

THAISA LUCAS SANDRI

**Vírus da bronquite infecciosa das galinhas (IBV): distribuição,
diversidade molecular e genealogia a partir de amostras de múltiplos
órgãos de diversos tipos de criação do plantel avícola brasileiro**

São Paulo

2009

THAISA LUCAS SANDRI

Vírus da bronquite infecciosa das galinhas (IBV): distribuição, diversidade molecular e genealogia a partir de amostras de múltiplos órgãos de diversos tipos de criação do plantel avícola brasileiro

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 a obtenção do título de Mestre em Ciências

Departamento:

Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal

Área de concentração:

Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses

Orientador:

Prof. Dr. Paulo Eduardo Brandão

São Paulo

2009

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.2229
FMVZ

Sandri, Thaisa Lucas

Vírus da bronquite infecciosa das galinhas (IBV): distribuição, diversidade molecular e genealogia a partir de amostras de múltiplos órgãos de diversos tipos de criação do plantel avícola brasileiro / Thaisa Lucas Sandri. -- 2009. 80 f. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Medicina Preventiva e Saúde Animal, São Paulo, 2010.

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

Área de concentração: Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses.

Orientador: Prof. D. Paulo Eduardo Bandrão.

1. Vírus da Bronquite Infecciosa (IBV). 2. Coronavírus. 3. Bronquite Infecciosa das Galinhas (BIG). 4. Genealogia. 5. Epidemiologia Molecular. I. Título.

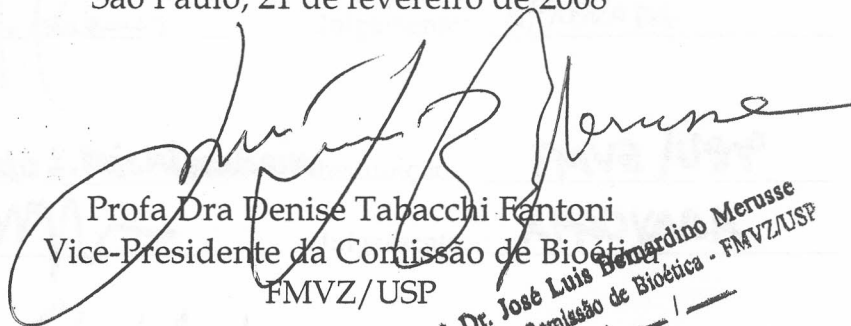


CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Vírus da bronquite infecciosa das galinhas: detecção e diversidade molecular em diferentes órgãos de poedeiras comerciais, matrizes e frangos criados em diferentes estados do Brasil", protocolado sob o nº1252/2007, utilizando amostras biológicas de aves, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Paulo Eduardo Brandão, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado na reunião do dia 20 de fevereiro de 2008.

We certify that the Research "Avian infectious bronchtis virus: detection and molecular diversity in different organs of layers, breeders and broilers from different Brazilian States", protocol number 1252/2007, under the responsibility Prof. Dr. Paulo Eduardo Brandão, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Bioethic Commission of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo was approved in the meeting of day 02/20/08.

São Paulo, 21 de fevereiro de 2008



Profa Dra Denise Tabacchi Fantoni
Vice-Presidente da Comissão de Bioética
FMVZ/USP

Prof. Dr. José Luis Bernardino Merusse
Presidente da Comissão de Bioética - FMVZ/USP
SP, ____ / ____ / ____

ERRATA

| Página | Parágrafo | Linha | Onde se lê | Leia-se |
|---------------------|-----------|-------|------------|---------|
| Ficha catalográfica | 3 | 1 | 80 f. | 79 f. |
| Resumo | 1 | 5 | 80 f. | 79 f. |
| | 1 | 6 | 2009 | 2010 |
| Abstract | 1 | 5 | 80 f. | 79 f. |
| | 1 | 6 | 2009 | 2010 |

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: SANDRI, Thaisa Lucas

Título: Vírus da bronquite infecciosa das galinhas (IBV): distribuição, diversidade molecular e genealogia a partir de amostras de múltiplos órgãos de diversos tipos de criação do plantel avícola brasileiro

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 a obtenção do título de Mestre em Ciências

Data: ___/___/___

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Julgamento: _____

*Aos amores da minha vida:
meus filhos Victor e Lorenzo,
meu marido Eduardo
e os meus guias, meu porto seguro
e meus pais Humberto e Vera.*

*Eu fico com a pureza das respostas das crianças:
É a vida! É bonita e é bonita!*

*Viver e não ter a vergonha de ser feliz
Cantar, e cantar, e cantar
A beleza de ser um eterno aprendiz.
Eu sei que a vida devia ser bem melhor e será
Mas isso não impede que eu repita:
É bonita, é bonita e é bonita!*

*E a vida? E a vida o que é, diga lá, meu irmão?
Ela é a batida de um coração?
Ela é uma doce ilusão?*

*Mas e a vida? Ela é "maravida" ou é sofrimento?
Ela é alegria ou lamento?
O que é? O que é, meu irmão?*

*Há quem fale que a vida da gente é um nada no mundo
É uma gota, é um tempo
Que nem dá um segundo.*

*Há quem fale que é um divino mistério profundo
É o sopro do criador numa atitude repleta de amor*

*Você diz que é luta e prazer
Ele diz que a vida é viver
Ela diz que melhor é morrer
Pois amada não é, e o verbo é sofrer!*

*Eu só sei que confio na moça
E na moça eu ponho a força da fé*

*Somos nós que fazemos a vida
Como der, ou puder, ou quiser.*

*Sempre desejada por mais que esteja errada
Ninguém quer a morte, só saúde e sorte!
E a pergunta roda e a cabeça agita*

*E eu fico com a pureza das respostas das crianças:
É a vida! É bonita e é bonita!*

*O que é, o que é?
Gonzaguinha*

AGRADECIMENTOS

A Deus por me ter dado saúde, força, determinação e perseverança para realizar esse trabalho.

Aos meus filhos Victor e Lorenzo pelo sacrifício, amor e alegrias. Amor incondicional e sem tamanho...

Ao meu marido Eduardo por todo sacrifício, apoio, dedicação, amizade, amor, companheirismo e cumplicidade. Amor pra vida inteira...

Aos meus pais Humberto e Vera pelo amor e por sempre acreditarem em meus sonhos e por nunca medirem esforços para me ajudar a torná-los realidade. Vocês sempre serão o meu exemplo de vida! Amo muito vocês!

À minha irmã Suellen por toda amizade e amor que, mesmo distante, sempre me apoiou e incentivou. “Você viaja pra longe... e aprende que existem pessoas que são essenciais e insubstituíveis...”

À Aracélis, ao Paulo Celso e à Ana Paula por todo carinho, amor, apoio, incentivo e ‘socorros’ prestados e tão importantes para a conclusão desse estudo.

À grande família Lucas (tios, tias, primos, primas e agregados) que sempre me incentivou e me apoiou.

À família Sandri pelo apoio.

Ao Prof. Dr. Paulo Eduardo Brandão, pelo exemplo como pessoa e profissional, pelo seu otimismo, pela oportunidade, pela confiança, pela orientação, pela paciência, pelo carinho e pela amizade e pela grata convivência dentro e fora do laboratório.

À Dra. Laura Yaneth Villarreal Buitrago, por todo carinho, incentivo, orientação e confiança, sem o seu auxílio esse estudo não seria possível.

Ao Prof. Dr. Leonardo José Richtzenhain, por fornecer estrutura e oportunidade de realizar ciência através dos seus valiosos conhecimentos e do seu laboratório.

Ao Prof. Dr. Silvio Arruda Vasconcellos, por toda dedicação à Pós-Graduação do VPS.

À Prof. Dra. Maria Solange Gennari, pelo empenho com a Pós-Graduação do VPS.

Ao Prof. Dr. José Antonio Jerez, pelo carinho, por seus valiosos ensinamentos e agradáveis conversas.

Ao Prof. Dr. Ricardo Augusto Dias, ao Prof. Dr. Fernando Ferreira, e ao Prof. Dr. Marcos Amaku pelos auxílios prestados, pelas esclarecedoras aulas de estatística.

Ao Prof. Dr. Nilson Roberti Benites, pela acolhida e pela valiosa experiência na sua disciplina.

Ao Prof. Dr. Rodrigo Martins Soares, pelas conversas científicas.

Ao Prof. Dr. Marcelo Bahia Labruna, pelo exemplo de liderança e pela divertida convivência.

À Sheila Oliveira de Souza Silva, por todos os ensinamentos e auxílio com as amostras, pela amizade, pela paciência e pelo carinho.

À Sibeles Pinheiro de Souza, ‘Sibs’, pela amizade e carinho incondicionais, por não medir esforços nos auxílios e pela convivência divertida.

À Mara Cristina Peruzetto e à Patrícia Braconaro pelo auxílio com as amostras e pela amizade.

Aos “irmãos científicos”: Rafael de Novaes Oliveira, Willian de Oliveira Fahl, Karen Miyuki Asano, Giselle Ayres Razera, Iracema Nunes de Barros e Ekaterina A. Durymanova Ono por todo apoio, auxílio, amizade, convivência e por demonstrarem sempre que a união faz a diferença.

À Estela Gallucci Lopes, minha irmã de coração, pelo carinho e pela amizade extremos e pelo constante esforço em me agradar.

À Vanessa Riesz Salgado pela amizade, pelo carinho e pelo auxílio.

À Rosely Bianca dos Santos Kuroda pela amizade e pelo carinho.

À Alessandra Marnie Martins Gomes de Castro, Adriana Cortez, Lara Borges Keid, Enio Mori, pelo carinho, por todas as sugestões e amizade.

Aos amigos e pós-graduandos: Maria Halina Ogrzewalska, Anaiá da Paixão Sevá, Carlos Alberto Geraldo Junior, Jonas de Moraes Filho, Iara Silveira, Nilton Fidalgo Peres, Marianna Matronne, Mikaela Renata Funada, Aline Santana da Hora, Patrícia de Oliveira Esmerini, Carlos Augusto Scacchetti de Almeida, Juliana Martins, Michele Klein, Camila de Oliveira, Amane Paldês, Flávia Morato, Viviane Cambuí, Marcelinho, Bianca Canatto, Fernanda Ywasaki, Vanessinha, Gui, Thiaguinho, José Henrique de Hildebrand e Grisi Filho, Aline Gil Alves Guilloux e aos demais pós-graduandos do VPS pela agradável convivência.

À Tânia Delonero, pelas risadas, por sua ajuda, competência e carinho.

Aos funcionários do VPS, Sandra Sanches, Alexandre Sanches, Gisele de Oliveira, Renatinho, Zenaide Moraes, Pedro César Ferreira da Silva, Jucélia de Jesus Pereira, Danival Lopes Moreira, Maria Cristina Paick e Ana Virginia Pacheco de Almeida Prado Chacur, pela grata convivência.

Às funcionárias da biblioteca Biblioteca Virginie Buff D'Ápice, por toda atenção e eficiência demonstrada ao longo dessa etapa.

A CAPES (Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pela bolsa concedida.

RESUMO

SANDRI, T. L. **Vírus da bronquite infecciosa das galinhas (IBV)**: distribuição, diversidade molecular e genealogia a partir de amostras de múltiplos órgãos de diversos tipos de criação do plantel avícola brasileiro. [Avian infectious bronchitis virus (IBV): distribution, molecular diversity, and genealogy of multiple organs of different types of birds from Brazilian poultry]. 2009. 80f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

A bronquite infecciosa das galinhas (BIG) é uma doença altamente contagiosa causada por múltiplos genótipos/sorótipos do vírus da bronquite infecciosa das galinhas (IBV), um coronavírus do grupo 3. Embora classicamente associado ao trato respiratório, alguns tipos de IBV têm sido descritos com tropismo pelos rins e pelos tratos reprodutivos e entéricos, o IBV pode ser detectado em diversos tipos de tecidos, e também pode acometer aves de todas as idades. Este estudo tem como objetivo verificar a frequência do IBV em amostras de diversos órgãos e conteúdo entérico de avós, matrizes, poedeiras comerciais e frangos de corte, genotipar as amostras detectadas e estudar a diversidade molecular entre as amostras brasileiras de IBV. Um total de 844 *pools* de diversos órgãos e conteúdos entéricos provenientes de 200 lotes de avós, matrizes, poedeiras comerciais e frangos de corte, das regiões Sul, Sudeste, Centro-oeste e Nordeste do Brasil, colhidas durante o período de 2007 a 2009 foram testadas para a presença de IBV com um RT-PCR dirigido à região não traduzida 3'(3'UTR). As aves amostradas apresentaram sinais clínicos compatíveis com a BIG. Todas as amostras de IBV detectadas foram tipificadas utilizando uma RT-PCR dirigida ao gene de espícula do vírus. Dezenove amostras tipificadas como variante foram submetidas ao seqüenciamento parcial da região codificadora da subunidade S1 e à análise genealógica. Considerando os *pools* de órgãos e de conteúdo entérico, 45,50% foram positivos para a presença de IBV, dos quais, 84,63% pertencem ao genótipo Variante e 9,89% ao sorótipo/genótipo Massachusetts. Considerando os lotes, 73,50% foram positivos para IBV, sendo 77,55% variantes e 6,12% Massachusetts. A análise genealógica revelou quatro linhagens virais, todas agrupadas em um exclusivo agrupamento de genótipo brasileiro. Estes resultados demonstram que o IBV está disseminado em todas as regiões avícolas brasileiras, com um predomínio massivo de genótipos não

Massachusetts e uma elevada diversidade molecular, que deve ser levada em consideração para desenvolver medidas preventivas contra o IBV.

Palavras-chave: Vírus da Bronquite Infecciosa (IBV). Coronavírus. Bronquite Infecciosa das Galinhas (BIG). Genealogia. Epidemiologia Molecular.

ABSTRACT

SANDRI, T. L. **Avian infectious bronchitis virus (IBV)**: distribution, molecular diversity and genealogy of multiple organs strains of different types of birds from Brazilian poultry. [Vírus da bronquite infecciosa das galinhas (IBV): distribuição, diversidade molecular e genealogia a partir de amostras de múltiplos órgãos de diversos tipos de criação do plantel avícola brasileiro]. 2009. 80f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

Infectious bronchitis (IB) is a highly contagious disease of poultry caused by multiple geno/serotypes of avian infectious bronchitis virus (IBV), a group 3 coronavirus. Though classically associated to the respiratory tract, IBV strains also have been described which harbor tropism for the kidneys and the reproductive and enteric tracts, and might be detected in multiple tissues and can also affect birds of all ages. This survey aimed to assess the frequency of in multiple organs and enteric content samples from grandparents, breeders, layers and broilers, to genotype the IBV strains detected and to study the molecular diversity amongst Brazilian IBV strains. A total of 844 pools of multiple organs and enteric contents from 200 flocks of grandparents, breeders, layers and broilers from the Southern, Southeastern, Central-Western and Northeastern Brazilian regions collected between 2007 and 2009 was screened for the presence of IBV with an RT-PCR target to the 3 untranslated region (UTR). The sampled birds presented symptoms compatible with IB. All IBV strains detected were then typed using an RT-PCR target to the spike gene of the virus. Nineteen strains type as variants were submitted to partial sequencing of the S1 coding region and genealogic analysis. Regarding the organs and enteric content pools, 45.50% were positive for the presence of IBV, from which 84.63% were variant and 9.89% Massachusetts. Taking into account the flocks, 73.50% were positive for IBV, being 77.55% variants and 6.12% Massachusetts. Genealogic analysis revealed four viral lineages, all grouped in an exclusive Brazilian genotype cluster. This results shown that IBV is widespread in all Brazilian poultry regions, with a massive predominance of non-Massachusetts genotypes and a high molecular diversity, which must be taken into account in order to develop preventive measures against IB.

Key words: Infectious Bronchitis Virus (IBV). Coronavirus. Avian Infectious Bronchitis. Genealogy. Molecular Epidemiology.

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

| | |
|---------|---|
| Min | minuto de hora |
| % | porcento |
| BLAST/n | Basic Local Alignment Search Tool |
| IBV | Vírus da bronquite infecciosa |
| APV | Pneumovírus aviário |
| °C | graus Celsius |
| cDNA | DNA complementar |
| dNTP | deoxinucleosídeo-trifosfato |
| DNA | ácido desoxirribonucléico |
| DEPC | dietil-pirocarbonato |
| et al. | e colaboradores |
| G | aceleração da gravidade terrestre (9,8 m/s ²) |
| kDa | quiloDalton |
| M | Molar |
| mM | milimolar |
| ng | nanogramas |
| mL | mililitro |
| µg | micrograma |
| µL | microlitro |
| MHV | murine hepatitis virus |
| nt | nucleotídeos |
| pb | pares de bases |
| PCR | reação em cadeia pela polimerase |
| pmol | picomoles |
| RNA | ácido nucléico |
| RT | transcrição reversa |
| S | espícula |

SUMÁRIO

| | | |
|--------------|---|-----------|
| 1 | INTRODUÇÃO | 16 |
| 2 | OBJETIVOS..... | 22 |
| 3 | MATERIAIS E MÉTODOS | 24 |
| 3.1 | AMOSTRAS CLÍNICAS | 24 |
| 3.2 | CONTROLES POSITIVO E NEGATIVO | 25 |
| 3.3 | PREPARO DAS AMOSTRAS E EXTRAÇÃO DE RNA | 25 |
| 3.4 | APLICAÇÃO DE UMA REAÇÃO DE TRANSCRIÇÃO-REVERSA SEGUIDA DE REAÇÃO EM CADEIA PELA POLIMERASE SEMI- <i>NESTED</i> (SEMI- <i>NESTED</i> RT-PCR) PARA TRIAGEM DAS AMOSTRAS PARA O VÍRUS DA BRONQUITE INFECCIOSA (IBV)..... | 26 |
| 3.5 | APLICAÇÃO DE UMA REAÇÃO DE TRANSCRIÇÃO-REVERSA SEGUIDA DE REAÇÃO EM CADEIA PELA POLIMERASE <i>MULTIPLEX</i> <i>NESTED</i> (<i>MULTIPLEX NESTED</i> RT-PCR) PARA GENOTIPAGEM DAS AMOSTRAS POSITIVAS PARA O VÍRUS DA BRONQUITE INFECCIOSA (IBV)..... | 27 |
| 3.6 | APLICAÇÃO DE UMA REAÇÃO DE TRANSCRIÇÃO-REVERSA SEGUIDA DE REAÇÃO EM CADEIA PELA POLIMERASE SEMI- <i>NESTED</i> (SEMI- <i>NESTED</i> RT-PCR) PARA AMPLIFICAÇÃO DA REGIÃO CODIFICADORA DA SUBUNIDADE S1 DA PROTEÍNA S DO VÍRUS DA BRONQUITE INFECCIOSA (IBV) 29 | |
| 3.7 | SEQÜENCIAMENTO DE DNA..... | 30 |
| 3.8 | EDIÇÃO DE SEQUÊNCIAS | 31 |
| 3.9 | ANÁLISE GENEALÓGICA E DE DIVERSIDADE MOLECULAR..... | 31 |
| 4 | RESULTADOS..... | 34 |
| 4.1 | REAÇÃO DE TRANSCRIÇÃO-REVERSA SEGUIDA DE REAÇÃO EM CADEIA PELA POLIMERASE SEMI- <i>NESTED</i> (SEMI- <i>NESTED</i> RT-PCR) DIRIGIDA À REGIÃO 3'UTR PARA TRIAGEM DAS AMOSTRAS PARA O VÍRUS DA BRONQUITE INFECCIOSA (IBV) | 34 |
| 4.1.1 | Resultados por <i>pools</i> de órgãos | 34 |
| 4.1.2 | Resultados por lotes..... | 36 |
| 4.2 | REAÇÃO DE TRANSCRIÇÃO-REVERSA SEGUIDA DE REAÇÃO EM CADEIA PELA POLIMERASE <i>MULTIPLEX NESTED</i> (<i>MULTIPLEX</i> <i>NESTED</i> RT-PCR) PARA GENOTIPAGEM DAS AMOSTRAS POSITIVAS PARA O VÍRUS DA BRONQUITE INFECCIOSA (IBV) | 40 |
| 4.2.1 | Resultados por <i>pools</i> de órgãos | 41 |
| 4.2.2 | Resultados por lotes..... | 43 |
| 4.3 | SEQÜENCIAMENTO DE DNA..... | 49 |
| 4.4 | ANÁLISE GENEALÓGICA..... | 52 |

| | | |
|----------|-------------------------|-----------|
| 5 | DISCUSSÃO..... | 56 |
| 6 | CONCLUSÕES | 70 |
| | REFERÊNCIAS..... | 72 |

INTRODUÇÃO

“Imagination is more important than knowledge...”

Albert Einstein

1 INTRODUÇÃO

Atualmente, a avicultura brasileira ocupa a terceira posição na produção e a primeira posição nas exportações de carne de frango do mundo. Das 10,94 milhões de toneladas produzidas em 2008, 33% destinaram-se ao mercado externo, resultando em 3,6 milhões de toneladas, gerando um total de divisas para o país de aproximadamente 6,9 bilhões de dólares. A carne de frango é o segundo produto nas exportações do agronegócio e o sexto na pauta de exportações do país (ABEF, 2008).

Em 2007, a produção de ovos atingiu 67,36 milhões de caixas (ROCHA, 2008) apenas no mercado interno. Através do monitoramento da sanidade e do bem-estar animal do plantel brasileiro, o mercado externo pode ser mais uma conquista desse ramo do setor avícola brasileiro.

