertura da subunidade S1 do gene S, sendo esta a principal região utilizada para a caracterização dos VBI (VALASTRO et al., 2016). Possivelmente por este motivo observou-se baixa diversidade quando comparada a outras amostras.

O sequenciamento NGS, se mostrou uma ótima ferramenta para o sequenciamento de amostras, mesmo que com baixa carga viral, uma vez que, foi possível sequenciar alguns fragmentos do VBI de amostras positivas no RRT-PCR, mas que não eram detectadas no RT-PCR. Atualmente o NGS tem aberto novos horizontes para o sequenciamento de material genético, no entanto, seu alto custo é um fator limitante para alguns laboratórios (RADFORD et al., 2012).

Com a aplicação do sequenciamento de alto desempenho também conseguimos detectar a presença de mais de um vírus nestas amostras. A detecção de mais de um vírus em amostras de aves silvestres foi descrita anteriormente em *Anseriformes*, no qual algumas aves apresentaram co-infecção com dois ou até três vírus com os vírus da doença de Newcastle, vírus da bronquite infecciosa e/ou vírus da influenza aviária (WILLE et al., 2015). Estas co-infecções podem afetar a dinâmica de replicação destes vírus, assim como a resposta imune gerada pelo hospedeiro frente a infecção com vírus com características distintas (FRANCA et al., 2014).

7 CONCLUSÕES

O presente estudo demonstrou a presença do VBI em aves silvestres de cativeiro por meio da detecção molecular com RRT-PCR. As amostras detectadas pelo RRT-PCR possuíam baixa carga viral e mesmo após consecutivas passagens não foi possível realizar o sequenciamento sanger. As amostras sequenciadas pelo método de alto desempenho apresentaram alta similaridade com outras amostras de VBI depositadas no Genbank. A análise filogenética do gene RdRp de uma das amostras demonstrou uma alta identidade com a amostra vacinal, em uma ave que não foi imunizada, o que levanta a hipótese de que eventos de *spillover* de estirpes vacinais ocorrem e podem estar relacionados com a disseminação do VBI. A amostra Ganso OP apresentou alta identidade com uma amostra detectada em uma ave de produção, o que demonstra que estirpes vacinais utilizadas na imunização destas aves circulam em aves silvestres e de produção de subsistência. Ambas amostras apresentaram co-infecção com os vírus da doença de Newcastle (NDV) e vírus da bronquite infecciosa (VBI). O sequenciamento de alto desempenho (NGS) demonstrou ser uma ótima ferramenta para detecção de mais de um vírus em uma amostra. Novos estudos deverão ser realizados afim do sequenciamento completo do gene S1 destas amostras para a caracterização do genótipo envolvido.

8 REFERÊNCIAS

AL-SHEKAILI, T.; BAYLIS, M.; GANAPATHY, K. Molecular detection of infectious bronchitis and avian metapneumoviruses in Oman backyard poultry. **Research in veterinary science**, v. 99, n., p. 46-52, 2015.

ALEXANDER, D. J. An overview of the epidemiology of avian influenza. **Vaccine**, v. 25, n. 30, p. 5637-5644, 2007.

ARMESTO, M.; CAVANAGH, D.; BRITTON, P. The replicase gene of avian coronavirus infectious bronchitis virus is a determinant of pathogenicity. **PLoS One**, v. 4, n. 10, p. e7384, 2009.

BAYRY, J.; GOUDAR, M. S.; NIGHOT, P. K.; KSHIRSAGAR, S. G.; LADMAN, B. S.; GELB, J., JR.; GHALSASI, G. R.; KOLTE, G. N. Emergence of a nephropathogenic avian infectious bronchitis virus with a novel genotype in India. **J Clin Microbiol**, v. 43, n. 2, p. 916-918, 2005.

BELOUZARD, S.; MILLET, J. K.; LICITRA, B. N.; WHITTAKER, G. R. Mechanisms of Coronavirus Cell Entry Mediated by Viral Spike Protein. **Viruses**, v. 4, n., p. 1011-1033, 2012.

BIJLENGA, G.; COOK, J. K.; GELB, J., JR.; DE WIT, J. J. Development and use of the H strain of avian infectious bronchitis virus from the Netherlands as a vaccine: a review. **Avian Pathol**, v. 33, n. 6, p. 550-557, 2004.