Estes dados ressaltam a importância da avicultura brasileira no cenário econômico do país, podendo ser ainda mais rentável dependendo da sanidade das aves, pois controlando as enfermidades que geram perdas por ineficiência na produção, bem como perdas por mortalidade, poderia haver um incremento expressivo nos números desse setor.

A Bronquite Infecciosa das Galinhas (BIG), que se destaca dentre tais enfermidades por sua frequência, é uma síndrome infecto-contagiosa aguda que acomete frangos, matrizes e poedeiras da espécie *Gallus gallus*, sendo o seu agente etiológico o vírus da bronquite infecciosa aviária (IBV, *infectious bronchitis virus*), que classicamente, pode infectar não só os tratos respiratório e reprodutivo, mas também o sistema excretor renal de animais jovens e adultos (DHINAKAR; JONES, 1997). Também, recentemente, associou-se o IBV à etiologia de processos patológicos entéricos (VILLARREAL et al., 2007b).

As aves acometidas pelo vírus da bronquite infecciosa aviária, apesar da baixa mortalidade, podem apresentar sinais respiratórios como tosse, espirros, estertores traqueais, descargas nasais, lacrimejamento e síndrome da cabeça inchada (edema de barbela, sinusite e conjuntivite quando associada ao Pneumovírus Aviário – APV Avian Pneumovirus); sinais entéricos como diarreia e síndrome da má absorção; sinais renais como incremento no consumo de água, fezes aquosas e urolitíase (degeneração renal seguida de atrofia renal, fibrose e cálculos renais) e sinais reprodutivos como queda severa na produção de ovos, deterioração da casca, ovos com baixa qualidade (clara muito aquosa ou em quantidade reduzida), falsas poedeiras (quando a infecção ocorre em fêmeas com menos de duas semanas, causando lesões permanentes e

comprometendo o trato reprodutivo) e queda na fertilidade de machos reprodutores, cálculos testiculares têm sido associados à patogenicidade desse vírus (DI FÁBIO; VILLARREAL, 2009).

Distribuído mundialmente, o IBV foi descrito pela primeira vez na Dakota do Norte, Estados Unidos (SCHALK et al., 1931). Em 1934, estabeleceu-se a etiologia desta doença (SCHALM; BEACH) e em 1941, teve início a prevenção da BIG em lotes de poedeiras através da exposição controlada destas ao IBV durante o estágio de crescimento até o início da postura, resultando no primeiro passo para o desenvolvimento do programa de imunização utilizado atualmente (VAN ROEKEL, 1941).

Observou-se que o vírus isolado em Connecticut em 1951 e o vírus isolado em Massachusetts em 1941 causavam doenças similares, porém não existia proteção cruzada entre eles (JUNGHER et al., 1956). Esse estudo de Jungher e colaboradores foi a primeira demonstração da existência de mais de um sorotipo do IBV (CAVANAGH; NAQI, 2003).

O vírus da bronquite infecciosa aviária é um coronavírus pertencente ao grupo 3 do gênero *Coronavirus*, classificado na ordem *Nidovirales*, família *Coronaviridae*, a qual compreende os gêneros *Coronavirus* e *Torovirus*. Na mesma ordem, encontram-se também as famílias *Arteriviridae* e *Roniviridae*. A divisão do gênero *Coronavirus* em três grupos é baseada em epítomos presentes nas glicoproteínas de envelope, sequências de nucleotídeos e hospedeiros naturais (VAN REGENMORTEL et al., 2000; GONZÁLEZ et al., 2003).

Este é um vírus envelopado, pleomórfico, aproximadamente arredondado, com cerca de 100 a 150 nanômetros de diâmetro e com quatro proteínas estruturais: nucleoproteína N, proteína de matriz M, proteína de envelope E e glicoproteína de espícula do envelope S (LAI; CAVANAGH, 1997).

O envelope viral é formado por uma camada dupla de lipídios com três proteínas estruturais (M, E e S) dela se projetando, resultando no aspecto de uma coroa (do latim *corona*). Há alguns anos, um *core* esférico foi encontrado em crioeletromicroscopia no vírus da gastroenterite transmissível dos suínos, *core* este constituído pela proteína N associada à proteína M ou uma subclasse desta (RISCO et al., 1996).

O genoma do IBV é constituído por um RNA de fita simples não-segmentado de sentido positivo com 27 kilobases de tamanho, originando um nucleocapsídeo de simetria helicoidal em associação com a nucleoproteína N, uma fosfoproteína de 50-60 quilodaltons rica em aminoácidos básicos, contendo uma região não traduzida na terminação 5' e outra na 3' (5'UTR e

3'UTR, respectivamente), sendo estas duas últimas altamente conservadas dentro de cada espécie do gênero *Coronavirus* (HOLMES; LAI, 1996; LAI; CAVANAGH, 1997; MASTERS, 2006).

A proteína de matriz ou membrana (M), antigamente nomeada de E1, tem 225 a 230 aminoácidos de tamanho. Três domínios transmembrana são encontrados em M, enquanto que a porção carbóxi-terminal é o endodomínio da proteína. A proteína M desempenha função na montagem da partícula viral, formando a estrutura do envelope e o *core*, sendo uma proteína de baixa variabilidade entre os coronavírus, na qual a ocorrência de mutações não leva a alterações na patogenicidade e no tropismo por tecidos, ao contrário do que ocorre com a proteína S (CLARK, 1993; LAI; CAVANAGH, 1997; YAMADA et al., 2000; VABRET et al., 2001).

Em conjunto com a proteína M, a proteína pequena de membrana (“Small membrane protein”, proteína sM ou E), composta de 84 a 109 aminoácidos, também é essencial à estrutura do envelope, porém seu polimorfismo é menos intenso do que, por exemplo, aquele relativo à proteína S (SIDDELL, 1995).

A principal proteína estrutural de envelope dos coronavírus é a proteína de espícula S (“spike”), antigamente nomeada de E2. Esta forma projeções de cerca de 20 nanômetros de comprimento responsáveis pela aparência espiculada do vírion e pela atividade hemaglutinante e é o principal alvo para anticorpos neutralizantes (COLLINS et al., 1982). É também a proteína mais polimórfica entre os coronavírus, organizada como dímeros ou trímeros. A proteína completa tem 180 quilodaltons, mas, em algumas espécies virais, como o coronavírus aviário, é clivável nas subunidades S1 e S2, com cerca de 90 quilodaltons cada (CAVANAGH, 1995).

A subunidade carbóxi-terminal S2 forma a haste da espícula, responsável pela fusão de membranas e formação de sincícios; em função de não apresentar domínios hidrofóbicos, esta atividade fusogênica pode ser devido a alterações conformacionais causadas pela subunidade S1 (LAI; CAVANAGH, 1997). O peptídeo de fusão da S2 é sugerido como sendo PEP1, localizado na mais longa das repetições heptádicas da estrutura da mesma (LUO; WEISS, 1998).

A clivagem proteolítica da proteína S pode ser um passo necessário à formação de sincícios, mas esta é ainda uma hipótese controversa (TOTH, 1982; CYR-COATS; STORZ, 1988; HONDA et al., 1990). No coronavírus MHV, substituições de aminoácidos no códon de iniciação e no grupo de aminoácidos básicos do sítio de clivagem levam à perda da capacidade de clivagem e de formação de sincícios (YAMADA et al., 1997). A subunidade S2 não é envolvida na ligação ao receptor celular (TAGUCHI; YAMADA; TAGUCHI, 1995).

A subunidade S1, ectodomínio aminoterminal da proteína S, muito mais variável do que a subunidade S2, apresenta atividade de ligação a receptores celulares e forma o bulbo da espícula dos coronavírus (LAI; CAVANAGH, 1997). Por formar a porção bulbar da proteína S que contém a maior parte dos sítios antigênicos, a subunidade S1 e o segmento do genoma dos coronavírus que a codifica são mais expostos a pressões seletivas imunológicas mais intensas e, assim, mais propensos ao encontro de polimorfismos do que os demais genes e proteínas dos coronavírus (ABRAHAM et al., 1990). Além disso, é muito comum que o IBV sofra recombinações ou mutações (deleções, inserções ou substituições) durante uma infecção mista com outros IBVs (CAVANAGH; NAQI, 2003).

Tais polimorfismos na proteína S e no gene que a codifica são a base para a existência de mais de 20 sorotipos de IBV, entre os quais há baixa ou nenhuma proteção cruzada (COOK et al., 1999; CAVANAGH, 2007). Dentre os sorotipos existentes, os mais conhecidos são: Beaudette, Massachusetts, Connecticut, Arkansas, 793B (4/91), JMK e D274. Há, ainda, aqueles sorotipos que não podem ser classificados, quer seja por reações sorológicas ou por técnicas de biologia molecular, sendo denominados variantes (DI FÁBIO; VILLARREAL, 2009).

As sequências de aminoácidos da subunidade S1 da proteína de espícula são responsáveis pela ligação ao receptor de membrana celular, definição de sorotipo e neutralização viral (CAVANAGH; DAVIS, 1986; IGNJATOVIC; GALLI, 1994; WANG; HUANG, 2000; CAVANAGH et al., 2003), tal região e a sequência de nucleotídeos que a codifica são os marcadores moleculares de eleição para a determinação de sorotipos (ou genotipos) e mesmo para a predição da proteção cruzada, a qual declina com a diminuição da identidade da sequência S1 entre amostras de campo e amostras vacinais (CAVANAGH et al., 2003; LADMAN et al., 2006).

Comparando as sequências de aminoácidos do gene S1 de diferentes sorotipos determinados por testes de vírus neutralização, a maioria varia em torno de 20 a 25%, podendo chegar até a 50% de variação entre um sorotipo e outro. Interessantemente, diferenças de 2 a 3% de resíduos de aminoácidos (10 a 15 resíduos) podem resultar em uma mudança de sorotipo, o que contribui para a diminuição da proteção cruzada (CAVANAGH, 2007).

Assim, apenas algumas alterações na sequência de nucleotídeos da região hipervariável do gene S podem dar origem a novos sorotipos de IBV. Apesar disso, uma parte considerável do gene S permanece inalterada e por esse motivo certo sorotipo pode promover proteção cruzada

contra tipos de IBV que não pertençam ao mesmo sorotipo. Por isso, em se tratando do uso de vacinas, é importante o conceito de protectotipos (tipo de IBV contido em uma vacina que desenvolva proteção *in vivo* contra o desafio por vírus de campo do seu mesmo sorotipo ou de sorotipos diferentes daqueles contidos na referida vacina) ao invés de sorotipos (COOK et al., 1999; DE WIT, 2000; DI FÁBIO; VILLARREAL, 2009).

As variações genéticas podem, ainda, resultar em mudanças no tropismo e patogenicidade do vírus que podem levar à geração de novos patotipos (classe a que pertence determinado tipo de IBV conforme a sua capacidade de causar lesão em determinado tipo de célula ou de tecido) de IBV (DI FÁBIO; VILLARREAL, 2009).

No Brasil, a bronquite infecciosa das galinhas se apresenta sob todas as formas patogênicas descritas (DI FÁBIO; VILLARREAL, 2009). Além disso, é conhecida a existência dos sorotipos Arkansas, Connecticut e Massachusetts (DI FÁBIO et al., 2000; MONTASSIER et al., 2006), sendo este último sorotipo o único permitido em forma atenuada pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) do Brasil para a produção de vacinas para o controle da bronquite infecciosa aviária no país.

Entretanto, estudos recentes vêm demonstrando que no Brasil ocorrem tipos de IBV geneticamente distantes dos tipos clássicos exemplificados anteriormente, existindo tais tipos brasileiros sob a forma de um único grupamento filogenético (ABREU et al., 2006; BRENTANO et al., 2006; VILLARREAL et al., 2007a; MONTASSIER et al., 2008; SANDRI et al., 2008a, b, c, d; SANDRI et al., 2009a, b, c), grupamento este próximo do sorotipo D274 e distante do sorotipo vacinal Massachusetts, guardando com este último, uma identidade máxima de aminoácidos de 71% para a região amino-terminal de S (VILLARREAL et al., 2007b) o que tem como consequências imediatas a evasão vacinal e a impossibilidade do controle da doença (GELB et al., 2005).

Assim, estudos voltados à tipificação dos IBV existentes no Brasil, que permitam primeiramente determinar se os mesmos pertencem ao sorotipo vacinal Massachusetts ou não, considerando que a imunidade, como explicitado anteriormente, é sorotipo-específica, são fundamentais para o delineamento de estratégias de controle, pois o controle por meio de vacinação só é efetivo se houver um elevado grau de identidade entre as amostras presentes no campo e aquela presente nas formulações vacinais que se pretendem utilizar.

A distribuição geográfica do tipo brasileiro de IBV e sua ocorrência em infecção única ou em co-circulação com outros sorotipos\genotipos em uma dada granja ou em co-infecção com outros sorotipos\genotipos em uma mesma ave no plantel avícola brasileiro ainda são desconhecidas, dificultando o controle e a profilaxia eficientes, gerando, assim ônus para a avicultura nacional.

Desta forma, a pesquisa e a geração de dados deste tipo brasileiro de IBV são fundamentais para que se entenda melhor sua distribuição e genealogia e assim delinear medidas de manejo e medidas profiláticas mais eficazes baseadas tanto na etiologia quanto na cadeia de transmissão, como, por exemplo, a imunoprofilaxia.

Finalmente, um mais aprofundado entendimento das relações genealógicas entre as amostras de IBV detectadas, com base em sequências de DNA da região codificadora da subunidade S1 da proteína S permitirá a evidenciação da relação entre amostras brasileiras e aquelas detectadas em outros países e de padrões filogeográficos de IBV dentro do território nacional, contribuindo para o entendimento da epidemiologia molecular da bronquite infecciosa das galinhas no Brasil e para seu mais eficiente controle.

OBJETIVOS

*“Everything that is really great and inspiring is created by
the individual who can labor in freedom.”
Albert Einstein*

2 OBJETIVOS

Tendo em vista a importância da bronquite infecciosa das galinhas como causa de grandes perdas na avicultura brasileira, o presente trabalho teve os seguintes objetivos:

- Estudar a frequência de IBV em amostras de diversos órgãos e conteúdo entérico de avós, matrizes, poedeiras comerciais e frangos com base no diagnóstico pela reação de transcrição reversa seguida pela reação em cadeia pela polimerase *semi-nested* (semi-nested RT-PCR) dirigida à região 3'UTR do vírus.
- Classificar as amostras de IBV encontradas nos diversos tipos de amostras como pertencente ou não ao sorotipo vacinal Massachusetts utilizando uma *multiplex nested* RT-PCR dirigida ao gene codificador da proteína S do vírus.
- Avaliar a diversidade molecular entre as amostras de IBV com base em seqüenciamento parcial da região codificadora da subunidade S1 da proteína S do IBV.

MATERIAL E MÉTODOS

“The important thing is not to stop questioning.”

Albert Einstein

3 MATERIAIS E MÉTODOS

Os materiais e métodos que foram utilizados para a realização desse estudo estão descritos na sequência em que foram executados.

3.1 AMOSTRAS CLÍNICAS

Foi utilizado neste estudo, um total de 844 amostras de avós, poedeiras comerciais, matrizes e frangos de 200 lotes de granjas localizadas nas regiões Sul, Sudeste, Centro-oeste e Nordeste do Brasil no período de 2007 ao início de 2009. Considerou-se lote cada grupo de aves alojado num mesmo galpão e com distinção de tipo de criação e de idade, podendo haver, portanto, dois lotes diferentes em uma mesma granja.

As amostras foram colhidas sob a forma de *pool* de órgãos, sendo um *pool* constituído pelo conjunto de órgãos de três a cinco aves, obtendo-se, separadamente, *pools* de pulmões (2/ave), traquéia (da glote à carina), rins (2/ave), coração (1/ave), bursa de Fabricius (1/ave), fígado (1/ave), baço (1/ave), testículos (2/macho) no caso de matrizes e avós, trato reprodutivo completo ou parcial (ovários, oviduto e útero – 1/fêmea) no caso das avós, das poedeiras comerciais e das matrizes e intestino (conjunto dos intestinos delgado e grosso). Foram colhidos, ainda, suabes traqueais de alguns lotes, sendo testados de modo individual e ovos provenientes de poedeiras com sinais reprodutivos, sendo testados gema e clara separadamente.

Os órgãos foram colhidos de aves que apresentavam sinais compatíveis com a BIG através de necropsia nas granjas, sendo separados por tipos de órgãos, embalados, mantidos e enviados sob refrigeração (4°C) para a Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo onde eram armazenados a -20°C até o momento do seu processamento.

Escolheu-se fazer a amostragem por *pools* de órgãos de três a cinco aves de um mesmo lote a fim de se obter 95% de confiança de se detectar uma infecção (DE WITT, 2000).

Todas as aves analisadas encontravam-se vacinadas contra IBV, com programa vacinal de acordo com o tipo de ciclo de vida: aves de ciclo curto (frangos de corte) receberam apenas uma

dose de vacina atenuada sorotipo Massachusetts e aves de ciclo longo (avós, poedeiras comerciais e matrizes) receberam primo vacinação atenuada sorotipo Massachusetts e reforços de vacina inativada sorotipo Massachusetts, em algumas granjas no programa de vacinação havia, ainda, reforços de vacina inativada sorotipo D274 e/ou Arkansas.

3.2 CONTROLES POSITIVO E NEGATIVO

Como controle positivo para as RT-PCRs foi utilizada a amostra vacinal viva H120, sorotipo Massachusetts e, como controle negativo, água ultra-pura tratada com 0,1% de dietil-pirocarbonato (água DEPC).

3.3 PREPARO DAS AMOSTRAS E EXTRAÇÃO DE RNA

Cada *pool* de órgãos foi macerado em placas de Petri esterilizadas descartáveis utilizando um par de tesouras e pinças esterilizadas para cada *pool*, mantendo-se as amostras sempre preservadas em gelo. O conteúdo entérico de cada *pool* de intestinos foi colhido em tubos plásticos esterilizados de centrifuga de 50mL.

Então, foram preparados a partir de cada homogeneizado de órgãos e amostra de conteúdos entéricos, uma suspensão a 50% (volume/volume) em água DEPC, em microtubos plásticos para centrifuga, esterilizados e livres de nucleases.

Os tubos foram então submetidos a três ciclos de congelamento a -80°C e descongelamento a 56°C para promover a lise celular e, a seguir, centrifugados a 5000 G por 15 minutos a 4°C , tomando-se o sobrenadante como amostra.

A extração do RNA total das suspensões dos órgãos e fecais, do controle positivo (vacina) e do controle negativo (água DEPC) foi realizada com TRIzol Reagent (InvitrogenTM), segundo as instruções do fabricante, sendo armazenado o RNA extraído a -20°C para as etapas seguintes.

3.4 APLICAÇÃO DE UMA REAÇÃO DE TRANSCRIÇÃO-REVERSA SEGUIDA DE REAÇÃO EM CADEIA PELA POLIMERASE SEMI-NESTED (SEMI-NESTED RT-PCR) PARA TRIAGEM DAS AMOSTRAS PARA O VÍRUS DA BRONQUITE INFECCIOSA (IBV)

Para o diagnóstico de triagem de IBV, as amostras foram submetidas a uma reação de *semi-nested* RT-PCR dirigida para a região 3'UTR do genoma dos coronavírus do grupo 3, gerando um segmento de 179 pares de bases, de acordo com o proposto por Cavanagh et al. (2002).

Os pares de *primers* externos (UTR41S 5' ATGTCTATCGCCAGGGAAATGTC 3' e UTR11A 5' GCTCTAACTCTATACTAGCCTA 3') produzem um fragmento de 266 pb (nt 27342 ao 27607 da região 3'UTR em relação à amostra Beaudette de IBV número de acesso GenBank M95169) e os internos (UTR41S 5' ATGTCTATCGCCAGGGAAATGTC 3' e UTR31A 5' GGGCGTCCAAGTGCTGTACCC 3') produzem um fragmento de 179 pb (nt 27342 ao 27520 da região 3'UTR, interno ao produto da primeira PCR).

A síntese de cDNA (transcrição reversa) realizou-se a partir da desnaturação de 3,5µL do RNA, obtido conforme item 3.3, a 95°C durante 5 minutos, o qual adicionou-se ao mix de transcrição reversa contendo 1 x *First Strand Buffer* (Invitrogen™), 1mM de cada dNTP, 10mM DTT, 1 µM de cada *primer* (UTR41S e UTR11A) e 100U de M-MLV *Reverse Transcriptase* (Invitrogen™) para um volume final de 10µL, realizando-se a transcrição reversa a 42°C por 60 minutos.

A seguir, para a primeira amplificação, foram adicionados 2,5µL de cada cDNA ao mix de PCR, sendo este composto por 1 x PCR Buffer (Invitrogen™), 0,2mM de cada dNTP, 0,5µM de cada *primer* (UTR41S e UTR11A), 1,5mM MgCl₂, 12,625µL água ultra-pura esterilizada e 0,625U de Taq DNA polimerase (Invitrogen™) para uma reação final de 25µL e submetidos a 35 ciclos de 94°C por 1 minuto, 48°C por 1,5 minutos e 72°C por 2 minutos, seguidos por 72°C por 10 minutos para extensão final.