BOCHKOV, Y. A.; TOSI, G.; MASSI, P.; DRYGIN, V. V. Phylogenetic analysis of partial S1 and N gene sequences of infectious bronchitis virus isolates from Italy revealed genetic diversity and recombination. **Virus Genes**, v. 35, n. 1, p. 65-71, 2007.

BOSCH, B. J.; VAN DER ZEE, R.; DE HAN, C. A. M.; ROTTIER, P. J. The Coronavirus Spike Protein is a Class I Virus Fusion Protein: Structural and Functional Characterization of the Fusion Core Complex. **J Virol**, v. 77, n. 16, p. 8801-8811, 2003.

BRANDAO, P. E.; AYRES, G. R.; TORRES, C. A.; VILLAREAL, L.; HORA, A. S.; TANIWAKI, S. A. First complete genome of a Brazil type Avian coronavirus / Avian infectious bronchitis virus IBV. **GenBank KX258195.1**, v., n., p., 2016.

BRANDÃO, P. E.; LOVATO, L. T.; SLHESSARENKO, R. D. Coronaviridae. In: Flores, E. F. (Ed.). **Virologia Veterinária**. Santa Maria: editora UFSM, 2012, p.715-736.

BRYAN, M. Coronavírus Aviário. In: Revolledo, L. e Ferreira, A. J. (Ed.). **Patologia Aviária**. São Paulo: Manole, 2009. v.1, p.172-177.

CALLISON, S. A.; HILT, D. A.; BOYNTON, T. O.; SAMPLE, B. F.; ROBISON, R.; SWAYNE, D. E.; JACKWOOD, M. W. Development and evaluation of a real-time Taqman RT-PCR assay for the

detection of infectious bronchitis virus from infected chickens. **Journal of Virological Methods**, v. 138, n., p. 60-65, 2006.

CARDOSO, T. C.; TEIXEIRA, M. C.; GOMES, D. E.; JEREZ, A. J. Genetically diverse coronaviruses in captive bird populations in a Brazilian zoological park. **Vector borne and zoonotic diseases**, v. 11, n. 2, p. 165-168, 2011.

CAVANAGH, D.; DAVIS, P. J.; COOK, J. K.; LI, D.; KANT, A.; KOCH, G. Location of the amino acid differences in the S1 spike glycoprotein subunit of closely related serotypes of infectious bronchitis virus. **Avian Pathol**, v. 21, n. 1, p. 33-43, 1992.

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

CAVANAGH, D.; MAWDITT, K.; WELCHMAN DDE, B.; BRITTON, P.; GOUGH, R. E. Coronaviruses from pheasants (*Phasianus colchicus*) are genetically closely related to coronaviruses of domestic fowl (infectious bronchitis virus) and turkeys. **Avian Pathol**, v. 31, n. 1, p. 81-93, 2002.

CAVANAGH, D.; NAQI, S. A. Infectious Bronchitis. In: (Ed.). **Diseases of Poultry**. Ames: Iowa State University Press, 2003, p.101-119.

CAVANAGH, D.; PICAULT, J. P.; GOUGH, R.; HESS, M.; MAWDITT, K.; BRITTON, P. Variation in the spike protein of the 793/B type of infectious bronchitis virus, in the field and during alternate passage in chickens and embryonated eggs. **Avian Pathol**, v. 34, n. 1, p. 20-25, 2005.

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

CAVANAGH, D. Coronavirus avian infectious bronchitis virus. **Vet Res**, v. 38, n. 2, p. 281-297, 2007.

CAVANAGH, D.; GELB JR., J. Infectious bronchitis. In: Y.M., S., Fadly, A. M., *et al* (Ed.). **Diseases of Poultry**. Ames: Blackwell Publishing, 2008. v.1, p.117-135.

CHA, R. M.; YU, Q.; ZSAK, L. The pathogenicity of avian metapneumovirus subtype C wild bird isolates in domestic turkeys. **Viro J**, v. 10, n., p. 38, 2013.

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

CHEN, G. Q.; ZHUANG, Q. Y.; WANG, K. C.; LIU, S.; SHAO, J. Z.; JIANG, W. M.; HOU, G. Y.; LI, J. P.; YU, J. M.; LI, Y. P.; CHEN, J. M. Identification and survey of a novel avian coronavirus in ducks. **PLoS One**, v. 8, n. 8, p. e72918, 2013.

CHU, D. K.; LEUNG, C. Y.; GILBERT, M.; JOYNER, P. H.; NG, E. M.; TSE, T. M.; GUAN, Y.; PEIRIS, J. S.; POON, L. L. Avian coronavirus in wild aquatic birds. **J Virol**, v. 85, n. 23, p. 12815-12820, 2011.

CHU, V. C.; MCELROY, L. J.; CHU, V.; BAUMAN, B. E.; WHITTAKER, G. R. The Avian Coronavirus Infectious Bronchitis Virus Undergoes Direct Low-pH-Dependent Fusion Activation during Entry into Host Cells. **Journal of Virology**, v. 80, n. 7, p. 3180-3188, 2006.

COLVERO, L. P.; VILLAREAL, L.; TORRES, C. A.; BRANDAO, P. E. Assessing the economic burden of avian infectious bronchitis on poultry farms in Brazil. **Rev Sci Tech**, v. 34, n. 3, p. 993-999, 2015.

COOK, J.; DE WIT, J. J.; DOLZ, R.; JACKWOOD, M. W. Summaries of the sessions: Avian Coronaviruses Epidemiology. **8th International Symposium on Avian Corona- and Pneumoviruses and Complicating Pathogens**, v., n., p., 2014.

COSTA, T. P.; BROWN, J. D.; HOWERTH, E. W.; STALLKNECHT, D. E. Variation in viral shedding patterns between different wild bird species infected experimentally with low-pathogenicity avian influenza viruses that originated from wild birds. **Avian Pathology**, v. 40, n. 2, p. 119-124, 2011.

CUBILLOS, A. Bronquite Infecciosa Aviária. In: Revolledo, L. e Ferreira, A. J. (Ed.). **Patologia Aviária**. São Paulo: Manole, 2009. v.1, p.158-171.

CULVER, F. A.; BRITTON, P.; CAVANAGH, D. RT-PCR detection of avian coronaviruses of galliform birds (chicken, turkey, pheasant) and in a parrot. **Methods Mol Biol**, v. 454, n., p. 35-42, 2008.

DAS, A.; SPACKMAN, E.; PANTIN-JACKWOOD, M.; SUAREZ, D. L. Removal of real-time reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) inhibitors associated with cloacal swab samples and tissues for improved diagnosis of Avian influenza virus by RT-PCR. **J Vet Diagn Invest**, v. 21, n., p. 771-778, 2009.

DE GROOT, R. J.; BAKER, S. C.; BARIC, R. S.; BROWN, C. S.; DROSTEN, C.; ENJUANES, L.; FOUCHIER, R. A.; GALIANO, M.; GORBALENYA, A. E.; MEMISH, Z. A.; PERLMAN, S.; POON, L. L.; SNIJDER, E. J.; STEPHENS, G. M.; WOO, P. C.; ZAKI, A. M.; ZAMBON, M.; ZIEBUHR, J. Middle East respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV): announcement of the Coronavirus Study Group. **J Virol**, v. 87, n. 14, p. 7790-7792, 2013.

DE WITT, J. J.; COOK, J. K. A.; VAN DER, H. M. J. F. Infectious bronchitis virus in Asia, Africa, Australia and Latin America-history, current situation and control measures. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, v. 12, , n., p. 97-106, 2010.

DECARO, N. Gammacoronavirus - Coronaviridae. In: Tidona, C. e Darai, G. (Ed.). **The Springer Index of Viruses**. New York: Springer New York, 2011, p.403-413.

DHINAKAR, G.; JONES, R. Infectious bronchitis virus: immunopathogenesis of infection in the chicken. **Avian Pathol**, v. 26, n. 4, p. 677-706, 1997.

DI FABIO, J.; BUITRAGO, L. Y. V. Bronquite Infecciosa das Galinhas. In: Junior, A. B., Silva, E. N., *et al* (Ed.). **Doença das Aves**. Campinas: FACTA, 2009. v.1, p.631-647.

DOLZ, R.; PUJOLS, J.; ORDONEZ, G.; PORTA, R.; MAJO, N. Molecular epidemiology and evolution of avian infectious bronchitis virus in Spain over a fourteen-year period. **Virology**, v. 374, n. 1, p. 50-59, 2008.

DOMANSKA-BLICHAZ, K.; MINTA, Z.; SMIETANKA, K.; MARCHE, S.; VAN DEN BERG, T. H5N1 high pathogenicity avian influenza virus survival in different types of water. **Avian Dis**, v. 54, n. 1 Suppl, p. 734-737, 2010.