Para a segunda amplificação (*nested*), foram adicionados 2,5µL de cada DNA amplificado ao mix de *nested*, composto por 1 x PCR Buffer (Invitrogen™), 0,2mM de cada dNTP, 0,5µM de cada *primer* (UTR41S e UTR31A), 1,5mM MgCl₂, 12,625µL água ultra-pura esterilizada e 0,625U de Taq DNA polimerase (Invitrogen™) para uma reação final de 25µL, e submetidos a

35 ciclos de 94°C por 1 minuto, 48°C por 1,5 minutos e 72°C por 2 minutos, seguidos por 72°C por 10 minutos para extensão final.

Nesta etapa, foram adicionados tubos com água ultra-pura a cada quatro amostras para se avaliar contaminações por DNA amplificado.

Dez microlitros do produto do *nested* foram analisados em gel de eletroforese com agarose a 1,5 %, corados com brometo de etídeo 0,5 µg/mL e observados sob luz ultravioleta.

Todas as reações descritas no presente estudo foram feitas em salas separadas com intuito de evitar possíveis contaminações. Foram consideradas positivas as amostras que resultaram na banda correspondente de 179 pares de bases.

3.5 APLICAÇÃO DE UMA REAÇÃO DE TRANSCRIÇÃO-REVERSA SEGUIDA DE REAÇÃO EM CADEIA PELA POLIMERASE *MULTIPLEX NESTED* (*MULTIPLEX NESTED* RT-PCR) PARA GENOTIPAGEM DAS AMOSTRAS POSITIVAS PARA O VÍRUS DA BRONQUITE INFECCIOSA (IBV)

Com o objetivo de determinar se as amostras que se apresentaram positivas para a semi-*nested* RT-PCR de triagem para IBV (item 3.4) pertencem ou não ao sorotipo Massachusetts, utilizado nas vacinas contra a BIG no Brasil, as mesmas foram submetidas a uma *multiplex nested* RT-PCR descrita por Cápua et al. (1999) para a amplificação de segmentos da região codificadora da subunidade S1 da proteína S dos sorotipos Massachusetts, D274 e 4/91 baseada em *primers* sorotipo-específicos, resultando em *amplicons* de tamanhos diferentes para cada um dos três sorotipos.

O par de *primers* externos (IBVS 5' YACTGGYAATTTTTCAGATGG 3' e IBVAS 5' CWCTATAAACACCYTTRCA 3') produz um fragmento de 458 pb (nt 729 ao 1193 do gene S1 em relação à amostra do IBV), utilizado a seguir em uma *multiplex nested* PCR com o *primer* IBVNA (5' CAGATTGCTTRCAACCACC 3'), desenhado para hibridizar em todos os três soro/genotipos, e os *primers* soro/genotipo-específicos: 793S (5' AGTAGTTTTGTGTATAAAYCA 3'), D274S (5' ATACAATTATATCAAACCAGC 3') e H120S (5' AATACTACTTTTACGTTACAC 3') que correspondem aos soro/genotipos 4/91,

D274 e Massachusetts respectivamente, gerando fragmentos de 153 pb (nt 958 a 1111), 217 pb (nt 895 a 1111) e 295 pb (nt 817 a 1111) respectivamente. Os *primers* foram modificados em relação ao original para aumentar a sensibilidade da reação.

A síntese de cDNA (transcrição reversa) realizou-se a partir da desnaturação de 3,5µL do RNA, obtido conforme item 3.3, a 95 °C durante 5 minutos, o qual adicionou-se ao mix de transcrição reversa contendo 1 x *First Strand Buffer* (InvitrogenTM), 1mM de cada dNTP, 10mM DTT, 1µM de cada *primer* (IBVS e IBVAS) e 100U de M-MLV *Reverse Transcriptase* (InvitrogenTM) para um volume final de 10µL, realizando-se a transcrição reversa a 42°C por 60 minutos.

Após a obtenção do DNA complementar, foi realizada a reação de PCR pela adição de 3,5µL de cada cDNA ao *mix* de PCR, sendo este composto por 1 x *PCR Buffer* (InvitrogenTM), 0,2mM de cada dNTP, 0,5 µM de cada *primer* (IBVS e IBVAS), 1,5mM MgCl₂, 12,625µL água ultra-pura esterilizada e 0,625U de Taq DNA polimerase (InvitrogenTM) para uma reação final de 25µL, e submetidos a 35 ciclos de 94°C por 1 minuto, 48°C por 1,5 minutos e 72°C por 2 minutos, seguidos por 72°C por 10 minutos para extensão final.

Para a segunda amplificação, foram adicionados 2,5µL do produto da primeira amplificação ao mix de *nested*, composto por 1 x *PCR Buffer* (InvitrogenTM), 0,2mM de cada dNTP, 0,5µM de cada *primer* (IBVNA, 793S, D274S e H120S), 1,5mM MgCl₂, 10,125µL água ultra-pura esterilizada e 0,625U de Taq DNA polimerase (InvitrogenTM) para uma reação final de 25µL, e submetidos a 35 ciclos de 94°C por 1 minuto, 48°C por 1,5 minutos e 72°C por 2 minutos, seguidos por 72°C por 10 minutos para extensão final. Um tubo contendo água DEPC foi adicionado a cada quatro amostras na reação de *multiplex nested* para o monitoramento de contaminações por DNA amplificado, também adicionado de mix e levado ao termociclador. As diferentes etapas foram feitas em salas separadas com o intuito de evitar possíveis contaminações.

Cinco microlitros do produto do *multiplex nested*, bem como do produto da primeira amplificação de cada amostra (com o intuito de verificar se o excesso de DNA levaria à inibição da *nested* e a erros na tipificação) foram analisados em gel de eletroforese com agarose a 1,5%, corados com brometo de etídeo a 0,5µg/mL e observados sob luz ultravioleta. A determinação do sorotipo/genotipo presente na amostra em estudo foi realizada pelo tamanho do fragmento obtido, sendo o *amplicon* de 153 pb atribuído ao sorotipo 4/91, o de 217 pb ao sorotipo D274 e o de 295

pb ao sorotipo Massachusetts. Com a ausência de *amplicons* em gel de eletroforese, a amostra foi considerada Variante.

3.6 APLICAÇÃO DE UMA REAÇÃO DE TRANSCRIÇÃO-REVERSA SEGUIDA DE REAÇÃO EM CADEIA PELA POLIMERASE SEMI-NESTED (SEMI-NESTED RT-PCR) PARA AMPLIFICAÇÃO DA REGIÃO CODIFICADORA DA SUBUNIDADE S1 DA PROTEÍNA S DO VÍRUS DA BRONQUITE INFECCIOSA (IBV)

Foram selecionadas 19 amostras, com base em tipo de órgão, tipo de criação, sinais clínicos e região geográfica, classificadas como positivas para a presença de IBV conforme o item 3.4, mas que não resultaram nos fragmentos esperados após a reação de *multiplex nested* RT-PCR (item 3.5), para a caracterização por seqüenciamento de DNA a partir de um segmento de 390 pb da região codificadora da subunidade S1 da proteína S do IBV, com os *primers* descritos por Worthington et al. (2008), sendo o par de *primers* externos SX1S (5' CACCTAGAGGTTTGYTWGCAT 3') e SX2A (5' TCCACCTCTATAAACACCCYTT 3') que produz um fragmento de 494 pb (nt 677 a 1170 do genoma do IBV) e o par de *primers* internos SX3S (5' TAATACTGGYAATTTTTTCAGA 3') e SX4A (5' AATACAGATTGCTTACAACCACC 3') o qual produz um *amplicon* de 390 pb (nt 705 a 1094 em relação à amostra UK/793 do IBV número de acesso GenBank Z83979).

A síntese de cDNA (transcrição reversa) realizou-se a partir da desnaturação de 3,5µL do RNA, obtido conforme item 3.3, a 95 °C durante 5 minutos, o qual adicionou-se ao mix de transcrição reversa contendo 1 x *First Strand Buffer* (Invitrogen™), 1mM de cada dNTP, 10mM DTT, 0,5µM de cada *primer* (SX1S e SX2A) e 100U de M-MLV *Reverse Transcriptase* (Invitrogen™) para um volume final de 10µL, realizando-se a transcrição reversa a 42°C por 60 minutos.

A seguir, foram adicionados 2,5µL de cada cDNA ao mix de PCR, sendo este composto por 1 x PCR Buffer (Invitrogen™), 0,2mM de cada dNTP, 1µM de cada *primer* (SX1S e SX2A), 1,5mM MgCl₂, 12,625µL água ultra-pura esterilizada e 0,625U de Taq DNA polimerase (Invitrogen™) para uma reação final de 25µL e submetidos a 35 ciclos de 94°C por 1 minuto,

48°C por 1,5 minutos e 72°C por 2 minutos, seguidos por 72°C por 10 minutos para extensão final.

Para a segunda amplificação, foram adicionados 5 µL de cada DNA amplificado ao mix de *nested*, composto por 1 x PCR Buffer (Invitrogen™), 0,2mM de cada dNTP, 0,5µM de cada *primer* (SX3S e SX4A), 1,5mM MgCl₂, 20,25µL água ultra-pura esterilizada e 1,25U de Taq DNA polimerase (Invitrogen™) para uma reação final de 50µL, e submetidos a 35 ciclos de 94°C por 1 minuto, 48°C por 1,5 minutos e 72°C por 2 minutos, seguidos por 72°C por 10 minutos para extensão final. Nesta etapa, foram adicionados tubos com água ultra-pura a cada quatro amostras para se avaliar contaminações por DNA amplificado. Todas as reações foram feitas em salas separadas com o intuito de evitar possíveis contaminações.

Dez microlitros do produto do *nested* foram analisados em gel de eletroforese com agarose a 1,5%, corados com brometo de etídeo 0,5µg/mL e observados sob luz ultravioleta.

Foram consideradas positivas as amostras que resultaram no fragmento correspondente a 390 pb.

3.7 SEQÜENCIAMENTO DE DNA

A purificação dos produtos de PCR para o gene S com 390 pb obtidos conforme o item 3.6 foi realizada a partir dos géis de agarose com *GFX™ PCR DNA and GEL BAND Purification Kit* (GE Healthcare), quantificado visualmente com *Low Mass DNA Ladder* (Invitrogen™) de acordo com as instruções do fabricante e submetidos ao seqüenciamento bi-direcional de DNA em seqüenciador automático ABI-377 (Applied Biosystems™).

A reação de seqüenciamento consistiu em 4µL de BigDye 3.1 (Applied Biosystems™), 4µL de 5x *Sequencing buffer* (Applied Biosystems™), 4pmol de cada *primer* senso e antisenso e 20ng do DNA alvo para uma reação final de 20µL, levando-se ao termociclador PTC-200 (MJ Research™) para 35 ciclos de 96°C por 30 segundos, 50°C por 15 segundos e 60°C por 4 minutos, com rampa de 0,7°C/s entre cada temperatura.

A seguir, o produto desta reação foi precipitado à temperatura ambiente com 80µL de isopropanol a 75%, incubando-se durante 20 minutos, centrifugando-se a 12.000 G por 25 minutos, removendo-se o sobrenadante e adicionando-se 250µL de etanol a 70%, centrifugando-

se a 12.000 G por 5 minutos e secando-se o precipitado a 95°C por 5 minutos, levando as amostras ao seqüenciador automático ABI-377 (Applied Biosystems™).

3.8 EDIÇÃO DE SEQUÊNCIAS

Os cromatogramas gerados para cada uma das sequências senso e antisenso de cada amostra foram submetidos ao aplicativo Phred online em <http://asparagin.cenargen.embrapa.br/phph/>¹ para avaliação da qualidade das bases dos mesmos, sendo utilizadas apenas as posições com escore maior do que 20, ou seja, menos de um erro a cada 100 bases seqüenciadas.

A seguir, os cromatogramas foram conferidos manualmente com o programa Chromas v. 2.23 (© 1998-2002 Technelysium Pty LTD) para a busca por erros de interpretação e discrepâncias entre cada uma das fitas seqüenciadas.

A seqüência final para cada amostra foi obtida com o aplicativo Cap-Contig do programa Bioedit v. 5.0.9 (HALL, 1999), sendo a mesma submetida a BLASTn para confirmação do seqüenciamento em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>².

3.9 ANÁLISE GENEALÓGICA E DE DIVERSIDADE MOLECULAR

Para as sequências putativas de aminoácidos a partir das sequências de nucleotídeos, a árvore genealógica foi gerada após a tradução das sequências de nucleotídeos da região codificadora da subunidade S1, sendo tais sequências de aminoácidos alinhadas pelo método do CLUSTAL/W com a matriz BLOSUM62 com o programa Bioedit (HALL, 1999) em conjunto com sequências homólogas encontradas no GenBank, conferindo-se manualmente o alinhamento,

¹ Phred Aplicativo disponível em: <<http://asparagin.cenargen.embrapa.br/phph/>>. Acesso em: 2009.

² BLAST Aplicativo disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>>. Acesso em: 2009.

obtendo-se a árvore de distância com o algoritmo Neighbor-Joining e modelo evolutivo de Poisson com 1000 repetições de “bootstrap” com o programa MEGA 4.0.

Foram incluídas, ainda, sequências referentes a amostras apresentadas no Anexo A e previamente descritas (BRANDÃO et al., 2009).

Para os cálculos de identidades de aminoácidos, foram excluídas sequências de nucleotídeos com 100% de identidade entre si, bem como aquelas com 100% de identidades de aminoácidos quando realizada a tradução com Bioedit v. 5.0.9 (HALL, 1999), calculando-se as identidades de aminoácidos mínima, máxima e média para os dados de vírus da bronquite infecciosa das galinhas com o programa Microsoft® Office Excel 2003.

RESULTADOS

“The most beautiful thing we can experience is the mysterious. It is the source of all true art and science.”
Albert Einstein

4 RESULTADOS

Os resultados foram divididos de acordo com a realização da metodologia para melhor visualização e entendimento.

4.1 REAÇÃO DE TRANSCRIÇÃO-REVERSA SEGUIDA DE REAÇÃO EM CADEIA PELA POLIMERASE SEMI-NESTED (SEMI-NESTED RT-PCR) DIRIGIDA À REGIÃO 3'UTR PARA TRIAGEM DAS AMOSTRAS PARA O VÍRUS DA BRONQUITE INFECCIOSA (IBV)

Os resultados da triagem foram divididos em *pools* de órgãos e em lotes para melhor organização.

4.1.1 Resultados por *pools* de órgãos

Considerando os 844 *pools* de diferentes órgãos testados, 45,50% (384/844) foram positivos para a presença de IBV como indicou a reação de SEMI-NESTED RT-PCR dirigida à região 3'UTR.

Conforme tabela 1 e gráfico 1 a seguir, levando em consideração a divisão por órgãos, 33,33% (8/24) dos aparelhos reprodutivos femininos testados foram positivos para IBV; 25,00% (05/20) dos baços foram positivos; 80,00% dos *pools* de Bursa de Fabricius foram positivos; 66,66% (102/153) dos conteúdos entéricos testados foram positivos para IBV; 23,08% (03/13) dos corações foram positivos; 35,29% (06/17) dos *pools* de fígados foram positivos; 20,45% (09/44) dos ovários foram positivos para a presença de IBV; 25,00% (01/04) dos ovidutos foram positivos; 45,18% (61/135) dos *pools* de pulmões foram positivos; 50,36% (70/139) dos rins testados foram positivos; 16,00% (08/50) dos testículos foram positivos para IBV; 49,33%

(74/150) das traquéias testadas foram positivas; 27,59% (08/29) dos úteros foram positivos para IBV.

Foram testados, ainda, três *pools* com pulmões, rins e traquéias, dos quais apenas um (33,33%) foi positivo para a presença de IBV e sete *pools* com pulmões e traquéias, dos quais seis (85,57%) foram positivos para IBV.

Suabes traqueais foram testados e 41,67% (15/36) deles foram positivos para a presença de IBV. Um *pool* de claras foi positivo e um *pool* de gemas foi negativo para a presença de IBV. Não foi detectada a presença de IBV em oito *pools* de músculo peitoral analisados.

Tabela 1 – Frequência do IBV em *pools* de diferentes órgãos

| Órgãos | Frequência do IBV em <i>pools</i> de diferentes órgãos | | | | |
|-------------------------------|--|--------|------------|--------|------------|
| | Positivo | | Negativo | | Total |
| | n | % | n | % | |
| Aparelho Reprodutivo Feminino | 8 | 33,33 | 16 | 66,67 | 24 |
| Baços | 5 | 25,00 | 15 | 75,00 | 20 |
| Bursas de Fabricius | 4 | 80,00 | 1 | 20,00 | 5 |
| Conteúdos Entéricos | 102 | 66,67 | 51 | 33,33 | 153 |
| Corações | 3 | 23,08 | 10 | 76,92 | 13 |
| Fígados | 6 | 35,29 | 11 | 64,71 | 17 |
| Músculo Peitoral | 0 | 0,00 | 8 | 100,00 | 8 |
| Ovários | 9 | 20,45 | 35 | 79,55 | 44 |
| Ovidutos | 1 | 25,00 | 3 | 75,00 | 4 |
| Pulmões | 61 | 45,18 | 74 | 54,82 | 135 |
| Rins | 70 | 50,36 | 69 | 49,64 | 139 |
| Testículos | 8 | 16,00 | 42 | 84,00 | 50 |
| Traquéias | 74 | 49,33 | 76 | 50,77 | 150 |
| Úteros | 8 | 27,59 | 21 | 72,41 | 29 |
| Pulmões + Rins + Traquéias | 1 | 33,33 | 2 | 66,67 | 3 |
| Pulmões + Traquéias | 6 | 85,57 | 1 | 14,43 | 7 |
| Suabes Traqueais | 15 | 41,67 | 21 | 58,33 | 36 |
| Claras | 1 | 100,00 | 0 | 0,00 | 1 |
| Gemas | 0 | 0,00 | 1 | 100,00 | 1 |
| Não Determinadas | 2 | 40,00 | 3 | 60,00 | 5 |
| Total | 384 | | 460 | | 844 |

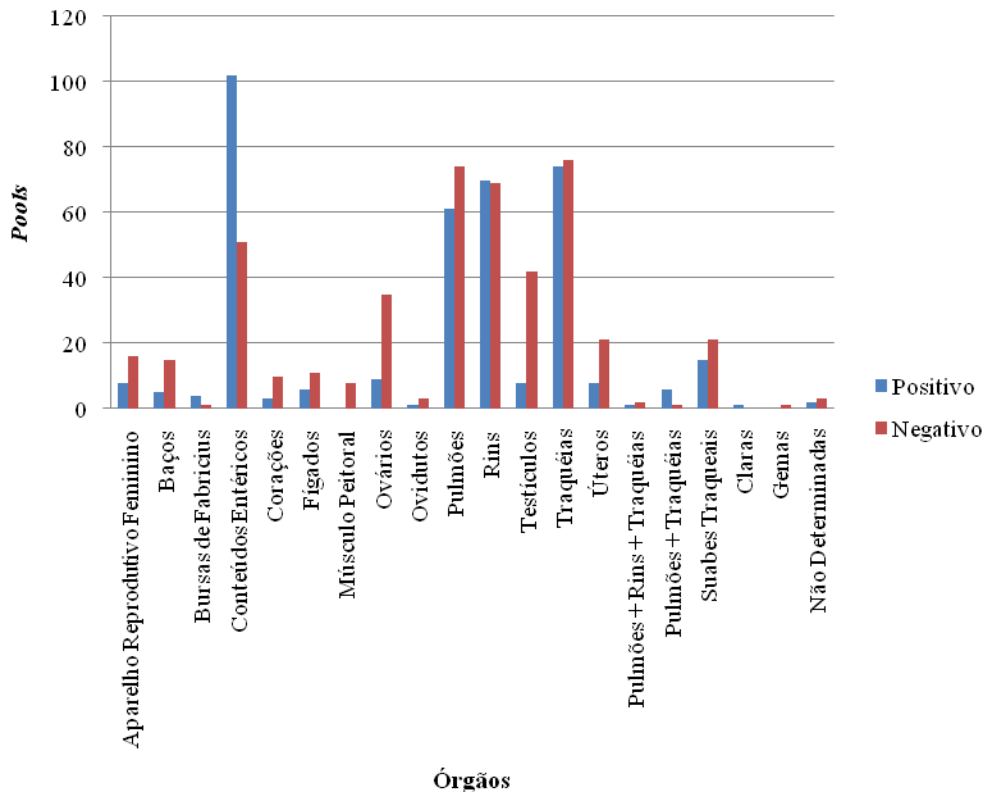


Gráfico 1 – Frequência de IBV em *pools* de diferentes órgãos

4.1.2 Resultados por lotes

Em 147 dos 200 lotes testados (73,5%) foi detectada a presença de IBV.

Conforme tabela 2 e gráfico 2 a seguir, levando em consideração a região geográfica de origem, 81,61% (71/87) dos lotes da região Sul foram positivos para o IBV; na região Sudeste, 56,00% (28/50) dos lotes foram positivos; 90,00% (9/10) dos lotes da região Centro-oeste foram positivos e 65,38% (17/36) dos lotes da região Nordeste foram positivos para a presença de IBV. Houve, ainda, lotes cuja origem não foi informada (NI - não informado), sendo destes, 81,48% (22/27) positivos para IBV.