DOMANSKA-BLICHAZ, K.; JACUKOWICZ, A.; LISOWSKA, A.; WYROSTEK, K.; MINTA, Z. Detection and molecular characterization of infectious bronchitis-like viruses in wild bird populations. **Avian Pathol**, v., n., p. 1-8, 2014.

DONG, B. Q.; LIU, W.; FAN, X. H.; VIJAYKRISHNA, D.; TANG, X. C.; GAO, F.; LI, L. F.; LI, G. J.; ZHANG, J. X.; YANG, L. Q.; POON, L. L.; ZHANG, S. Y.; PEIRIS, J. S.; SMITH, G. J.; CHEN, H.; GUAN, Y. Detection of a novel and highly divergent coronavirus from asian leopard cats and Chinese ferret badgers in Southern China. **J Virol**, v. 81, n. 13, p. 6920-6926, 2007.

FABRICANT, J. Studies on the diagnosis of Newcastle disease and infectious bronchitis. IV. The use of the serum neutralization test in the diagnosis of infectious bronchitis. **Cornell Vet**, v. 41, n. 1, p. 68-80, 1951.

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

FELIPPE, P. A.; DA SILVA, L. H.; SANTOS, M. M.; SPILKI, F. R.; ARNS, C. W. Genetic diversity of avian infectious bronchitis virus isolated from domestic chicken flocks and coronaviruses from feral pigeons in Brazil between 2003 and 2009. **Avian Dis**, v. 54, n. 4, p. 1191-1196, 2010.

FELSENSTEIN, J. Confidence-Limits on Phylogenies - an Approach Using the Bootstrap. **Evolution**, v. 39, n. 4, p. 783-791, 1985.

FRAGA, A. P.; BALESTRIN, E.; IKUTA, N.; FONSECA, A. S.; SPILKI, F. R.; CANAL, C. W.; LUNGE, V. R. Emergence of a new genotype of avian infectious bronchitis virus in Brazil. **Avian Dis**, v. 57, n. 2, p. 225-232, 2013.

FRANCA, M.; HOWERTH, E. W.; CARTER, D.; BYAS, A.; POULSON, R.; AFONSO, C. L.; STALLKNECHT, D. Co-infection of mallards with low-virulence Newcastle disease virus and low-pathogenic avian influenza virus. **Avian Pathol**, v. 43, n. 1, p. 96-104, 2014.

GALLAGHER, T. M.; BUCHMEIERT, M. J. Coronavirus Spike Proteins in Viral Entry and Pathogenesis. **Virology**, v., n. 279, p. 371-374, 2001.

GELB JR, J.; WEISMAN, Y.; LADMAN, B. S.; MEIR, R. S1 gene characteristics and efficacy of vaccination against infectious bronchitis virus field isolates from United States and Israel (1996 to 2000). **Avian Pathol**, v. 34:3, n., p. 194-203, 2005.

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, n., p. 95-98, 1999.

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

HU, B.; GE, X.; WANG, L.-F.; SHI, Z. Bat origin of human coronaviruses. **Virol J**, v. 1, n., p. 1-10, 2015.

HUGHES, L. A.; SAVAGE, C.; NAYLOR, C.; BENNETT, M.; CHANTREY, J.; JONES, R. Genetically diverse coronaviruses in wild bird populations of northern England. **Emerg Infect Dis**, v. 15, n. 7, p. 1091-1094, 2009.

ICTV. **Virus taxonomy: classification and nomenclature of viruses: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses**. San Diego: Elsevier Academic Press, 2014

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

JACKWOOD, M. W.; HALL, D.; HANDEL, A. Molecular evolution and emergence of avian gammacoronaviruses. **Infect Genet Evol**, v. 12, n. 6, p. 1305-1311, 2012.

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

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

JONASSEN, C. M.; KOFSTAD, T.; LARSEN, I. L.; LOVLAND, A.; HANDELAND, K.; FOLLESTAD, A.; LILLEHAUG, A. Molecular identification and characterization of novel coronaviruses infecting

graylag geese (*Anser anser*), feral pigeons (*Columbia livia*) and mallards (*Anas platyrhynchos*). **J Gen Virol**, v. 86, n. Pt 6, p. 1597-1607, 2005.