Tabela 2 – Frequência do IBV segundo a região geográfica de origem

| Frequência do IBV segundo a região geográfica de origem | | | | | |
|---|------------|-------|-----------|-------|------------|
| Região | Positivo | | Negativo | | Total |
| | n | % | n | % | N |
| Sul | 71 | 81,61 | 16 | 18,39 | 87 |
| Sudeste | 28 | 56,00 | 22 | 44,00 | 50 |
| Centro-oeste | 9 | 90,00 | 1 | 10,00 | 10 |
| Nordeste | 17 | 65,38 | 9 | 34,62 | 26 |
| Não Informada | 22 | 81,48 | 5 | 18,52 | 27 |
| Total | 147 | | 53 | | 200 |

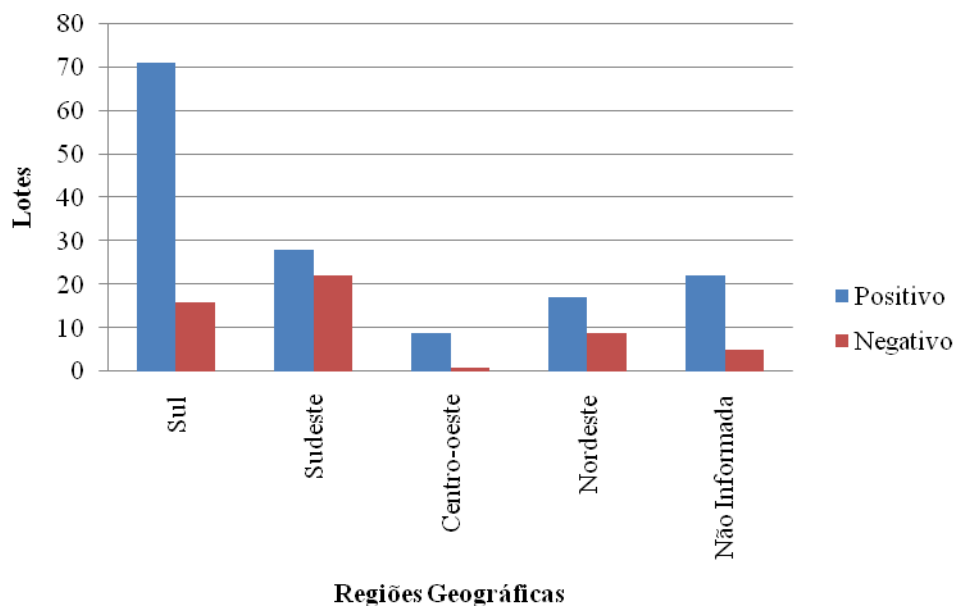


Gráfico 2 – Frequência do IBV segundo a região geográfica de origem

Conforme tabela 3 e gráfico 3 a seguir, considerando o tipo de criação, 85,42% (41/48) dos lotes de frangos de corte foram positivos para IBV; 63,64% (21/33) dos lotes de poedeiras comerciais foram positivos; 74,24% (49/66) dos lotes de matrizes foram positivos e 50,00% (12/24) dos lotes de avós foram positivos para a presença de IBV. Nos lotes cujo tipo de criação não foi informado, houve a presença de IBV em 82,76% (24/29).

Tabela 3 – Frequência do IBV segundo o tipo de criação

| Frequência do IBV segundo o tipo de criação | | | | | |
|---|------------|-------|-----------|-------|------------|
| Tipos de Criação | Positivo | | Negativo | | Total |
| | n | % | n | % | n |
| Frangos de Corte | 41 | 85,42 | 7 | 14,58 | 48 |
| Poedeiras comerciais | 21 | 63,64 | 12 | 36,36 | 33 |
| Matrizes | 49 | 74,24 | 17 | 25,76 | 66 |
| Avós | 12 | 50,00 | 12 | 50,00 | 24 |
| Não Informada | 24 | 82,76 | 5 | 17,24 | 29 |
| Total | 147 | | 53 | | 200 |

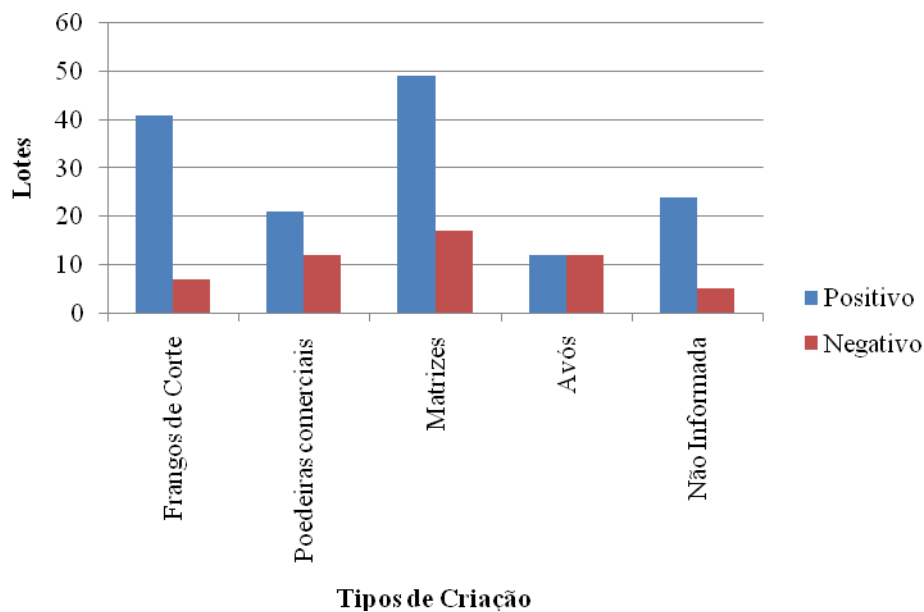


Gráfico 3 – Frequência do IBV segundo o tipo de criação

Conforme tabela 4 e gráfico 4 a seguir, quando classificados quanto aos sinais clínicos apresentados pelas aves a positividade de IBV nos lotes foi de: 50,00% (01/02) nos lotes com sinais articulares; 94,74% (18/19) nos lotes com sinais entéricos; 48,00% (12/25) nos lotes com sinais reprodutivos; 78,26% (18/23) nos lotes com sinais respiratórios; 100,00% (01/01) no lote com sinais renais; 83,33% (05/06) nos lotes com sinais entéricos e reprodutivos; 33,33% (03/09) nos lotes com sinais entéricos e respiratórios; 83,33% (05/06) nos lotes com sinais respiratórios e reprodutivos e 60,00% (03/05) nos lotes com sinais respiratórios, renais e entéricos.

Dois lotes com sinais reprodutivos e renais foram negativos para a presença de IBV. Em lotes com ausência de sinais clínicos, 83,33% (05/06) foram positivos para o IBV. Houve, ainda, lotes cujos sinais clínicos não foram informados, onde 79,17% (76/96) desses foram positivos.

Tabela 4 – Frequência do IBV em relação aos sinais clínicos apresentados pelas aves

| Frequência do IBV em relação aos sinais clínicos apresentados pelas aves | | | | | |
|---|-----------------|----------|-----------------|----------|--------------|
| Sinais Clínicos | Positivo | | Negativo | | Total |
| | n | % | n | % | n |
| Ausentes | 5 | 83,33 | 1 | 16,67 | 6 |
| Articulares | 1 | 50,00 | 1 | 50,00 | 2 |
| Renais | 1 | 100,00 | 0 | 0,00 | 1 |
| Entéricos | 18 | 94,74 | 1 | 5,26 | 19 |
| Reprodutivos | 12 | 48,00 | 13 | 52,00 | 25 |
| Respiratórios | 18 | 78,26 | 5 | 21,74 | 23 |
| Entéricos e Reprodutivos | 5 | 83,33 | 1 | 16,67 | 6 |
| Entéricos e Respiratórios | 3 | 33,33 | 6 | 66,67 | 9 |
| Reprodutivos e Renais | 0 | 0,00 | 2 | 100,00 | 2 |
| Respiratórios e Reprodutivos | 5 | 83,33 | 1 | 16,67 | 6 |
| Respiratórios, Renais e Entéricos | 3 | 60,00 | 2 | 40,00 | 5 |
| Não Informados | 76 | 79,17 | 20 | 20,83 | 96 |
| Total | 147 | | 53 | | 200 |

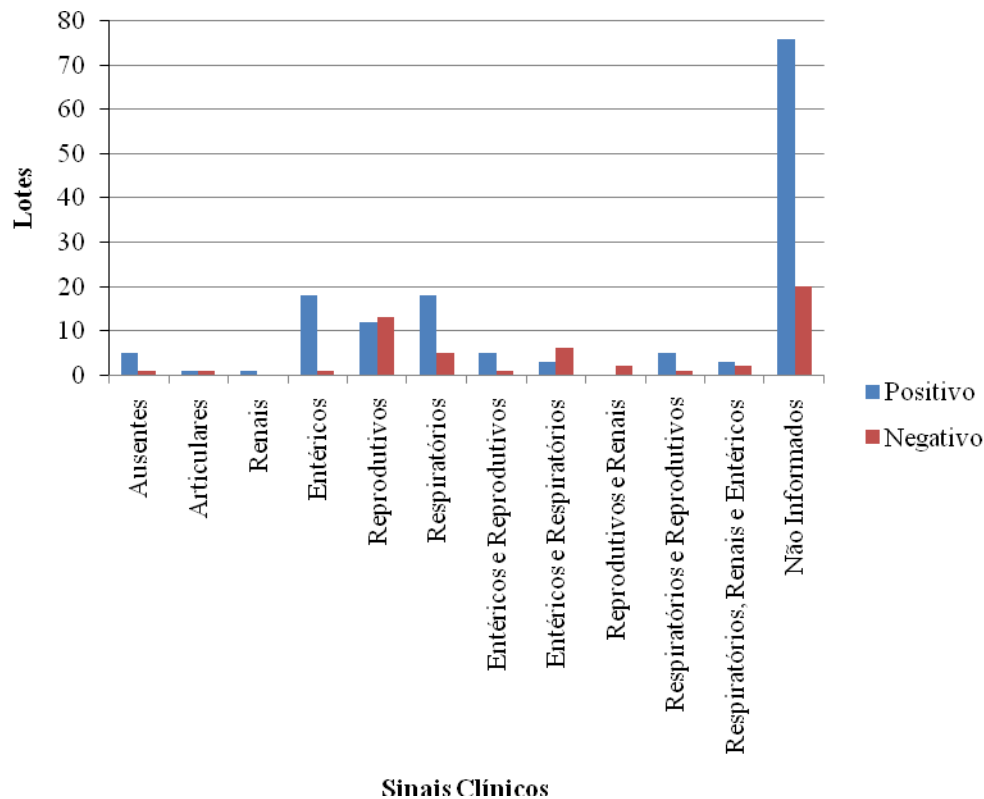


Gráfico 4 – Frequência do IBV em relação aos sinais clínicos apresentados pelas aves

4.2 REAÇÃO DE TRANSCRIÇÃO-REVERSA SEGUIDA DE REAÇÃO EM CADEIA PELA POLIMERASE *MULTIPLEX NESTED* (*MULTIPLEX NESTED* RT-PCR) PARA GENOTIPAGEM DAS AMOSTRAS POSITIVAS PARA O VÍRUS DA BRONquite INFECCIOSA (IBV)

Em todos os 384 *pools* de amostras dos diferentes órgãos testados que foram positivos para a presença de IBV foi realizada a reação de *MULTIPLEX NESTED* RT-PCR dirigida à região codificadora da subunidade S1 proteína S a fim de determinar se pertenciam ou não ao sorotipo/genotipo Massachusetts.

4.2.1 Resultados por *pools* de órgãos

Em relação aos 384 *pools* de diferentes órgãos testados e positivos na para IBV, 84,63% (325/384) foram considerados genotipo Variante, 9,89% (38/384) foram do sorotipo/genotipo Massachusetts e 0,52% foram do sorotipo/genotipo 4/91 (02/384). De todas as amostras positivas para IBV, 17 não foram genotipadas.

Houve co-circulação dos sorotipos/genotipos Massachusetts e 4/91 em dois *pools* de órgãos de lotes diferentes.

Considerando a divisão por órgãos (vide Tabela 5 e Gráfico 5): dos aparelhos reprodutivos femininos positivos para IBV, 87,50% (07/08) pertencem ao genotipo Variante e 12,50% (01/08) pertencem ao sorotipo/genotipo Massachusetts; todos baços positivos (05) pertencem ao genotipo Variante; todos os *pools* de Bursa de Farbricius testados pertencem ao genotipo Variante; dos conteúdos entéricos testados, 88,24% (90/102) pertencem ao genotipo Variante, 5,88% (06/102) ao sorotipo/genotipo Massachusetts, 0,98% (01/102) ao sorotipo/genotipo 4/91 e em 1,96% (02/102) houve co-circulação sorotipos/genotipos Massachusetts e 4/91, três *pools* de conteúdo entérico não foram genotipados; todos os *pools* de corações pertencem ao genotipo Variante; todos os *pools* de fígados pertencem ao genotipo Variante; dos ovários positivos, 66,67% (06/09) pertencem ao genotipo Variante e 33,33% (03/09) pertencem ao sorotipo/genotipo Massachusetts; o único *pool* de oviduto positivo pertence ao genotipo Variante; dos *pools* de pulmões, 80,33% (49/61) pertencem ao genotipo Variante e 11,47% (07/61) pertencem ao sorotipo/genotipo Massachusetts, cinco *pools* de pulmões não foram genotipados; dos rins positivos, 87,15% (61/70) pertencem ao genotipo Variante e 7,14% (05/70) pertencem ao sorotipo/genotipo Massachusetts, quatro *pools* de rins não foram genotipados; dos testículos positivos, 87,50% (07/08) pertencem ao genotipo Variante e 12,50% (01/08) ao sorotipo/genotipo Massachusetts; do total das traquéias positivas, 74,32% (55/74) pertencem ao genotipo Variante, 18,92% (14/74) ao sorotipo/genotipo Massachusetts e 1,35% (01/74) ao sorotipo/genotipo 4/91, quatro *pools* de traquéias não foram genotipados; dos úteros positivos para IBV, 87,50% (07/08) pertencem ao genotipo Variante e 12,50% (01/08) ao sorotipo/genotipo Massachusetts. Houve, ainda, um *pool* com pulmões, rins e traquéias e seis *pools* com pulmões e traquéias pertencentes ao genotipo Variante.

Todos os suabes traqueais positivos para a presença de IBV pertencem ao genótipo Variante. Um *pool* de claras testado foi classificado como sendo do genótipo Variante.

Tabela 5 – Frequência das estirpes de IBV em *pools* de diferentes órgãos

| Órgãos | Frequência das estirpes de IBV em <i>pools</i> de diferentes órgãos | | | | | | | | |
|-------------------------------|---|--------|---------------|-------|----------|------|-----------------|------|-------------|
| | Variantes | | Massachusetts | | 4/91 | | Sem genotipagem | | Total |
| | n | % | n | % | n | % | n | % | n |
| Aparelho Reprodutivo Feminino | 7 | 87,50 | 1 | 12,50 | 0 | 0,00 | 0 | 0,00 | 8 |
| Baços | 5 | 100,00 | 0 | 0,00 | 0 | 0,00 | 0 | 0,00 | 5 |
| Bursas de Fabricius | 4 | 100,00 | 0 | 0,00 | 0 | 0,00 | 0 | 0,00 | 4 |
| Conteúdos Entéricos | 90 | 88,24 | 6 | 5,88 | 1 | 0,98 | 3 | 2,94 | 100* |
| Corações | 3 | 100,00 | 0 | 0,00 | 0 | 0,00 | 0 | 0,00 | 3 |
| Fígados | 6 | 100,00 | 0 | 0,00 | 0 | 0,00 | 0 | 0,00 | 6 |
| Ovários | 6 | 66,67 | 3 | 33,33 | 0 | 0,00 | 0 | 0,00 | 9 |
| Ovidutos | 1 | 100,00 | 0 | 0,00 | 0 | 0,00 | 0 | 0,00 | 1 |
| Pulmões | 49 | 80,33 | 7 | 11,47 | 0 | 0,00 | 5 | 8,20 | 61 |
| Rins | 61 | 87,15 | 5 | 7,14 | 0 | 0,00 | 4 | 5,71 | 70 |
| Testículos | 7 | 87,50 | 1 | 12,50 | 0 | 0,00 | 0 | 0,00 | 8 |
| Traquéias | 55 | 74,32 | 14 | 18,92 | 1 | 1,35 | 4 | 5,41 | 74 |
| Úteros | 7 | 87,50 | 1 | 12,50 | 0 | 0,00 | 0 | 0,00 | 8 |
| Pulmões + Rins + Traquéias | 1 | 100 | 0 | 0,00 | 0 | 0,00 | 0 | 0,00 | 1 |
| Pulmões + Traquéias | 6 | 100 | 0 | 0,00 | 0 | 0,00 | 0 | 0,00 | 6 |
| Suabes Traqueais | 15 | 100 | 0 | 0,00 | 0 | 0,00 | 0 | 0,00 | 15 |
| Claras | 1 | 100 | 0 | 0,00 | 0 | 0,00 | 0 | 0,00 | 1 |
| Total | 324 | | 38 | | 4 | | 16 | | 382 |

* em 2 *pools* houve co-circulação dos sorotipos/genótipos Massachusetts e 4/91

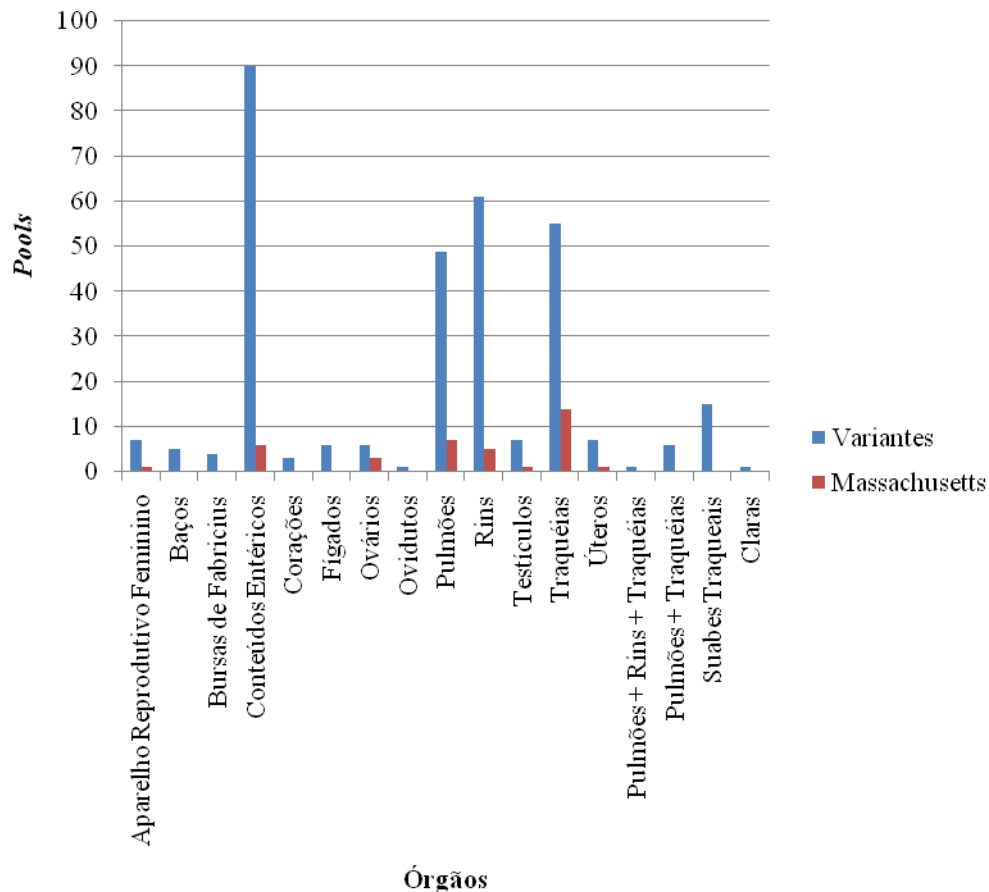


Gráfico 5 – Frequência dos genótipos Variantes e Massachusetts em *pools* de diferentes órgãos

4.2.2 Resultados por lotes

De todos os 147 lotes positivos para a presença de IBV, 114 lotes (77,55%) foram classificados como genótipo Variante, 09 lotes (6,12%) como sorotipo/genótipo Massachusetts e 01 lote (0,68%) como sorotipo/genótipo 4/91. Em dois lotes foi detectada co-circulação dos sorotipos/genótipos Massachusetts e 4/91 e em um lote a co-circulação foi do genótipo Variante e do sorotipo/genótipo 4/91. Seis lotes do total de positivos não foram genotipados.

Considerando a região de origem (vide Tabela 6 e Gráfico 6): na região Sul, 81,69% (58/71) dos lotes positivos pertencem ao genótipo Variante, 2,82% (02/71) pertencem ao sorotipo/genótipo Massachusetts e em 12,67% (09/71) dos lotes houve co-circulação do genótipo

Variante e do sorotipo/genotipo Massachusetts, dois lotes da região Sul não foram genotipados; na região Sudeste, 71,43% (20/28) dos lotes positivos pertencem ao genotipo Variante e 3,57% (01/28) pertence ao sorotipo/genotipo 4/91 e houve co-circulação dos sorotipos/genotipos Massachusetts e 4/91 em 3,57% (01/28) dos lotes, co-circulação do sorotipo/genotipo 4/91 e do genotipo Variante em 3,57% (01/28) dos lotes e co-circulação do sorotipo/genotipo Massachusetts e do genotipo Variante em 14,29% (04/28) dos lotes, um lote não foi genotipado; todos os lotes positivos (09) para IBV da região Centro-oeste pertencem ao genotipo Variante e da região Nordeste, 82,35% (14/17) dos lotes positivos pertencem ao genotipo Variante e 17,65% (03/17) ao sorotipo/genotipo Massachusetts. Houve, ainda, lotes cuja origem não foi informada (NI - não informado), sendo que 59,09% (13/22) desses pertencem ao genotipo Variante, 18,18% (04/22) ao sorotipo/genotipo Massachusetts, em um lote (4,55%) foram detectados o genotipo Variante e o sorotipo/genotipo Massachusetts e quatro lotes positivos para a presença de IBV não foram genotipados.

Tabela 6 – Frequência das estirpes de IBV nas regiões geográficas

| Frequência das estirpes de IBV nas regiões geográficas | | | | | | | | |
|--|------------|-----------|----------|-----------|----------|----------|-----------------|------------|
| Região Geográfica | Variantes | Mass | 4/91 | V + M | V + 4/91 | M + 4/91 | Sem genotipagem | Total |
| | n (%) | n (%) | n (%) | n (%) | n (%) | n (%) | n (%) | n |
| Sul | 58 (81,69) | 2 (2,82) | 0 (0,00) | 9 (12,67) | 0 (0,00) | 0 (0,00) | 2 (2,82) | 71 |
| Sudeste | 20 (71,43) | 0 (0,00) | 1 (3,57) | 4 (14,29) | 1 (3,57) | 2 (7,14) | 0 (0,00) | 28 |
| Centro-oeste | 9 (100,00) | 0 (0,00) | 0 (0,00) | 0 (0,00) | 0 (0,00) | 0 (0,00) | 0 (0,00) | 9 |
| Nordeste | 14 (82,35) | 3 (17,65) | 0 (0,00) | 0 (0,00) | 0 (0,00) | 0 (0,00) | 0 (0,00) | 17 |
| Não Informada | 13 (59,09) | 4 (18,18) | 0 (0,00) | 1 (4,55) | 0 (0,00) | 0 (0,00) | 4 (18,18) | 22 |
| Total | 114 | 9 | 1 | 14 | 1 | 2 | 6 | 147 |

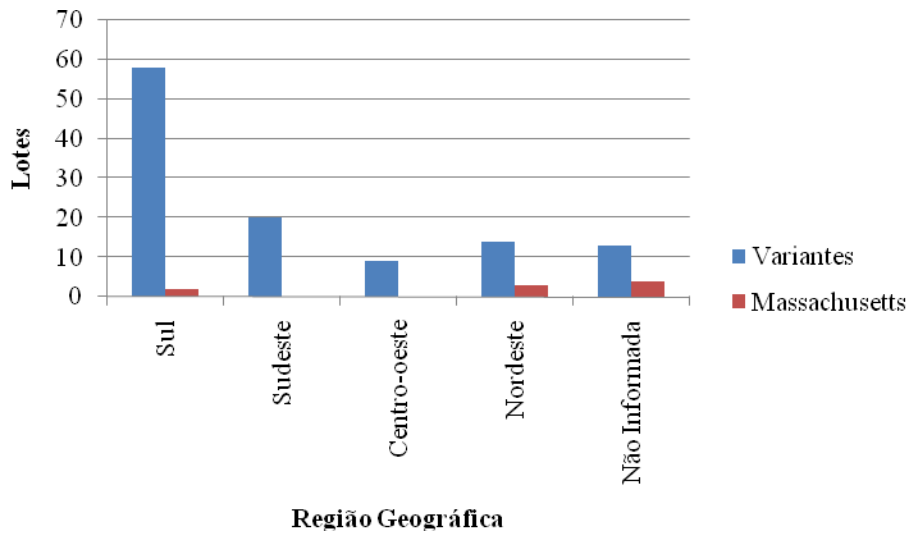


Gráfico 6 - Frequência dos genótipos Variantes e Massachusetts nas regiões geográficas de origem

Levando em consideração o tipo de criação (vide Tabela 7 e Gráfico 7): nos frangos de corte, 75,61% (31/41) dos lotes positivos pertencem ao genótipo Variante, 2,44% (01/41) ao sorotipo/genótipo Massachusetts e em 19,51% (08/41) dos lotes foi detectada co-circulação do genótipo Variante e do sorotipo/genótipo Massachusetts, um lote de frango de corte positivo para IBV não foi genotipado.

Nas poedeiras comerciais, 71,43% (15/21) dos lotes positivos pertencem ao genótipo Variante, 9,52% (02/21) ao sorotipo/genótipo Massachusetts, 4,76% (01/21) pertence ao sorotipo/genótipo 4/91 e em 9,52% (02/21) dos lotes houve co-circulação dos sorótipos/genótipos Massachusetts e 4/91. Um lote de poedeiras não foi genotipado.

Nas matrizes, 89,79% (44/49) dos lotes positivos pertencem ao genótipo Variante, 2,04% (01/21) ao sorotipo/genótipo Massachusetts, em 4,08% (02/21) dos lotes houve co-circulação do genótipo Variante e do sorotipo/genótipo Massachusetts e em 2,04% (01/21) dos lotes a co-circulação detectada foi do genótipo Variante e do sorotipo/genótipo 4/91, um lote de matrizes não foi genotipado.

Nas avós, 66,67% (08/12) dos lotes positivos para a presença de IBV pertencem ao genótipo Variante, 8,33% (01/12) ao sorotipo/genótipo Massachusetts e em 25% (03/12) dos lotes positivos houve co-circulação do genótipo Variante e do sorotipo/genótipo Massachusetts.

Nos lotes cujo tipo de criação não foi informado, 66,67% (16/24) dos lotes pertencem ao genotipo Variante, 16,67% (04/24) ao sorotipo/genotipo Massachusetts e em um lote (4,17%) houve co-circulação do genotipo Variante e do sorotipo/genotipo Massachusetts, três lotes com tipo de criação não informado não foram genotipados.

Tabela 7 – Frequência das estirpes de IBV nos diferentes tipos de criação

| Frequência das estirpes de IBV nos diferentes tipos de criação | | | | | | | | |
|--|------------|-----------|----------|-----------|----------|----------|-----------------|------------|
| Tipo de Criação | Variantes | Mass | 4/91 | V + M | V + 4/91 | M + 4/91 | Sem genotipagem | Total |
| | n (%) | n (%) | n (%) | n (%) | n (%) | n (%) | n (%) | n |
| Frangos de Corte | 31 (75,61) | 1 (2,44) | 0 (0,00) | 8 (19,51) | 0 (0,00) | 0 (0,00) | 1 (2,44) | 41 |
| Poedeiras comerciais | 15 (71,43) | 2 (9,52) | 1 (4,76) | 0 (0,00) | 0 (0,00) | 2 (9,52) | 1 (4,76) | 21 |
| Matrizes | 44 (89,79) | 1 (2,04) | 0 (0,00) | 2 (4,08) | 1 (2,04) | 0 (0,00) | 1 (2,04) | 49 |
| Avós | 8 (66,67) | 1 (8,33) | 0 (0,00) | 3 (25,00) | 0 (0,00) | 0 (0,00) | 0 (0,00) | 12 |
| Não Informada | 16 (66,67) | 4 (16,67) | 0 (0,00) | 1 (4,17) | 0 (0,00) | 0 (0,00) | 3 (12,50) | 24 |
| Total | 114 | 9 | 1 | 14 | 1 | 2 | 6 | 147 |

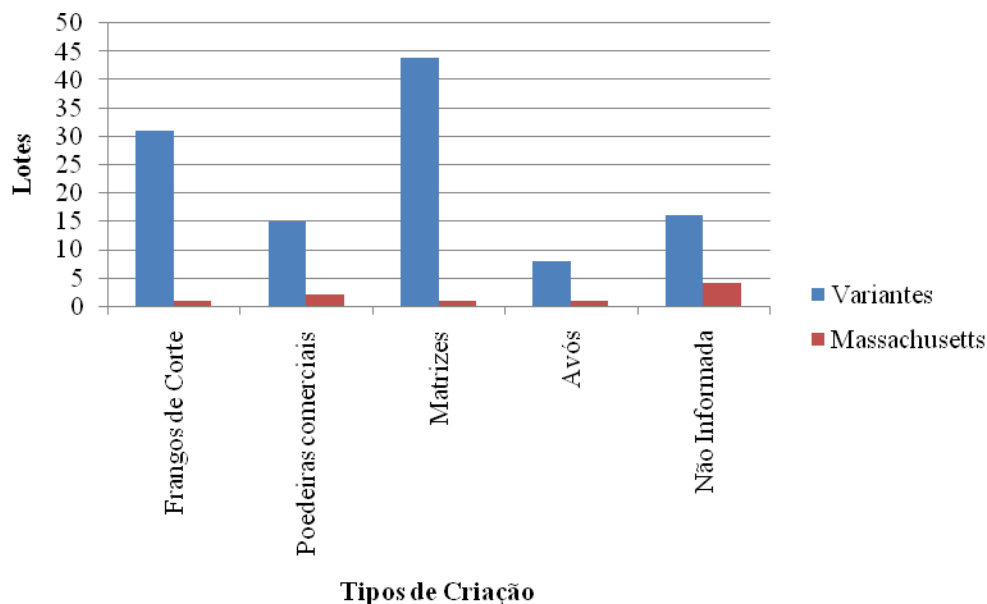


Gráfico 7 – Frequência dos genotipos Variantes e Massachusetts nos diferentes tipos de criação

Quando classificados quanto aos sinais clínicos apresentados pelas aves (vide Tabela 8 e Gráfico 8) a distribuição dos sorotipos/genotipos entre os lotes: o lote positivo para o IBV com sinais articulares pertence ao genotipo Variante; nos lotes com sinais entéricos, 77,78% (14/18)

pertencem ao genotipo Variante, 5,55% (01/18) ao sorotipo/genotipo Massachusetts, em 11,11% (02/18) dos lotes houve co-circulação dos sorotipos/genotipos Massachusetts e 4/91 e em 5,55% (01/18) dos lotes a co-circulação detectada foi do genotipo Variante e do sorotipo/genotipo Massachusetts.

Nos lotes com sinais reprodutivos, 58,33% (07/12) pertencem ao genotipo Variante, 25% (03/12) ao sorotipo/genotipo Massachusetts e em 16,67% (02/12) dos lotes a co-circulação detectada foi do genotipo Variante e do sorotipo/genotipo Massachusetts; nos lotes com sinais respiratórios, 83,33% (15/18) pertencem ao genotipo Variante e em 16,67% (03/18) dos lotes a co-circulação detectada foi do genotipo Variante e do sorotipo/genotipo Massachusetts.

O único lote com sinais renais pertence ao genotipo Variante. Todos os lotes positivos com sinais entéricos e reprodutivos (05) pertencem ao genotipo Variante; todos os lotes positivos com sinais entéricos e respiratórios (03) pertencem ao genotipo Variante; todos os lotes com sinais respiratórios e reprodutivos (05) pertencem ao genotipo Variante e todos os lotes com sinais respiratórios, renais e entéricos (03) pertencem ao genotipo Variante. Em lotes com ausência de sinais clínicos, 80% (04/05) pertencem ao genotipo Variante e 20% (01/05) ao sorotipo/genotipo Massachusetts. Houve, ainda, lotes cujos sinais clínicos não foram informados, 73,68% (56/76) pertencem ao genotipo Variante, 7,89% (06/76) ao sorotipo/genotipo Massachusetts, em 9,21% (07/76) dos lotes a co-circulação detectada foi do genotipo Variante e do sorotipo/genotipo Massachusetts e em 1,31% (01/76) dos lotes a co-circulação detectada foi do genotipo Variante e do sorotipo/genotipo 4/91.

Tabela 8 - Frequência das estirpes de IBV de acordo com os sinais clínicos apresentados pelas aves

| Sinais Clínicos | Variantes | Mass | 4/91 | V + M | V + 4/91 | M + 4/91 | Sem genotipagem | Total |
|-----------------------------------|------------|-----------|----------|-----------|----------|-----------|-----------------|------------|
| | n (%) | n (%) | n (%) | n (%) | n (%) | n (%) | n (%) | n |
| Ausentes | 4 (80,00) | 0 (0,00) | 0 (0,00) | 1 (20,00) | 0 (0,00) | 0 (0,00) | 0 (0,00) | 5 |
| Articulares | 1 (100,00) | 0 (0,00) | 0 (0,00) | 0 (0,00) | 0 (0,00) | 0 (0,00) | 0 (0,00) | 1 |
| Renais | 1 (100,00) | 0 (0,00) | 0 (0,00) | 0 (0,00) | 0 (0,00) | 0 (0,00) | 0 (0,00) | 1 |
| Entéricos | 14 (77,78) | 0 (0,00) | 1 (5,55) | 1 (5,55) | 0 (0,00) | 2 (11,11) | 0 (0,00) | 18 |
| Reprodutivos | 7 (58,33) | 3 (25,00) | 0 (0,00) | 2 (16,67) | 0 (0,00) | 0 (0,00) | 0 (0,00) | 12 |
| Respiratórios | 15 (83,33) | 0 (0,00) | 0 (0,00) | 3 (16,67) | 0 (0,00) | 0 (0,00) | 0 (0,00) | 18 |
| Entéricos e Reprodutivos | 5 (100) | 0 (0,00) | 0 (0,00) | 0 (0,00) | 0 (0,00) | 0 (0,00) | 0 (0,00) | 5 |
| Entéricos e Respiratórios | 3 (100) | 0 (0,00) | 0 (0,00) | 0 (0,00) | 0 (0,00) | 0 (0,00) | 0 (0,00) | 3 |
| Respiratórios e Reprodutivos | 5 (100) | 0 (0,00) | 0 (0,00) | 0 (0,00) | 0 (0,00) | 0 (0,00) | 0 (0,00) | 5 |
| Respiratórios, Renais e Entéricos | 3 (100) | 0 (0,00) | 0 (0,00) | 0 (0,00) | 0 (0,00) | 0 (0,00) | 0 (0,00) | 3 |
| Não Informados | 56 (73,68) | 6 (7,89) | 0 (0,00) | 7 (9,21) | 1 (1,31) | 0 (0,00) | 6 (7,89) | 76 |
| Total | 114 | 9 | 1 | 14 | 1 | 2 | 6 | 147 |

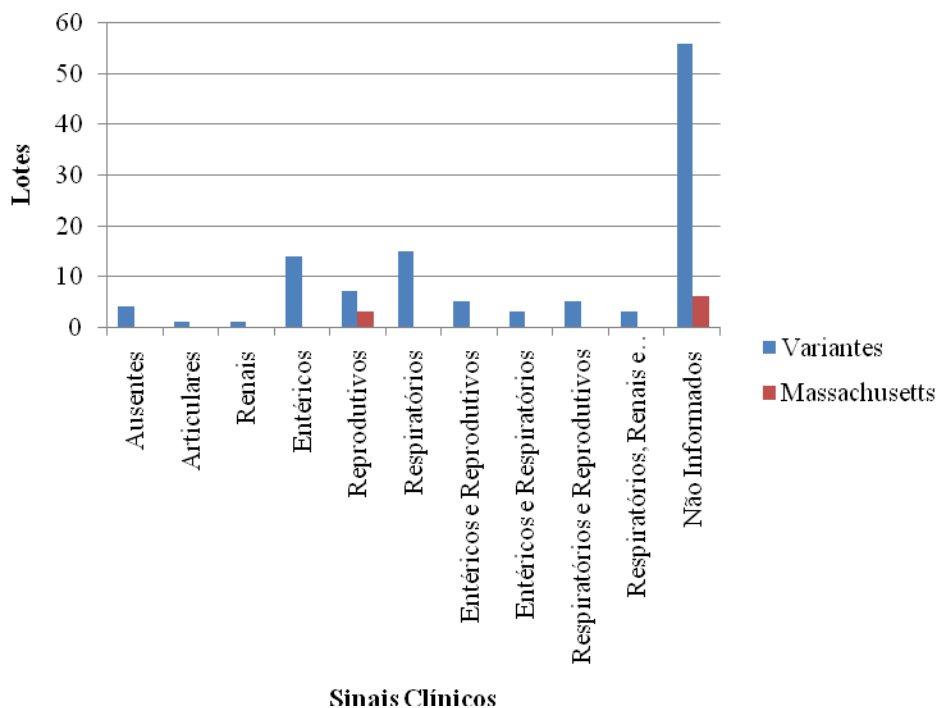


Gráfico 8 - Frequência dos genótipos Variantes e Massachusetts de acordo com os sinais clínicos apresentados pelas aves

4.3 SEQUENCIAMENTO DE DNA

Vinte e oito amostras foram submetidas à RT-PCR dirigida à amplificação parcial da região codificadora da subunidade S1 do gene S (item 3.6). Essas amostras foram selecionadas em função dos tipos de órgãos amostrados, bem como, região geográfica, tipo de criação e tipo sinais clínicos apresentados nos lotes amostrados.

Todas as 28 amostras foram positivas para esta PCR, sendo que, apenas para os *amplicons* referentes a 19 amostras (Quadro 1) foram obtidas sequências com escore PHRED superior a 21, sendo utilizadas as sequências traduzidas para aminoácidos entre os resíduos 243 a 357 da região S1 em relação ao número de acesso do Genbank Z83979.

Quadro 1 - Amostras de IBV relativas ao presente estudo utilizadas para a geração da árvore genealógica incluindo as 19 amostras cujas sequências foram obtidas no mesmo (em negrito), mostrando o tipo de órgão, tipo de criação, região geográfica de origem, idade das aves, co-circulação de tipos no lotes, genotipo (de acordo com a posição na árvore genealógica) e sinais clínicos. Mass VAC 01 e Mass VAC 02 referem-se a amostras vacinais sorotipo Massachusetts em uso no Brasil.

(Continua)

| Amostras de IBV relativas ao presente estudo utilizadas para a geração da árvore genealógica | | | | | | | | |
|--|----------|-------------------|-----------------|--------|------------|---------------|----------|------------------------------|
| Lote | Genbank | Órgãos | Tipo de criação | Região | Idade | Co-circulação | Genotipo | Sinais |
| 10/07 | FJ791267 | Traquéias | Frango de Corte | NE | 40 dias | Ausente | BR | Respiratórios |
| 12/07 | FJ791259 | Rins | Frango de Corte | S | 42 dias | Ausente | BR-03 | Renais |
| 23A/07 | FJ791255 | Úteros | Postura | S | 28 semanas | Variantes | Mass | Entéricos e Reprodutivos |
| 27A/07 | FJ791258 | Úteros | Postura | S | 27 semanas | Ausente | BR-03 | Entéricos e Reprodutivos |
| 34/07 | FJ791271 | Ovários | Matrizes | SE | 45 semanas | Ausente | BR-01 | Reprodutivos |
| 35/07 | FJ791273 | Conteúdo Entérico | Matrizes | SE | 36 semanas | Ausente | 4/91 | Reprodutivos |
| 38/07 | FJ791257 | Conteúdo Entérico | Frango de Corte | CO | 33 dias | Ausente | BR-03 | Entéricos |
| 01/08 G18 | FJ791263 | Conteúdo Entérico | Frango de Corte | NI | 21 dias | Ausente | BR-02 | NI |
| 01/08 G18 | FJ791262 | Conteúdo Entérico | Frango de Corte | NI | 35 dias | Ausente | BR-02 | NI |
| 02/08 | FJ791260 | Pulmões+Traquéias | Avós | S | NI | Ausente | BR | Respiratórios e Reprodutivos |
| 03/08 | FJ791256 | Testículos | NI | NI | NI | Variantes | Mass | NI |
| 04/08 | FJ791266 | Úteros | NI | NE | 23 semanas | Ausente | BR | Ausentes |
| 06/08 | FJ791265 | Conteúdo Entérico | Matrizes | SE | 47 dias | Ausente | BR-02 | Entéricos |
| 07/08 | FJ791272 | Traquéias | Postura | SE | 29 sem | Ausente | 4/91 | Respiratórios e Reprodutivos |
| 14/08 | FJ791254 | Pulmões | Frango de Corte | S | 38 dias | Variantes | Mass | Respiratórios |
| 16/08 | FJ791270 | Traquéias | Frango de Corte | S | 42 dias | Ausente | BR-01 | Respiratórios |
| 17/08 | FJ791269 | Pulmões | Frango de Corte | S | 32 dias | Mass | BR-01 | Respiratórios |
| 18/08 | FJ791261 | Conteúdo Entérico | Frango de Corte | S | 33 dias | Ausente | BR | Entéricos |
| 27/08 | FJ791268 | Conteúdo Entérico | Frango de Corte | S | 30 dias | Ausente | BR-01 | Entéricos |
| 32/08 G10 | FJ791264 | Traquéias | Frango de Corte | S | NI | Ausente | BR-02 | NI |
| 35A/08 | | Pulmões | Matrizes | SE | 36 semanas | Ausente | BR-04 | NI |

Quadro 1 -Amostras de IBV relativas ao presente estudo utilizadas para a geração da árvore genealógica incluindo as 19 amostras cujas sequências foram obtidas no mesmo (em negrito), mostrando o tipo de órgão, tipo de criação, região geográfica de origem, idade das aves, co-circulação de tipos no lotes, genotipo (de acordo com a posição na árvore genealógica) e sinais clínicos. Mass VAC 01 e Mass VAC 02 referem-se a amostras vacinais sorotipo Massachusetts em uso no Brasil.