JUNGHERR, E. I.; CHOMIAK, T. W.; LUGINBUHL, R. E. Immunologic differences in strains of infectious bronchitis virus. In: 60th Annual Meeting US Livestock Sanitary Association, 1956, Chicago, Illinois, p. 203-209.

KANT, A. Location of antigenic sites defined by neutralizing monoclonal antibodies on the S1 avian infectious bronchitis virus glycopolyptide. **Journal of General Virology**, v. 73, n., p. 591-596, 1992.

KARESH, W. B.; COOK, R. A.; BENNETT, E. L.; NEWCOMB, J. Wildlife Trade and Global Disease Emergence. **Emerg Infect Dis**, v. 11, n. 7, p. 1000-1002, 2005.

KEARSE, M.; MOIR, R.; WILSON, A.; STONES-HAVAS, S.; CHEUNG, M.; STURROCK, S.; BUXTON, S.; COOPER, A.; MARKOWITZ, S.; DURAN, C.; THIERER, T.; ASHTON, B.; MENTJIES, P.; DRUMMOND, A. Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. **Bioinformatics**, v. 28, n. 12, p. 1647-1649, 2012.

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

KIM, H. R.; OEM, J. K. Surveillance of avian coronaviruses in wild bird populations of Korea. **J Wildl Dis**, v. 50, n. 4, p. 964-968, 2014.

KIRUBAHARAN, J.; AISHWARYA, S.; SHILPA, P.; CHANDRAN, D. Complete genome sequence of avian infectious bronchitis virus isolated from commercial broiler in India. **GenBank KT203557.1**, v., n., p., 2015.

KUO, L.; MASTERS, P. S. The Small Envelope Protein E Is Not Essential for Murine Coronavirus Replication. **Journal of Virology**, v. 77, n. 8, p. 4597-4608, 2003.

LIU, S.; KONG, X. A new genotype of nephropathogenic infectious bronchitis virus circulating in vaccinated and non-vaccinated flocks in China. **Avian Pathol**, v. 33, n. 3, p. 321-327, 2004.

LIU, S.; CHEN, J.; CHEN, J.; KONG, X.; SHAO, Y.; HAN, Z.; FENG, L.; GU, S.; LIU, M. Isolation of avian infectious bronchitis coronavirus from domestic peafowl (*Pavo cristatus*) and teal (*Anas*). **Journal of General Virology**, v. 86, n., p. 719-725, 2005.

MA, H.; SHAO, Y.; SUN, C.; HAN, Z.; LIU, X.; GUO, H.; LIU, X.; KONG, X.; LIU, S. Genetic Diversity of Avian Infectious Bronchitis Coronavirus in Recent Years in China. **Avian Dis**, v. 56, n. 1, p. 15-28, 2012.

MASE, M.; KAWANISHI, N.; OOTANI, Y.; MURAYAMA, K.; KARINO, A.; INOUE, T.; KAWAKAMI, J. A novel genotype of avian infectious bronchitis virus isolated in Japan in 2009. **J Vet Med Sci**, v. 72, n. 10, p. 1265-1268, 2010.

MASTERS, P. S.; PERLMAN, S. Coronaviridae. In: Knipe, D. M. e Howley, P. M. (Ed.). **Fields Virology**. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2013. v.1, p.825-858.

METTIFOGO, E.; NUNEZ, L. F.; CHACON, J. L.; SANTANDER PARRA, S. H.; ASTOLFI-FERREIRA, C. S.; JEREZ, J. A.; JONES, R. C.; PIANTINO FERREIRA, A. J. Emergence of enteric viruses in production chickens is a concern for avian health. **ScientificWorldJournal**, v. 2014, n., p. 450423, 2014.

MEULEMANS, G.; BOSCHMANS, M.; DECAESSTECKER, M.; BERG, T. P.; DENIS, P.; CAVANAGH, D. Epidemiology of infectious bronchitis virus in Belgian broilers: a retrospective study, 1986 to 1995. **Avian Pathol**, v. 30, n. 4, p. 411-421, 2001.

MIHINDUKULASURIYA, K. A.; WU, G.; ST LEGER, J.; NORDHAUSEN, R. W.; WANG, D. Identification of a novel coronavirus from a beluga whale by using a panviral microarray. **J Virol**, v. 82, n. 10, p. 5084-5088, 2008.

MONDAL, S. P.; LUCIO-MARTINEZ, B.; NAQI, S. A. Isolation and characterization of a novel antigenic subtype of infectious bronchitis virus serotype DE072. **Avian Dis**, v. 45, n. 4, p. 1054-1059, 2001.

MONTASSIER, H. J. Molecular epidemiology and evolution of avian infectious bronchitis virus. **Brazilian Journal of Poultry Science**, v. 12, n., p. 87-96, 2010.

MOURA-ALVAREZ, J.; CHACON, J. V.; SCANAVINI, L. S.; NUNEZ, L. F.; ASTOLFI-FERREIRA, C. S.; JONES, R. C.; PIANTINO FERREIRA, A. J. Enteric viruses in Brazilian turkey flocks: single and multiple virus infection frequency according to age and clinical signs of intestinal disease. **Poult Sci**, v. 92, n. 4, p. 945-955, 2013.

MURADRASOLI, S.; MOHAMED, N.; HORNYAK, A.; FOHLMAN, J.; OLSEN, B.; BELAK, S.; BLOMBERG, J. Broadly targeted multiprobe QPCR for detection of coronaviruses: Coronavirus is common among mallard ducks (*Anas platyrhynchos*). **J Virol Methods**, v. 159, n. 2, p. 277-287, 2009.

NEUMAN, B.; KISS, G.; KUNDING, A.; BHELLA, D.; BAKSH, M.; CONNELLY, S.; DROESE, B.; KLAUS, J.; MAKINO, S.; SAWICKI, S.; SIDDELL, S. G.; STAMOU, D.; WILSON, I. A.; KUHN, P.; BUCHMEIER, M. J. A structural analysis of M protein in coronavirus assembly and morphology. **Journal of Structural Biology**, v. 174, n., p. 11-22, 2011.

OIE. CHAPTER 10.9. Newcastle Disease. In: Oie (Ed.). **Terrestrial Animal Health Code 2014**, 2014. v.II,

OKINO, C. H.; SANTOS, I. L.; FERNANDO, F. S.; ALESSI, A. C.; WANG, X.; MONTASSIER, H. J. Inflammatory and cell-mediated immune responses in the respiratory tract of chickens to infection with avian infectious bronchitis virus. **Viral Immunol**, v. 27, n. 8, p. 383-391, 2014.

RADFORD, C.; CHAPMAN, D.; DIXON, L.; CHANTREY, J.; DARBY, A.; HALL, N. Application of next-generation sequencing technologies in virology. **J Gen Virol**, v. 93, n., p. 1853-1868, 2012.

SAIKATENDU, K. S.; JOSEPH, J. S.; SUBRAMANIAN, V.; NEUMAN, B.; BUCHMEIER, M. J.; STEVENS, R. C.; KUHN, P. Ribonucleocapsid Formation of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus through Molecular Action of the N-Terminal Domain of N Protein. **Journal of Virology**, v. 81, n. 8, p. 3913-3921, 2007.

SPACKMAN, E.; PEDERSEN, J. C.; MCKINLEY, E. T.; GELB, J., JR. Optimal specimen collection and transport methods for the detection of avian influenza virus and Newcastle disease virus. **BMC Vet Res**, v. 9, n., p. 35, 2013.

TAMURA, K.; STECHER, G.; PETERSON, D.; FILIPSKI, A.; KUMAR, S. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. **Mol Biol Evol**, v. 30, n. 12, p. 2725-2729, 2013.

TARNAGDA, Z.; YOUNGBARE, I.; KAM, A.; TAHITA, M. C.; OUEDRAOGO, J. B. Prevalence of infectious bronchitis and Newcastle disease virus among domestic and wild birds in H5N1 outbreaks areas. **J Infect Dev Ctries**, v. 5, n. 8, p. 565-570, 2011.

THOMPSON, J. D.; HIGGINS, D. G.; GIBSON, T. J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Res**, v. 22, n. 22, p. 4673-4680, 1994.

THOR, S. W.; HILT, D.; KISSINGER, J. C.; PATERSON, A. H.; JACKWOOD, D. Recombination in Avian Gamma-Coronavirus Infectious Bronchitis Virus. **Viruses**, v. 3, n., p. 1777-1799, 2011.

TORRES, C. A.; VILLARREAL, L. Y.; AYRES, G. R.; RICHTZENHAIN, L. J.; BRANDAO, P. E. An Avian coronavirus in quail with respiratory and reproductive signs. **Avian Dis**, v. 57, n. 2, p. 295-299, 2013.