(Conclusão)

| Amostras de IBV relativas ao presente estudo utilizadas para a geração da árvore genealógica | | | | | | | | |
|--|----------|-------------------|-----------------|--------|------------|---------------|----------|--------------------------------|
| Lote | Genbank | Órgãos | Tipo de criação | Região | Idade | Co-circulação | Genotipo | Sinais |
| 51/08 SF0103 | | Rins | Avós | S | 39 semanas | Ausente | Mass | NI |
| 56/08 | | Conteúdo Entérico | Matrizes | CO | 27 semanas | Ausente | BR-03 | NI |
| 58/08 | | Traquéias | Postura | NE | 23 semanas | Ausente | BR-03 | Respiratórios |
| 60B/08 | | Rins | Matrizes | S | NI | Ausente | BR-03 | NI |
| 62/08 | | Traquéias | Matrizes | S | 30 semanas | Ausente | BR-01 | NI |
| 63/08 | | Rins | Matrizes | S | 30 semanas | Ausente | BR-01 | NI |
| 77/08 | | Conteúdo Entérico | Frango de Corte | SE | 25 dias | Ausente | BR | Entéricos |
| 81/08 | | Traquéias | Postura | S | NI | Ausente | BR-03 | NI |
| 90/08 M1 | | Conteúdo Entérico | Avós | S | 34 semanas | Ausente | BR-03 | Respiratório, Renal e Entérico |
| 100/08 | | Pulmões | Matrizes | S | 47 dias | Ausente | BR-01 | NI |
| 108/08 | | Traquéias | Matrizes | S | 24 semanas | Ausente | BR | NI |
| 112C/08 | | Conteúdo Entérico | Frango de Corte | NE | 43 dias | Ausente | BR | Articular |
| 112C/08 | | Traquéias | Frango de Corte | NE | 43 dias | Ausente | BR | Articular |
| 118F/08 | | Traquéias | Matrizes | S | 37 semanas | Ausente | BR | NI |
| 120/08 | | Conteúdo Entérico | Matrizes | S | 35 semanas | Ausente | BR-04 | NI |
| 122/08 F | | Úteros | Avós | SE | NI | Mass | 4/91 | NI |
| 122/08 F | | Rins | Avós | SE | NI | Mass | 4/91 | NI |
| 127A/08 | | Suabe Traqueal | Matrizes | CO | 35 semanas | Ausente | BR | NI |
| MASS VAC 01 | FJ791274 | | | | | | | |
| MASS VAC 02 | FJ791275 | | | | | | | |

4.4 ANÁLISE GENEALÓGICA

Na árvore genealógica apresentada na figura 9, as 19 sequências geradas no presente estudo segregaram todas em um grande grupamento exclusivo de amostras brasileiras, juntamente com sequências previamente disponíveis no Genbank referentes a outras amostras incluídas no presente estudo, separado dos grupamentos referentes aos genótipos clássicos incluídos para a construção da árvore.

Dezesseis sequências segregaram internamente neste grupamento brasileiro e em quatro possíveis subgrupamentos.

No grupamento denominado de Brasil 01 (BR-01), encontram-se as sequências referentes às amostras 62/08 Traquéias, 63/08 Rins, e 100/08 Pulmões, juntamente com as sequências previamente disponíveis no Genbank das amostras 16/08 Traquéias, 17/08 Pulmões, 34/07 Ovários e 27/08 Conteúdo Entérico, com um valor de bootstrap de 94.

As amostras 56/08 Conteúdo Entérico, 58/08 Traquéias, 60B/08 Rins, 81/08 Traquéias e 90/08 M1 Conteúdo Entérico, cujas sequências foram geradas no presente estudo, e as amostras 12/07 Rins, 27A/07 Úteros e 38/07 Conteúdo Entérico, também referentes a este estudo e já previamente disponíveis, formaram um grupamento denominado de Brasil 03 (BR-03), com um valor de bootstrap de 89.

O grupamento denominado de Brasil 04 (BR-04) foi formado apenas pelas amostras 35A/08 Pulmões e 120/08 Conteúdo Entérico, com bootstrap de 82.

O grupamento Brasil 02 (BR-02) - apresentado na árvore contém as amostras 06/08 Conteúdo Entérico, 01/08 G18 Conteúdo Entérico 21 dias, 01/08 G18 Conteúdo Entérico 35 dias, e 32/08 G10 Traquéias, cujas sequências já estavam disponíveis no Genbank, mas que se referem ao presente trabalho - teve sua nomenclatura mantida por já ter sido descrito em trabalho anterior (BRANDÃO et al., 2009).

As seis sequências restantes (77/08 Conteúdo Entérico, 108/08 Traquéias, 112/08 Conteúdo Entérico, 112C/08 Traquéias, 118/08 F Traquéias e 127A/08 Suabe Traqueal 1), não resultaram em subgrupamentos específicos, segregando, entretanto, no grupamento brasileiro (BR), tendo o mesmo ocorrido para as amostras 10/07 Traquéias, 02/08 Pulmões+Traquéias, 04/08 Úteros e 18/08 Conteúdo Entérico.

Das 19 sequências obtidas, uma (51/08 SF0103 Rins) segregou no grupamento Massachusetts, bem como as amostras 23A/08 Úteros, 03/08 Testículos e 14/08 Pulmões, já previamente disponíveis.

Finalmente, duas amostras (122/08 F Úteros e 122/08 F Rins) foram classificadas como pertencentes ao tipo 4/91 (793B), juntamente com as amostras 35/07 Conteúdo Entérico e 07/08 Traquéias previamente descritas.

Não foram observadas tendências de grupamento das sequências em relação à região geográfica de origem, tipo de criação, tipo de órgão amostrado ou mesmo sinais clínicos quando da tomada das amostras.

Para as variantes brasileiras, considerando os grupos de BR a BR-04, a identidade de aminoácidos variou entre: 42,0% e 44,0% para o sorotipo DE072; 76,9% e 79,7% no sorotipo Massachusetts; 75,8% a 80,1% no sorotipo 4/91; 76,4% a 80,8% no sorotipo California; 77,4% e 80,2% no sorotipo Arkansas; 78,0% e 80,2% no sorotipo Connecticut e 78,0% e 81,1% no sorotipo D274.

Ainda em relação à identidade de aminoácidos, considerados os grupamentos brasileiros, o grupamento BR-04 foi o mais divergente, variando de 86,1% (em relação a BR-01) a 88,0% (em relação a BR). As identidades de aminoácidos encontram-se descritas na tabela 11.

Tabela 11 – Identidade média (em porcentagem) de aminoácidos para os resíduos de 243 a 357 da região S1 da proteína S de IBV (em relação à sequência Z83979) para os grupamentos de amostras estudadas no presente estudo (BR, BR-01, BR-02, BR-03 e BR-04) e os sorotipos Massachusetts (Mass), D274, Arkansas (Ark), California (Cal), DE072, Connecticut (Conn) e 4/91

| Grupos | BR | BR-01 | BR-02 | BR-03 | BR-04 | Mass | D274 | Ark | Cal | DE072 | Conn | 4/91 |
|---------------|-----------|--------------|--------------|--------------|--------------|-------------|-------------|------------|------------|--------------|-------------|-------------|
| BR | 95,0 | 94,4 | 95,8 | 92,8 | 88,0 | 79,7 | 80,1 | 80,1 | 79,8 | 43,1 | 80,1 | 77,7 |
| BR-01 | | 99,5 | 95,7 | 91,4 | 86,1 | 79,2 | 78,9 | 77,4 | 79,2 | 42,0 | 79,5 | 75,8 |
| BR-02 | | | 98,9 | 94,5 | 86,9 | 79,1 | 81,1 | 80,6 | 80,8 | 43,6 | 79,3 | 78,3 |
| BR-03 | | | | 99,0 | 83,7 | 76,9 | 79,1 | 79,5 | 79,5 | 43,8 | 78,0 | 80,1 |
| BR-04 | | | | | 96,4 | 78,3 | 78,0 | 80,2 | 76,4 | 44,0 | 80,2 | 78,1 |

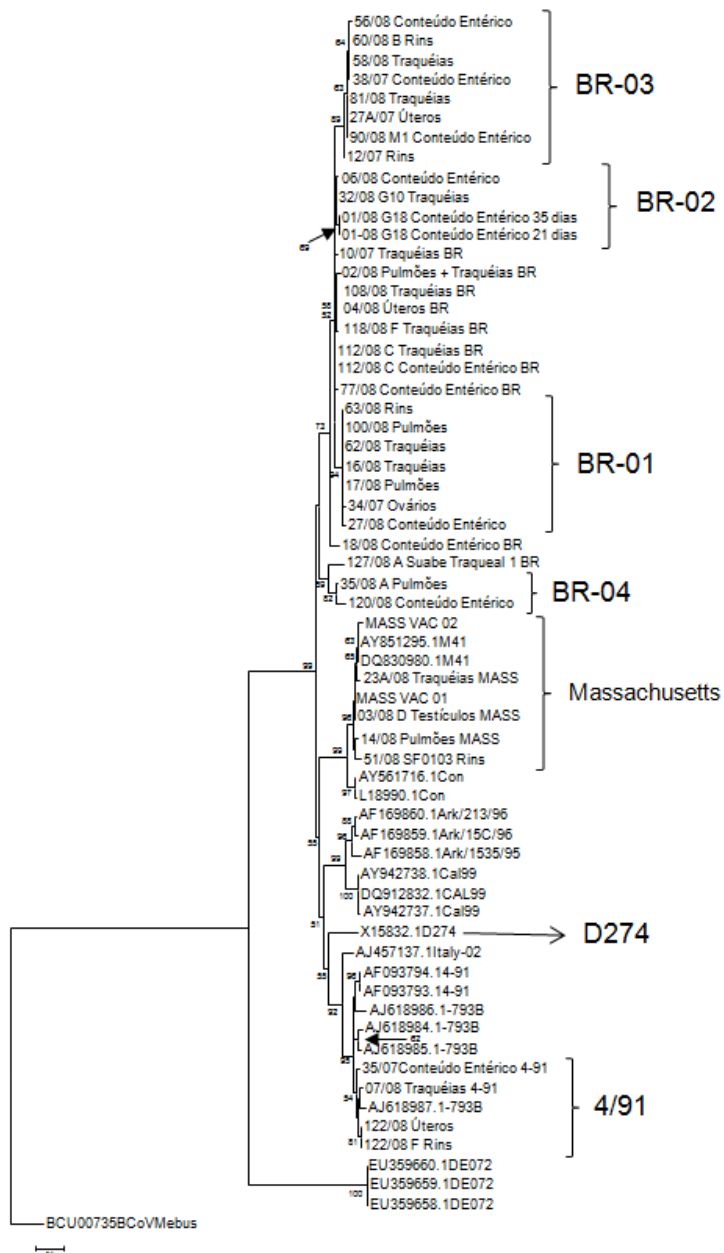


Figura 1 - Árvore genealógica de distância com o algoritmo Neighbor-joining com a correção de Poisson para os aminoácidos 243-357 (referente à amostra UK/7/93, número de acesso no Genbank Z83979) da subunidade S1 da protein S de IBV mostrando os sorotipos/genotipos clássicos e as amostras incluídas no presente estudo (grupamentos BR-01, BR-02, BR-03, BR-04 e BR). Mass Vaccine 01 e Mass Vaccine 02 são duas amostras vacinais também incluídas no estudo. Os números acima de cada nó representam os valores de bootstrap para 1000 repetições (apenas os valores maiores que 50% estão demonstrados). A barra representa o número de inscrições dos aminoácidos por sítio

DISCUSSÃO

“Great spirits have always encountered opposition from mediocre minds. The mediocre mind is incapable of understanding the man who refuses to bow blindly to conventional prejudices and chooses instead to express his opinions courageously and honestly.”

Albert Einstein

5 DISCUSSÃO

O vírus da bronquite infecciosa das galinhas, uma doença viral de elevada complexidade quanto à patogenia, imunologia e epidemiologia e de impacto sobre a indústria avícola, foi detectado no presente estudo de modo disseminado no território brasileiro, em avós, matrizes, poedeiras comerciais e frangos, com diversificada manifestação clínica e sob a forma de linhagens exclusivas do Brasil, com elevada diversidade molecular quando comparadas aos tipos clássicos deste vírus.

A detecção do IBV em 45,50% dos pools de diferentes órgãos testados indica que o IBV pode ser encontrado em elevada frequência de um modo disseminado no organismo das aves.

Inicialmente, deve ser considerado que a detecção de IBV em alguns tipos de amostras analisadas neste estudo pela RT-PCR aqui utilizada não significa necessariamente que a amostra de IBV estivesse se replicando ou causando processos patológicos naquele órgão específico, uma vez que esta RT-PCR não permite a diferenciação entre presença de RNA genômico e presença de transcrição de RNA mensageiro, o que indicaria se o órgão em questão estava infectado ou se a presença de RNA de IBV era devido à viremia, pois sabe-se que, após a replicação do IBV no trato respiratório superior, ocorre a viremia e o vírus torna-se amplamente disseminado para outros tecidos (CUNNINGHAM, 1975; MCMARTIN, 1993; DHINAKAR RAJ; JONES, 1997a).

Considerando o aparelho reprodutivo das fêmeas, sabe-se que o IBV pode infectar aves jovens e adultas, independentemente do estágio de diferenciação deste tecido. A presença de IBV em órgãos reprodutivos de aves adultas pode levar a uma série de danos reprodutivos dependendo da porção do aparelho reprodutivo que foi afetada. A queda severa na produção de ovos se dá pela hipoplasia causada nos ovários e no infundíbulo, deterioração na casca dos ovos como descoloração e formato irregular e, ainda, redução na qualidade interna do ovo devido à hipoplasia glandular causada pelo vírus que leva a redução na síntese de proteínas do albúmen, especialmente a ovomucina e a lisosima além de outras proteínas. (DHINAKAR; JONES, 1997b).

A presença de amostras de IBV no trato reprodutivo de aves jovens, com menos de duas semanas de idade, pode causar lesões permanentes no desenvolvimento do trato reprodutivo, resultando em falsas poedeiras que não chegam normalmente à maturidade sexual (DHINAKAR RAJ; JONES, 1997a; CAVANAGH; NAQI, 2003; DIFÁBIO; VILLARREAL, 2009). Nesse

caso, o terço médio do oviduto é o mais severamente afetado com áreas de hipoplasia localizada (DHINAKAR; JONES, 1997b).

Além disso, as implicações da patogenia de IBV no trato reprodutivo de matrizes e poedeiras podem ser exacerbadas quando da presença de outros patógenos, como, por exemplo, o pneumovírus aviário (COOK, 2000; GOUGH, 2003; VILLARREAL et al., 2007a).

Por sua vez, com a detecção de IBV em 25,00% baços no presente estudo, não se pode, apenas com estes resultados, fazer assertivas acerca do envolvimento deste vírus em processos patológicos neste órgão, embora haja relatos da detecção de uma pouco intensa replicação do vírus no baço, sem, entretanto, nenhum dano funcional ao mesmo (OTSUKI et al., 1990; DHINAKAR RAJ; JONES, 1997a).

Em relação à patogenia de IBV em órgãos linfóides, o mesmo já foi isolado da bursa de Fabricius (EL HOUADFI et al., 1986; AMBALI; JONES, 1990) e lesões macroscópicas e histopatológicas foram demonstradas por infecções experimentais pelos tipos H52 e H120 (MACDONALD; MCMARTIN, 1976), mas a evidência de imunossupressão é limitada (DHINAKAR RAJ; JONES, 1997c).

Além disso, não está claro se o IBV se multiplica nos linfócitos, mas sabe-se que macrófagos obtidos através de cultura foram resistentes à infecção pelo vírus (VON BULOW; KLASSEN, 1983), mas, notavelmente, uma amostra virulenta de IBV foi capaz de induzir transitoriamente a redução das respostas proliferativas dos linfócitos do sangue total (WAKENELL et al., 1995; DHINAKAR RAJ; JONES, 1997a).

É interessante citar que o coronavírus de perus (TCoV) é capaz de se replicar na bursa de Fabricius e levar a significativa imunossupressão (TEIXEIRA et al., 2007), pois, dadas as similaridades genéticas entre o TCoV e o IBV, um possível papel deste último com agente imunossupressor em galinhas é merecedor de uma mais aprofundada investigação.

Para as 66,66% as amostras de conteúdo entérico que resultaram positivas para a presença de IBV pela RT-PCR aqui utilizada, pode-se, inicialmente, sugerir que tal detecção tenha sido consequência da replicação viral nos enterócitos dos vilos, o que já foi relatado como resultando em atrofia destes e causando diarreia por má absorção (SAIF, 1993).

Além disso, o IBV já foi isolado do proventrículo, duodeno e jejuno (AMBALI; JONES, 1990; DHINAKAR RAJ; JONES, 1996), com replicação presumível nas células epiteliais dessas regiões do trato digestório (DHINAKAR RAJ; JONES, 1997a). A replicação deste vírus já foi

relatada em células linfóides e histiócitos das tonsilas cecais (OWEN et al., 1991) e demonstrada por imunofluorescência nas células epiteliais apicais das vilosidades no íleo e no reto (AMBALI; JONES, 1990; DHINAKAR RAJ; JONES, 1996), mas apenas uma amostra específica de IBV, denominada de amostra G, já foi demonstrada como sendo capaz de se replicar em todos os segmentos do intestino (AMBALI; JONES, 1990).

Uma hipótese alternativa para uma mais elevada frequência de detecção de IBV em amostras de conteúdo entérico pode ser a excreção viral, via intestinos, de vírus que, de fato, haviam se replicado e possivelmente causado patogenia em outros órgãos como traquéias, pulmões, trato reprodutivo ou mesmo rins, isto é, o intestino atuaria apenas como uma via excretória de IBV.

Entretanto, no Brasil, o IBV já foi implicado como agente causal de doença entérica nas em aves de produção (VILLARREAL et al., 2007b), demonstrando que amostras enterotrópicas possam de fato estar presentes na região amostrada no presente estudo.

A detecção do IBV em 23,08% dos corações amostrados é um achado mais provavelmente atribuível à viremia citada anteriormente, uma vez que se encontra grande quantidade de sangue dentro desse órgão, podendo então ter sido detectado o vírus presente em leucócitos circulantes e não em replicação no órgão em si.

Ainda que a musculatura cardíaca não tenha sido relatada como susceptível a alterações patológicas causadas por IBV, sabe-se que, por exemplo, o 793B (CR88, 4/91) tem implicações em miopatia peitoral, ainda que a mesma não seja derivada da replicação viral em musculatura, mas sim da deposição de imunocomplexos nas paredes capilares (DHINAKAR RAJ; JONES, 1997a).

Entretanto, deve-se salientar que não foram observadas lesões macroscópicas na musculatura cardíaca dos corações testados, que, até o momento, não permite atribuir qualquer papel cardiomiopático a este vírus.

Ainda com relação ao papel do IBV na etiologia da miopatia, todas as amostras de músculo peitoral testadas (08), enviadas ao laboratório em função de sinais compatíveis com a miopatia peitoral, foram negativas para a presença de IBV, podendo, as lesões que estavam presentes na musculatura terem sido decorrentes de outras causas não investigadas no presente estudo.

Em 35,29% dos fígados testados havia o IBV. O IBV já foi isolado do fígado (ALEXANDER; GOUGH, 1977; AMBALI; JONES, 1990), mas não está comprovado se causa algum dano funcional a esse órgão (DHINAKAR RAJ; JONES, 1997a) e, por se tratar de um órgão altamente irrigado, pode-se entender que o vírus possa ter chegado ao fígado por viremia.

Diferentemente, o encontro de IBV em 49,33% das traquéias e em 45,18% dos pulmões pode ser decorrente da infecção inicial do trato respiratório superior, na qual o vírus invade as células epiteliais da traquéia e as células secretoras de muco da traquéia levando-as à degeneração e possibilitando infecções secundárias (DHINAKAR RAJ; JONES, 1997a).

Embora o IBV não seja considerado a causa da pneumonia, pequenas áreas de pneumonia são observadas nos pulmões de aves infectadas por este vírus (CAVANAGH, 2007). Considerando que o trato respiratório superior é o principal sítio de replicação do IBV (DHINAKAR RAJ; JONES, 1997a), o vírus pode ser disseminado para o meio ambiente através de aerossóis pelo espirro e pela descarga nasal das aves, o que eleva a probabilidade de sua transmissão a novos susceptíveis.

A frequência do IBV nos testículos testados foi baixa (16,00%), mas a presença do vírus nos testículos leva a implicações na fertilidade dos machos e, embora o IBV tenha sido associado como uma das possíveis causas da formação de cálculos testiculares no epidídimo, uma associação definitiva ainda não foi estabelecida (VILLARREAL et al., 2007a).

A vacinação com IBV atenuado tem sido associada à indução do desenvolvimento de cálculos e consequente redução na fertilidade (BOLTZ et al., 2004). Em estudos prévios em machos, foi demonstrado que diferentes variáveis podem alterar a produção de sêmen fértil, incluindo a presença de cálculos na região epididimal, mais especificamente nos ductos eferentes, como baixo peso testicular e diminuição na produção diária de sêmen (JANSEN et al., 2000; BOLTZ et al., 2004).

Nos rins testados foi detectado o IBV em 50,36%. Nas aves das quais algumas das amostras de rins foram tomadas, observaram-se cálculos renais. Alguns tipos de IBV têm demonstrado nefropatogenicidade, sendo responsáveis por dar aos rins das aves infectadas um aspecto pálido e edemaciados, com os túbulos e ureteres distendidos por cálculos de uratos (CUMMING, 1963). Os valores do hematócrito dessas aves diminuem e os níveis de ácido úrico plasmático aumentam (AFANADOR; ROBERTS, 1994), podendo se estabelecer nefrite crônica (CHONG; APOSTOLOV, 1982).

A detecção do IBV em um *pool* de claras indica a possibilidade de transmissão vertical do vírus, como já relatado em investigações com ovos de galinhas infectadas experimentalmente (COOK, 1971), podendo-se especular a possibilidade de implicações patológicas para os embriões em casos de ovos férteis, uma vez que estes são o mais eficiente modelo biológico para isolamento de IBV (GUY, 2008).

Apesar da detecção de IBV nos ovos de poedeiras comerciais, o risco para o consumo humano é provavelmente insignificante, pois, até o momento, não há relatos da transmissão desse vírus para seres humanos.

A detecção de IBV através de suabes traqueais, como obtido em 41,67% amostras no presente estudo, pode ser considerada como um procedimento diagnóstico de elevado valor, uma vez que torna possível a amostragem *in vivo*, além do fato de que, inicialmente e em menor ou maior intensidade, todos os tipos de IBV se replicam na traquéia primeiramente para depois se disseminarem pelo organismo até atingir um órgão preferencial (CAVANAGH; NAQI, 2003).

Com isto, tem-se que, após a aplicação da RT-PCR aos diversos tipos de amostras biológicas aqui testadas, amostras de conteúdo entérico foram aquelas que permitiram uma maior frequência de detecção deste vírus e, para fins de estudos populacionais com levantamento de ocorrência ou vigilância epidemiológica em bronquite infecciosa das galinhas, estas amostras poderiam ser eleitas como preferenciais em caso de impossibilidade de testes em um número maior ou mais diverso de amostras por questões logísticas ou econômicas em diversos laboratórios.

Em amostras com mais de um órgão por *pool*, como foi o caso de dez amostras do presente estudo, não foi possível determinar o órgão exato responsável pela positividade, mas deve-se considerar que o processamento em forma de *pools* de diversos órgãos pode ser útil por minimizar o número de amostras testadas por ave e por lote e por facilitar o processamento.

Há, ainda, algumas considerações a serem feitas em relação aos *pools* de órgãos testados que podem ter enviesado os resultados aqui encontrados, como o número baixo de amostras de alguns órgãos como baços e fígados, o que impossibilita uma avaliação estatística em relação aos demais órgãos como traquéias, pulmões e conteúdos entéricos, por exemplo.

Além disso, deve-se levar em conta, também, a possibilidade de contaminações entre os órgãos amostrados durante a colheita a campo e, por fim, a possibilidade de as aves amostradas

estarem em período de excreção viral pós-vacinal (DE WIT, 2000), o que levaria à detecção de genoma de amostras vacinais ao invés de amostras de campo.

Quando considerados os lotes como unidade amostral, notou-se uma frequência elevada, uma vez que em 73,50% dos lotes foi detectada a presença do IBV em pelo menos um tipo de *pool* de amostras.

Nos lotes positivos para IBV sem informação de sinais pode-se afirmar que o vírus esteve presente no lote, o que é significativo para a sanidade do plantel em questão, ainda que não possa ser relacionado a doenças.

Os sinais articulares não são classicamente associados à infecção por IBV. Apesar disso, foi detectado o vírus em lotes de aves que apresentavam tais sinais. Provavelmente esse processo observado nas articulações fosse devido à presença de outro patógeno, como por exemplo, o reovírus aviário que causa processos articulares nas aves (JONES, 2000).

Os lotes positivos para a presença de IBV, mas que não apresentaram quaisquer sinais clínicos, poderiam estar, ainda, no período de incubação após a infecção viral, que varia de 18 a 36 horas dependendo da via de inoculação (CAVANAGH; NAQI, 2003; DI FÁBIO; VILLARREAL, 2009).

Por sua vez, os lotes que foram negativos para a presença de IBV e que apresentaram sinais reprodutivos e renais provavelmente foram acometidos por outros patógenos capazes de levar a manifestações clínicas que possam ser confundidas com aquelas referentes à bronquite infecciosa das galinhas (CAVANAGH; NAQI, 2003), patógenos estes não pesquisados nesse estudo.

A partir dos resultados obtidos foi possível notar que o IBV está amplamente distribuído em todas as regiões geográficas de importância na criação de aves no Brasil.

As diferenças nas frequências entre as regiões geográficas se devem mais provavelmente às características regionais de densidade populacional das aves, dos tipos de criações existentes, da intercorrência de outros patógenos e da distribuição da importância econômica daquela determinada região dentro do cenário da avicultura nacional.

Por exemplo, a região Sul é aquela com maior concentração de aves, com 47,45% do total de aves do Brasil (IBGE, 2006). O tipo de criação predominante nessa região é a de frango de corte, porém é a segunda região na criação de poedeiras comerciais, possuindo, ao todo, mais de 600 bilhões de cabeças de aves (IBGE, 2006).

Assim, a elevada frequência do IBV nessa região (81,61%) pode ser primariamente atribuída à alta densidade populacional de aves, aliado ao fato do tipo de criação predominante ser o de frango de corte, pois, neste tipo de criação, as aves ficam mais adensadas, havendo muitas aves dividindo um pequeno espaço físico, aumentando o contato entre as aves e dessas com as excreções nasais, orais e fecais de possíveis aves infectadas pelo IBV.

Além disso, há o fato de as granjas serem próximas e, ainda, de haver lotes muito próximos fisicamente dentro de uma mesma granja. Tais fatores favoreceriam a propagação do vírus entre as aves.

Por sua vez, para a região Sudeste, que comporta 32,24% das aves do Brasil (IBGE, 2006), foi encontrada no presente estudo uma frequência do IBV de 56%. A diferença da frequência da região Sudeste para a região Sul pode ser devido ao fato de possuir criações com níveis elevados de biossegurança além de ser a principal região brasileira na postura comercial.

Nos últimos anos a região Centro-oeste tem se tornado expoente na avicultura brasileira e, atualmente, detém 12,11% da população de aves do país (IBGE, 2006), sendo que grandes empresas avícolas tem se instalado nessa região, aumentando a sua importância econômica. Apesar da elevada frequência de IBV detectada (90%), seria necessário aumentar o número de lotes amostrados dessa região para se analisar de uma forma comparável em relação às outras regiões, uma vez que apenas 10 lotes provenientes do Centro-Oeste do Brasil foram analisadas.

Na região Nordeste, detentora de 6,78% do total das cabeças de aves do Brasil (IBGE, 2006), também seria necessário uma amostragem maior para uma melhor análise da região. A elevada ocorrência do IBV, 65,38%, pode ser devido uma biossegurança mais relaxada dessa região quando comparadas às das regiões Sul e Sudeste, ou seja, menores biossegurança e controle vacinal, associada ao clima mais quente do que nas outras regiões, o que seria um fator de estresse para as aves aumentando a suscetibilidade a agentes patogênicos.

Notou-se ampla distribuição do IBV entre todos os tipos de criação: tanto avós, matrizes, poedeiras comerciais e frangos de corte apresentaram elevada frequência desse vírus.

A variação entre as frequências do IBV entre os tipos de criação pode ser atribuída de modo direto a diferenças presentes entre as criações como, por exemplo, densidade populacional, manejo, tipo de instalações, tempo de vida, imunização ao longo da vida e biossegurança.

As avós são o primeiro elo da cadeia produtiva avícola, e, por darem origem às matrizes têm elevada importância sanitária e econômica. Por isso, essas aves são criadas em ambientes

altamente tecnificados, com ótimos programas de biossegurança, com manejo cuidadoso, com rígido controle sanitário e com programa vacinal eficiente. Apesar de todas estas medidas profiláticas, a frequência do IBV nos lotes de avós foi de 50%. Essa frequência elevada nesse tipo de criação poderia indicar, primariamente, que a vacinação não estaria sendo eficaz contra o IBV e, visto que as avós possuem um longo período de vida, são passíveis de um número maior de episódios de exposição ao IBV.

A frequência do IBV nas matrizes foi elevada, 74,24% dos lotes de matrizes apresentaram o vírus. Esse tipo de criação também é altamente tecnificado, com eficientes programas de biossegurança. O que se contrapõe a frequência observada. As matrizes possuem longo tempo de vida e, frente à anteriormente sugerida baixa eficiência de amostras vacinais para a proteção à infecção, torna-se, também neste caso, possível a exposição continuada e a infecção por sucessivas vezes nestas aves.

Apesar de as poedeiras comerciais serem criadas em gaiolas suspensas, ou seja, não permanecem em contato direto com as excreções nasais, orais e fecais umas das outras e com densidade populacional menor do que na criação de frango de corte, a frequência observada de 63,64% para amostras positivas para IBV foi elevada neste tipo de aves, podendo aqui ser elencados os mesmos fatores de risco como baixa eficiência de amostras vacinais na prevenção e prolongado tempo de vida.

A elevada frequência de detecção de IBV nos frangos (85,42%) pode ser inicialmente associada à alta densidade populacional dentro dos lotes, ao contato direto entre as aves e dessas com as excreções nasais, orais e fecais de possíveis aves infectadas, além de uma menor biossegurança quando comparada àquela inerente a matrizes, por exemplo.

Outra significativa diferença em frangos é que, pelo curto período de vida dessas aves, algumas granjas optam por não fazer a vacinação contra o IBV e aquelas que realizam a vacinação o fazem apenas uma vez, o que poderia diminuir a imunidade individual ou de rebanho contra o IBV, elevando, assim, sua frequência de ocorrência.

Em relação à classificação das amostras de IBV encontradas em genótipos/sorótipos Massachussets, 4/91, D274 e genótipos Variante (no presente estudo assim denominadas por não pertencerem a um destes três tipos) pela técnica de *multiplex* RT-PCR, encontrou-se predomínio do genótipo Variante (84,63%), com apenas 9,89% das amostras genotipadas como Massachussets.

Inicialmente, pode-se atribuir tal predomínio de genótipos Variantes à reduzida proteção cruzada entre alguns tipos de IBV (DE WITT, 2000; LANDMAN et al., 2006) o que, associado ao fato da utilização exclusiva do tipo Massachusetts em vacinas atenuadas no Brasil, permitiria a disseminação continuada dos genótipos Variantes em questão e a já comentada elevada frequência de ocorrência de IBV e de formas clínicas da bronquite infecciosa das galinhas encontradas no presente estudo.

Detectou-se, também, o predomínio do genótipo Variante em todos os órgãos analisados e nos mais diversos sinais clínicos apresentados pelos lotes estudados, bem como em todas as regiões geográficas de origem e em todos os tipos de criação estudados, o que evidencia que as causas e as consequências da elevada frequência de variantes de IBV estão disseminados em todas as regiões geográficas de origem e em todos os tipos de criação.

O genótipo/sorotipo 4/91 (CR88, 793B), detectado em 04 amostras, não esteve associado à lesão peitoral e sim à síndrome da má absorção e em algumas amostras à diarreia. Demonstrase, assim, que tal genótipo, além da associação tentativa à miopatia peitoral, pode ser encontrado no Brasil em casos clínicos mais diversos, como já relatado em outros países (DHINAKAR RAJ; JONES, 1997a).

Considerando-se a ocorrência de co-circulação de mais de um tipo viral, houve co-circulação de 4/91 e Massachusetts e 4/91 e Variante em lotes de matrizes, de avós e de frangos de corte, pertencentes às regiões Sul e Sudeste do Brasil, o que pode ser mais uma das consequências da baixa imunidade apresentada pelas aves que compõem o plantel avícola brasileiro.

A ocorrência de mais de um tipo viral em uma mesma população de aves não apenas torna possível a emergência de vírus recombinantes, mas também permite a manifestação de uma maior diversidade de sinais clínicos associados a este ou àquele tipo viral, elevando a complexidade da epidemiologia da bronquite infecciosa das galinhas.

Considerando-se a técnica de *multiplex* RT-PCR utilizada para a classificação de tipos de IBV, algumas ressalvas devem ser expostas para uma mais completa compreensão do alto número de Variantes encontrado.

Seria possível, por exemplo, que excessos de c-DNA nas fases de PCR ou DNA produzido na primeira amplificação e adicionado à fase de *nested*-PCR causassem inibição da amplificação, visto que tais excessos são inibidores de PCR (ASANO, 2009).

Entretanto, como apresentado em Materiais e Métodos, foram realizadas as eletroforeses não apenas para os produtos das reações *nested*, mas também daqueles referentes às primeiras amplificações para cada uma das amostras em tipificação exatamente com o intuito de se detectarem excessos de DNA que pudessem inibir a fase de *nested* e, como não houve a detecção de tal produto de primeira amplificação, o efeito inibitório de excesso de DNA foi minimizado em relação aos resultados aqui obtidos.

Outro ponto crítico a ser considerado são os *primers* utilizados para a tipificação. Neste tópico, a baixa diversidade de genotipos previstos nestes *primers* (Massachusetts, 4/91 e D274) pode ter classificado como variantes amostras que, na verdade, pertencem a qualquer dos demais tipos de IBV conhecidos, não sendo necessariamente passíveis da estrita classificação como variantes.

Ainda, é possível que reações falso-negativas em tipificação tenham sido geradas por ausência de eficiente hibridação dos *primers* a seus alvos em função de polimorfismos existentes no genoma de amostras pertencentes a um dos três tipos virais previstos pelo conjunto de *primers* utilizados. Entretanto, com o intuito de se minimizarem também os efeitos desta variável, os *primers* sugeridos por Cápua et al. (1999) foram modificados a partir de suas sequências originais a partir de sequências obtidas no Genbank, tendo sido introduzidos nucleotídeos degenerados, segundo item 3.5, para elevar a sensibilidade das reações.

Assim, com o intuito de se examinar com maior proximidade a identidade de algumas das amostras classificadas como variantes, aplicou-se uma RT-PCR dirigida à amplificação parcial da sequência codificadora da subunidade S1 da proteína de espícula a 28 amostras tomadas como representativas das regiões geográficas de origem, tipos de aves e sinais clínicos por estas apresentados e órgão analisados.

Destas 28 amostras, foram obtidas 19 sequências viáveis para a análise genealógica. Uma série de variáveis, como a ineficiência de *primers* para as reações de sequenciamento, baixa concentração de DNA adicionado à reação de sequenciamento ou mesmo perdas durante a fase de purificação do *amplicon* a partir dos géis de agarose ou na fase de precipitação com propanol/etanol após a reação com os dideoxi-nucleotídeos pode ter se somado para impedir a obtenção de sequências para todas as amostras em questão.

Para estudos futuros, estes pontos críticos podem ser aprimorados, sobretudo aqueles referentes ao aumento da concentração de DNA-alvo para sequenciamento como, por exemplo,

produção de *amplicons* em volumes maiores para purificação a partir de géis de agarose ou mesmo uma mais detalhada padronização da reação pela titulação de reagentes como BigDye, tampão de reação e *primers*.

Destas 19 seqüências, 16 segregaram em um grupamento exclusivo, à parte daqueles referentes aos tipos clássicos de IBV. A existência de um genotipo tipicamente brasileiro de IBV é um fato já relatado anteriormente (VILLARREAL et al., 2006a, b; MONTASSIER et al., 2008; BRANDÃO et al., 2009) e sua emergência pode ser sugerida como derivada de mutações de aminoácidos que foram selecionadas de modo positivo em função do contínuo uso do genotipo/sorotipo Massachusetts em vacinas, sobretudo quando se considera a baixa identidade de aminoácidos entre as amostras do genotipo brasileiro e aquelas pertencentes ao genotipo/sorotipo Massachusetts, como exposto na tabela 11.

Estudos prévios (CAVANAGH et al., 1997; LANDMAN et al., 2006) demonstraram que amostras de IBV com identidades de aminoácidos elevadas nas seqüências de S1 induzem altos níveis de proteção-cruzada do que amostras que tinham pouca identidade nas seqüências.

Tais estudos também demonstraram que amostras de IBV com baixa identidade em S1 promovem baixa ou inconsistente proteção-cruzada. Por exemplo, amostras com identidade de aminoácidos menor ou igual a 74% em S1 resultaram em baixa proteção cruzada em experimentos em frangos (LANDMAN et al., 2006).

Ainda, pequenas diferenças nos aminoácidos localizados nas regiões de maior imunodominância da proteína de espícula podem ser suficientes para causar discrepâncias nas correlações entre as seqüências e o valor de proteção relativa (*PRV*) (CAVANAGH et al., 1992).

Assim, pode-se especular que a consequência da baixa proteção cruzada resultante da baixa identidade de aminoácidos entre o genotipo brasileiro e o genotipo/sorotipo vacinal (Massachusetts) é a disseminação livre e continuada do genotipo, elevando a diversidade molecular do IBV e a ocorrência da bronquite infecciosa das galinhas no Brasil, como demonstrado pelas evidências de elevada freqüência de detecção por RT-PCR.

Esta mesma evolução rápida das linhagens de IBV no Brasil pode ser a base da emergência das quatro sublinhagens deste vírus segregadas internamente ao grupo de linhagens classificadas no genótipo brasileiro (Figura 1). Com respeito a estas sublinhagens, não foram identificadas tendências de agrupamentos em termos de regiões geográficas, tipos de aves, órgãos analisados ou mesmo sinais clínicos, o que pode ser interpretado como evidência da

disseminação destas sublinhagens no Brasil de sua implicação nos mais diversos processos associados à infecção por IBV.

Foram encontradas, ainda, duas outras amostras (122/08 F Úteros e 122/08 F Rins) além daquelas cujas seqüências já estavam disponíveis (35/07 Conteúdo Entérico e 07/08 Traquéias) classificadas como pertencentes ao genótipo 4/91 (CR88, 793B).

Estas amostras foram encontradas em aves sem envolvimento em miopatia peitoral e as vias para sua entrada no Brasil podem apenas ser especuladas neste momento como associadas a aves migratórias, o que já foi sugerido em casos de introdução de genótipos de IBV (CAVANAGH, 2005; LIU et al., 2005), ou mesmo a importação de aves provenientes de países que possuam esse genótipo/sorotipo.

Quatro das amostras estudadas foram classificadas no grupo do genótipo/sorotipo Massachusetts sem que fosse possível, entretanto, determinar sua origem como sendo de fato amostras de campo deste tipo viral ou amostras vacinais detectadas pelo longo período de excreção de vacinas, que pode ser de até sete meses (DE WIT, 2000).

Nota-se que para as amostras 35/07 Conteúdo Entérico, 07/08 Traquéias, 122/08 F Úteros e 122/08 F Rins, e 03/08 Testículos, 14/08 Pulmões e 51/08 Rins, houve discrepância entre as tipificações realizadas pela *multiplex* RT-PCR e aquela obtida por sequenciamento de DNA: genótipos classificados como Variantes pela primeira técnica foram identificados como sendo 4/91 ou Massachusetts, respectivamente, na análise genealógica de S1.

Este é um achado de elevada relevância, pois, como exposto anteriormente nesta Discussão, é possível que, por variados artefatos da tipificação pela técnica de RT-PCR, ocorram resultados do tipo falso-negativo que podem superestimar a ocorrência de variantes.

Com isto, pode-se propor, para um entendimento mais acurado da ocorrência de variantes, que a tipificação por RT-PCR seja sempre seguida por sequenciamento de DNA e respectiva análise genealógica.

Atualmente no Brasil, a principal discussão no que tange o controle da bronquite infecciosa das galinhas é a necessidade ou não da introdução de mais um sorotipo de IBV em forma atenuada às formulações vacinais, em adição ao sorotipo Massachusetts já utilizado.

Há uma tendência, neste tópico, de se basear a seleção de tal tipo vacinal em seqüências de nucleotídeos do gene codificador da proteína de espícula, o que já foi demonstrado como um

enfoque racional tomado como início em outros países onde outros tipos vacinais já foram introduzidos.

A partir da tabela de identidade de aminoácidos (Tabela 11), nota-se que os sorotipos com maior proximidade com as amostras classificadas no genotipo brasileiro foram, em ordem crescente, Connecticut, D274 e Arkansas. Entretanto, a área em análise não foi validada por estudos de proteção cruzada para a determinação de marcadores moleculares para inferência de proteção entre tipos diferentes de IBV.

Assim, ainda que, de modo indiscutível haja no Brasil uma elevada frequência de ocorrência de IBV e de genotipos distantemente relacionados ao genotipo/sorotipo Massachusetts, a seleção de tipos vacinais deve sempre levar em consideração a capacidade de proteção cruzada entre vacinas e isolados de campo de IBV por meio de testes de proteção *in vivo*.

Ainda para uma mais completa compreensão da epidemiologia da bronquite infecciosa das galinhas, são necessários aprimoramentos em métodos de diagnóstico, sobretudo em reações de RT-PCR com o desenvolvimento de *primers* baseados em sequências mais diversas do IBV publicadas recentemente em bancos de dados genéticos e com a adaptação destes às técnicas baseadas em PCR quantitativa, a qual permitiria não apenas a detecção viral, mas também sua quantificação visando estudos em patogenia viral em associação com dados de sequências de genes codificadores de proteínas não estruturais do vírus, implicáveis em virulência viral e que poderiam auxiliar na elucidação das diferentes manifestações clínicas da doença.