TYRRELL, D. A. J.; ALMEDIA, J. D.; BERRY, D. M.; CUNNINGHAM, C. H.; HAMRE, D.; HOFSTAD, M. S.; MALLUCI, L.; MCINTOSH, K. Coronavirus. **Nature**, v. 220/650, n., p., 1968.

UBABEF. **Relatório anual UBABEF 2014**. União Brasileira de Avicultura

VALASTRO, V.; HOLMES, E. C.; BRITTON, P.; FUSARO, A.; JACKWOOD, M.; CATTOLI, G.; MONNE, I. S1 gene-based phylogeny of infectious bronchitis virus: An attempt to harmonize virus classification. **Infect Genet Evol**, v. 39, n., p. 349-364, 2016.

VAN BORM, S.; RIZOTTO, L. S.; ULLMANN, L. S.; SCAGION, G. P.; MALOSSO, C. D.; SIMAO, R. M.; ARAUJO, J.; CORDEIRO, I. M.; KEID, L. B.; OLIVEIRA, T. M.; SOARES, R. M.; MARTINI, M. C.; ORSI, M. A.; ARNS, C. W.; FERREIRA, H. L. Complete Genome Sequence of a Vaccinal Newcastle Disease Virus Strain Isolated from an Owl (*Rhynoptynx clamator*). **Genome Announc**, v. 4, n. 6, p., 2016.

VILLARREAL, L. Y.; BRANDAO, P. E.; CHACON, J. L.; SAIDENBERG, A. B.; ASSAYAG, M. S.; JONES, R. C.; FERREIRA, A. J. Molecular characterization of infectious bronchitis virus strains isolated from the enteric contents of Brazilian laying hens and broilers. **Avian Dis**, v. 51, n. 4, p. 974-978, 2007.

VIRALZONE. **Gammacoronavirus**: secondary title, 2016. 2016, Monopartite, linear ssRNA(+) genome of 27-32kb in size (the largest of all RNA virus genomes). Capped, and polyadenylated. The leader RNA (65-89 bp) at the 25' end of the genome is also present at the end of each subgenomic RNAs. p.

WEISS, S.; NAVAS-MARTIN, S. Coronavirus Pathogenesis and the Emerging Pathogen Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus. **Microbiol Mol Biol Rev**, v. 69(4), n. 4, p., 2005.

WILLE, M.; AVRIL, A.; TOLF, C.; SCHAGER, A.; LARSSON, S.; BORG, O.; OLSEN, B.; WALDENSTROM, J. Temporal dynamics, diversity, and interplay in three components of the virodiversity of a Mallard population: Influenza A virus, avian paramyxovirus and avian coronavirus. **Infect Genet Evol**, v. 29, n., p. 129-137, 2015.

WOO, P. C.; LAU, S. K.; LAM, C. S.; LAI, K. K.; HUANG, Y.; LEE, P.; LUK, G. S.; DYRTING, K. C.; CHAN, K. H.; YUEN, K. Y. Comparative analysis of complete genome sequences of three avian coronaviruses reveals a novel group 3c coronavirus. **J Virol**, v. 83, n. 2, p. 908-917, 2009.

WOO, P. C.; LAU, S. K.; LAM, C. S.; LAU, C. C.; TSANG, A. K.; LAU, J. H.; BAI, R.; TENG, J. L.; TSANG, C. C.; WANG, M.; ZHENG, B. J.; CHAN, K. H.; YUEN, K. Y. Discovery of seven novel Mammalian and avian coronaviruses in the genus deltacoronavirus supports bat coronaviruses as the gene source of alphacoronavirus and betacoronavirus and avian coronaviruses as the gene source of gammacoronavirus and deltacoronavirus. **J Virol**, v. 86, n. 7, p. 3995-4008, 2012.

WYLER, L. S.; SHEIKH, A. P. **International Illegal Trade in Wildlife: Threats and U.S Policy**. CRS Report for Congress: Congressional Research Service

ZHANG, Y.; WANG, H.; WANG, T.; FAN, W. X.; ZHANG, W.; WEI, K.; TIAN, G.; YANG, X. Complete genome sequence and recombination analysis of infectious bronchitis virus attenuated vaccine strain H120. **Virus Genes**, v. 41, n., p., 2010.