CONCLUSÕES

*“The significant problems we have cannot be solved at the same level of thinking with
which we created them.”*

Albert Einstein

6 CONCLUSÕES

Com base nos resultados apresentados e na discussão desenvolvida, pode-se concluir que:

- A frequência de IBV, a partir de amostras de diversos órgãos e conteúdo entérico de avós, poedeiras, matrizes e frangos, com base no diagnóstico por semi-nested RT-PCR dirigida à região 3'UTR do vírus, é elevada nas regiões Nordeste, Sudeste, Centro-Oeste e Sul do Brasil, sendo a frequência total encontrada de 73, 5% quando se consideram lotes como unidade amostral.
- Há predomínio de amostras de IBV genotipadas como variantes quando se compara com o tipo Massachusetts em todos os tipos de criação e em todas as regiões geográficas estudadas.
- Não há particularidade de sinais clínicos apresentados pela aves infectadas pelo genótipo Variante.
- Com base em seqüenciamento parcial da região codificadora da subunidade S1 da proteína S do IBV, há pelos menos quatro sublinhagens virais no plantel avícola brasileiro, sendo todos agrupáveis em um genótipo Brasileiro exclusivo, além da existência de amostras pertencentes ao genótipo 4/91 (793B, CR88) e outras ao genótipo Massachusetts.

REFERÊNCIAS

“Every day I remind myself that my inner and outer life are based on the labors of other men, living and dead, and that I must exert myself in order to give in the same measure as I have received and am still receiving.”

Albert Einstein

REFERÊNCIAS

- ABEF: ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DOS EXPORTADORES DE FRANGO . **Relatório Anual 2008/2009**. Disponível em: <http://www.abef.com.br/portal/_clientes/abef/cat/Abef%20RA_4021.pdf>. Acesso em: 21 de setembro 2009.
- ABEF: ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DOS EXPORTADORES DE FRANGO. **Desempenho Anual 2008**. Disponível em: <http://www.abef.com.br/noticias_portal/exibenoticia.php?notcodigo=814>. Acesso em: 21 de setembro 2009.
- ABRAHAM, S.; KIENZLE, T. E.; LAPPS, W.; BRIAN, D. A. Deduced sequence of the bovine coronavirus spike protein and identification of the internal proteolytic cleavage site. **Virology**, v. 176, p. 296-301, 1990.
- ABREU, J. T.; RESENDE, J. S.; FLATSCHART, A. V. F.; MENDES, A. C. R.; MARTINS, N. R. S.; SILVA, C. B. A.; FERREIRA, M. C.; MACHADO, A. L. C. Genotipificação de isolados do vírus da bronquite infecciosa das galinhas (VBIG) pelo sequenciamento de parte de S2 e do segmento de S1. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, p. 210, 2006. Suplemento 8.
- ALEXANDER, D. J.; GOUGH, R. E. Isolation of avian infectious bronchitis virus from experimentally infected chickens. **Research in Veterinary Science**, v. 23, p. 344-347, 1977.
- AMBALI, A. G.; JONES, R. C. Early pathogenesis in chicks of infection with an enterotropic strain of infectious bronchitis virus. **Avian Diseases**, v. 34, p. 809-817, 1990.
- ASANO, K. M. **Detecção simultânea de coronavírus bovino e rotavírus através de uma multiplex hemi-nested RT-PCR**. 2009. 78 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.
- BOLTZ, A. D.; NAKAI, M.; BAHR, J. M. Avian infectious bronchitis virus: a possible cause of reduced fertility in the rooster. **Avian Diseases**, v. 48, p. 909-915, 2004.
- BRANDÃO, P. E.; SANDRI, T. L.; SOUZA, S. P.; KUANA, S. L.; RICHTZENHAIN, L. J.; VILLARREAL, L. Y. B. Recombination, point mutations and positive selection on the basis of the molecular diversity of Brazilian strains of avian infectious bronchitis virus. In: **VI. International Symposium on Avian Corona and Pneumoviruses and Complicating Pathogens**, p. 47-55, 2009.
- BRENTANO, L.; ESTEVES, P. A.; TREVISOL, I. M.; HAYASHI, M. M.; LUCIANO, R. L.; CASTRO, A. G. M.; KLEIN, T. A. P.; MOLINARI, M.. Sequenciamento do gene S1 de vírus de bronquite infecciosa (IBV) isolados de surtos da doença associada a lesões de miopatia peitoral.. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, p. 241, 2006. Suplemento 8.

CÁPUA, I.; MINTA, Z.; KARPINSKA, E.; MAWDITT, K.; BRITTON, P.; CAVANAGH, D.; GOUGH, R. E. Co-circulation of four types of infectious bronchitis virus (793/B, 624/1, B1648 e Massachusetts). **Avian Pathology**, v. 28, p. 587-592, 1999.

CAVANAGH, D. Coronavirus avian infectious bronchitis virus. **Veterinary Research**, v. 38, p. 281-197, 2007.

CAVANAGH, D. The coronavirus surface glycoprotein. In: SIDDELL, S. G. **The Coronaviridae**. New York: Plenum. 1995. p. 73-113.

CAVANAGH, D.; DAVIS, J. Coronavirus IBV: removal of spike glycoprotein S1 by urea abolishes infectivity and hemagglutination but not attachment to cells. **Journal of General Virology**, v. 67, p. 1443-1453, 1986.

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

CAVANAGH, D.; ELLIS, M. M.; COOK, J. K. A. Relationship between variation in the S1 spike protein of infectious bronchitis virus and the extent of cross-protection. **Avian Pathology**, v. 26, p. 63-74, 1997.

CAVANAGH, D.; MAWDITT, K.; WELCHMAN, D. 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 Pathology**, v. 31, n. 1, p. 81-93, 2002.

CAVANAGH, D.; NAQI, S. A. Infectious bronchitis. In: CALNEK, B.W.; BARNES, H.J.; BEARD, C. W.; McDOUGALD, L.R. **Diseases of Poultry**, 10th ed. Ames, IA; Iowa State University Press, 2003. p. 511-526.

CHONG, K. T.; APOSTOLOV, K. The pathogenesis of nephritis in chickens induced by infectious bronchitis virus. **Journal of Comparative Pathology**, 92, p. 199-211, 1982.

CHOULSALKAR, K. K.; ROBERTS, J. R. Ultra structural study of infectious bronchitis virus infection in infundibulum and magnum of commercial laying hens. **Veterinary Microbiology**, v. 122, n. 3-4, p. 223-236, 2007.

CLARK, M. A. Bovine coronavirus. **British Veterinary Journal**, v. 149, n. 1, p. 51-70, 1993.

COLLINS, A. R.; KNOBLER, R. L.; POWELL, H.; BUCHMEIER, M. J. Monoclonal antibodies to murine hepatitis virus-4 (strain JHM) define the viral glycoprotein responsible for cell attachment and cell-cell fusion. **Virology**, v. 119, p. 358-371, 1982.

COOK, J. K. A. Avian pneumovirus infections in turkeys and chickens. Review. **Veterinary Journal**, v. 160, p. 118-125, 2000.

COOK, J. K. A. Bronquite infecciosa aviária: situação mundial e distribuição de sorotipos. In: SIMPÓSIO SOBRE SANIDADE AVÍCOLA, FACTA, 1997, São Paulo. Anais, São Paulo: Fundação Apinco de Ciência e Tecnologia Avícola, 1997. p. 13-27.

COOK, J. K. A.; ORBELL, S. J.; WOODS, A. M.; HUGGINS, M. B. Breadth of protection of the respiratory tract provided by different live-attenuated infectious bronchitis vaccines against challenge with infectious bronchitis viruses of heterologous serotypes. **Avian Pathology**, v. 28, p. 477-485, 1999.

CUNNINGHAM, C. H. Immunity to avian infectious bronchitis. **Developments in Biological Standardization**, v. 28, p. 546-562, 1975.

CYR-COATS, K. ST.; STORZ, J. Bovine coronavirus-induced cytopathic expression and plaque formation: host cell and virus strain determine trypsin dependence. **Journal of Veterinary Medicine, series B**, v. 35, p. 48-56, 1988.

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

DHINAKAR RAJ, G.; JONES, R. C. Effect of T-cell suppression by ciclosporin on primary and persistent infections of infectious bronchitis virus in chickens. **Avian Pathology**, v. 26, p. 257-276, 1997c.

DHINAKAR RAJ, G.; JONES, R. C. Growth of infectious bronchitis virus vaccines in oviducts derived from oestrogen-treated chicks and embryos. **Vaccine**, v. 15, n. 2, p. 163-168, 1997b.

DHINAKAR RAJ, G.; JONES, R. C. Immunopathogenesis of infection in SPF chicks and commercial broilers of a variant infectious bronchitis virus of economic importance. **Avian Pathology**, v. 21, p. 651-658, 1996.

DHINAKAR RAJ, G.; JONES, R. C. Infectious bronchitis virus: immunopathogenesis of infection in the chicken. **Avian Pathology**, v. 26, n. 3, p. 677-706, 1997a.

DI FÁBIO, J.; ROSSINI, L. I.; ORBELL, S. J.; PAUL, G.; HUGGINS, M. B.; MALO, A.; SILVA, B. G. M.; COOK, J. K. A. Characterization of Infectious Bronchitis viruses isolated from outbreaks of disease in commercial flocks in Brazil. **Avian Diseases**, v. 44, p. 582-589, 2000.

DI FÁBIO, J.; VILLARREAL, L. Y. B. Bronquite Infecciosa das Galinhas. In: BERCHIERI JR., A.; SILVA, E. N.; DI FÁBIO, J.; SESTI, L.; ZUANAZE, M. A. F. **Doença das aves**. 2. ed. Campinas: Fundação APINCO de Ciência e Tecnologia Avícolas, 2009. p. 631-648.

EL HOUADFI, M. D.; JONES, R. C.; COOK, J. K. A.; AMBALI, A. G. The isolation and characterization of six avian infectious bronchitis virus isolated in Morocco. **Avian Pathology**, v. 15, p. 93-105, 1986.

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

GONZÁLEZ, J. M.; GOMEZ-PUERTAS, P.; CAVANAGH, D.; GORBALENYA, A. E.; ENJUANES, L. A comparative sequence analysis to revise the current taxonomy of the family *Coronaviridae*. **Archives of Virology**, v. 148, p. 2207-2235, 2003.

GOUGH, R. E. Avian pneumoviruses. In: SAIF, Y. M.; BARNES, H. J.; FADLY, A. M.; GLISSON, J. R.; MCDOUGALD, L. R.; SWAYNE, D. E. **Diseases of poultry**. 11th ed., Ames, IA: Iowa State University Press, 2003. p. 92-99.

GUY, J. S.. Isolation and propagation of coronaviruses in embryonated eggs. **Methods in Molecular Biology**, v. 454, p. 109-117, 2008.

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

HOLMES, K. V.; LAI, M. M. C. *Coronaviridae*: the viruses and their replication. In: FIELDS, B. N.; KNIPE, D. M.; HOWLEY, P. M. **Virology**. 3. ed. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers, 1996. p. 1075-1093.

HONDA, E.; TAKAHASHI, H.; OKAZAKI, K.; MINETOMA, T.; KUMAGAI, T. The multiplication of transmissible gastroenteritis viruses in several cell lines originated from porcine kidney and effects of trypsin on the growth of the viruses. **Japanese Journal of Veterinary Sciences**, v. 52, n. 2, p. 217-224, 1990.

IBGE: INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Censo Agropecuário 2006**. Disponível em:
<http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/agropecuaria/censoagro/brasil_2006/Brasil_censoagro2006.pdf>. Acesso em: 04 de dezembro de 2009.

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

JANSEN, S. J.; KIRBY, J. D.; HESS, R. A.; RHOADS, M.; BUNICK, D.; BAILEY, K. L.; PARSONS, C. M.; WANG, H.; BAHR, J. M. Reduced fertility in roosters with epididymal calcium stones. **Poultry Science**, v. 79, p. 568-574, 2000.

JONES, R. C. Avian reovirus infections. **Revue et Scientifique et Technique (International Office of Epizootics)**, v. 19, p. 614-625, 2000.

LADMAN, B. S.; LOUPOS, A. B.; GELB JR., J. Infectious bronchitis virus S1 gene sequence comparison is a better predictor of challenge of immunity in chickens than serotyping by virus neutralization. **Avian Pathology**, v. 35, p. 127-133, 2006.

LAI, M. C. M.; CAVANAGH, D. The molecular biology of coronaviruses. **Advances in Virus Research**, v.48, p. 1-100, 1997.

LUCIO, B.; FABRICANT, J. Tissue tropism of three cloacal isolates and Massachusetts strain of infectious bronchitis virus. **Avian Diseases**, 26, p. 508-519, 1990.

LUO, Z.; WEISS, S. R. Roles in cell-to-cell fusion of two conserved hydrophobic regions in the murine coronavirus spike protein. **Virology**, v.244, p. 483-494, 1998.

MACDONALD, J. W.; MCMARTIN, D. A. Observations on the effects of the H52 and H120 vaccine strains of infectious bronchitis virus in the domestic fowl. **Avian Pathology**, v. 5, p. 157-173, 1976.

MASTERS, P. S. *The molecular biology of coronaviruses*. **Advances in Virus Research**, v.66. p. 193-292, 2006.

MCMARTIN, D. A. Infectious bronchitis. In: MCFERRAN, J. B.; MCNULTY, M. S. **Virus infectious of vertebrates. Virus infectious of birds**. Amsterdam: Elsevier Science Publishers, 1993, v. 4, p. 249-275.

MONTASSIER, M. F. S.; BRENTANO, L.; RICHTZENHAIN, L. J. e MONTASSIER, H. J. Genetic diversity on S1 glycoprotein of avian infectious bronchitis vírus strains isolated in Brazil between 1988 – 2000. **V. Int. Symposium on Avian Corona and Pneumoviruses**. Rauschholzhausen, Germany. 2006.

MONTASSIER, M. F. S.; BRENTANO, L.; MONTASSIER, H. J.; RICHTZENHAIN, L. J. Genetic grouping of avian infectious bronchitis virus isolated in Brazil based on RT-PCR/RFLP analysis of the S1 gene. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 28, p. 190-194, 2008.

OTSUKI, K.; HUGGINS, M. B.; COOK, J. K. A. Comparison of the susceptibility to avian infectious bronchitis virus infectious of two inbred lines of white leghorn chickens. **Avian Pathology**, v. 19, n. 3, p. 467-475, 1990.

OWEN, R. L.; COWEN, B. S.; HATTEL, A. L.; NAQI, S. A.; WILSON, R. A. Detection of viral antigen following exposure of one-day old chickens to the Holland-52 strain of infectious bronchitis virus. **Avian Pathology**, v. 20, p. 663-673, 1991.

RISCO, C.; ANTON, I. M.; ENJUANES, L.; CARRASCOSA, J. L. The transmissible gastroenteritis coronavirus contains a spherical core shell consisting of M and N proteins. **Journal of Virology**, v. 70, n. 7, p. 4773-4777, 1996.

ROCHA, D. C. C.. Segmento da avicultura já começa a adaptar-se às novas regras de produção. Zootecnia Brasil, 2008. Disponível em: <<http://www.zootecniabrasil.com.br/sistema/modules/news/article.php?storyid=1374>>. Acesso em: 22 de setembro de 2009.

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

SANDRI, T. L.; VILLARREAL, L. Y. B.; SOUZA, S. P.; PERUZZETTO, M. C.; RICHTZENHAIN, L. J.; BRANDÃO, P. E. Geografic and tropism patterns on the occurrence of

variant genotypes of avian infectious bronchitis virus in Brazilian poultry. In: **Revista Brasileira de Ciência Avícola – Prêmio Lamas**. p. 229-229, 2008a. Suplemento 10.

SANDRI, T. L.; VILLARREAL, L. Y. B.; SOUZA, S. P.; SILVA, S. O. S.; RICHTZENHAIN, L. J.; BRANDÃO, P. E. New insights on avian infectious bronchitis virus genotypes in comercial poultry in Paraná State, Brazil. Trabalho apresentado na 21ª. REUNIÃO ANNUAL DO INSTITUTO BIOLÓGICO, São Paulo, 2008b.

SANDRI, T. L.; VILLARREAL, L. Y. B.; SILVA, S. O. S.; SOUZA, S. P.; ASANO, K. M.; RICHTZENHAIN, L. J.; BRANDÃO, P. E. Trends of infectious bronchitis virus diversity. *Virus Reviews & Research*, v. 13. p. 124-124, 2008c. Trabalho apresentado no 19 National Meeting of Virology.

SANDRI, T. L.; VILLARREAL, L. Y. B.; SILVA, S. O. S.; SOUZA, S. P.; GUIRAO, M. P.; RICHTZENHAIN, L. J.; BRANDAO, P. E. Variant types of infectious bronchitis virus as pathogens of the reproductive tract in poultry. *Virus Reviews & Research*, v. 13. p. 125-125, 2008d. Trabalho apresentado no 19 National Meeting of Virology.

SANDRI, T. L.; VILLARREAL, L. Y. B.; SILVA, S. O. S.; BRACONARO, P.; RICHTZENHAIN, L. J.; BRANDÃO, P. E. Infectious bronchitis virus as a pathogen of the reproductive tract in poultry: the role of variants. In: 21º CONGRESSO BRASILEIRO DE AVICULTURA, 27ª CONFERÊNCIA FACTA, 2009ª, Porto Alegre. Trabalho apresentado no Prêmio de Pesquisa Avícola "José Maria Lamas da Silva".

SANDRI, T. L.; VILLARREAL, L. Y. B.; SILVA, S. O. S.; BRACONARO, P.; RICHTZENHAIN, L. J.; BRANDÃO, P. E. Variant types of avian infectious bronchitis virus in poultry flocks vaccinated with Massachusetts vaccines In: 21º CONGRESSO BRASILEIRO DE AVICULTURA, 27ª CONFERÊNCIA FACTA, 2009b, Porto Alegre. Trabalho apresentado no Prêmio de Pesquisa Avícola "José Maria Lamas da Silva".

SANDRI, T. L.; SILVA, S. O. S.; RICHTZENHAIN, L. J.; BRANDÃO, P. E. Replicação do vírus da bronquite infecciosa no trato reprodutivo de aves vacinadas com vacinas inativadas convencionais ou vacina pentavalente (Nobilis RT+IBmulti+G+ND) em diferentes Estados brasileiros. Trabalho apresentado no: 11º.Prêmio Pesquisa Clínica, Intervet/Schering-Plough Animal Health, São Paulo, 2009c.

SCHALK, A. F.; HAWN, M. C.; DAK, F. N. An apparently new respiratory disease of baby chicks. **Journal of the American Veterinary Medicine Association**, v.78. p.413-423. 1931.

SCHALM, O. W.; BEACH, J. R. The etiology of a respiratory disease of chickens. **Science**, v. 79, n. 2053, p.416-417, 1934.

SIDDELL, S. G. The small membrane glycoprotein. In: SIDDELL, S. G. **The Coronaviridae**. New York: Plenum. 1995. p. 181-1905.

SWOFFORD, D. L. PAUP*. **Phylogenetic analysis using parsimony (*and Other Methods)**. Version 4. Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates, 2000. 1 CD-ROM.

TAGUCHI, F. The S2 subunit of the murine coronavirus spike protein is not involved in receptor binding. **Journal of Virology**, v. 69, n. 11, p. 7260-7263, 1995.

TEIXEIRA, M. C.; LUVIZOTTO, M. C.; FERRARI, H. F.; MENDES, A. R.; SILVA, S. E. da; CARDOSO, T. C. Detection of turkey coronavirus in commercial turkey poult in Brazil. **Avian Pathology**, v. 36, p. 29-33, 2007.

TOTH, T. E. Trypsin-enhanced replication of neonatal calf diarrhea coronavirus in bovine embryonic lung cells. **American Journal of Veterinary Research**, v. 43, n. 6, p. 967-972, 1982.

VABRET, A.; MOUTHON, F.; MOUREZ, T.; GOUARIN, S.; PETITJEAN, J.; FREYMUTH, F. Direct diagnosis of human respiratory coronaviruses 229E and OC43 by the polymerase chain reaction. **Journal of Virological Methods**, v. 97, p. 59-66, 2001.

VAN REGENMORTEL, M. H. V.; FAUQUET, C. M.; BISHOP, D. H. L.; CARSTENS, E. B.; ESTES, M. K.; LEMON, S. M.; MANILOFF, J.; MAYO, M. A.; MCGEOCH, D. J.; PRINGLE, C. R.; WICKNER, R. B. **Virus taxonomy: the classification and nomenclature of viruses**. The Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. San Diego: Academic Press, 2000. 1167 p.

VAN ROEKEL, H.; CLARKE, M. K.; BULLIS, K. L.; OLESIUK, O. M.; SPERLING, F. G. Infectious Bronchitis. **American Journal of Veterinary Research**, v. 43, p. 140-146, 1951.

VILLARREAL, L. Y. B.; ASSAYAG, M. S.; BRANDÃO, P. E.; CHACÓN, J. L. V.; MAIORKA, P. C.; SAIDENBERG, A. B. S.; FERREIRA, A. J. P. Orchitis in roosters with reduced fertility associated with avian infectious bronchitis virus and avian metapneumovirus infections. **Avian Diseases**, v. 51, n. 4, p. 900-904, 2007a.

VILLARREAL, L. Y. B.; BRANDÃO, P. E.; CHACÓN, J. L. V.; SAIDENBERG, A. B. S.; ASSAYAG, M. S.; JONES, R. C.; FERREIRA, A. J. P. Molecular Characterization of Infectious bronchitis virus strains isolated from the enteric content of Brazilian laying hens and broilers. **Avian Diseases**, v. 51, n. 4, p. 974-978, 2007b.

VON BULOW, V.; KLASSEN, A. Effects of avian viruses on cultured chicken bone marrow-derived macrophages. **Avian Pathology**, v. 12, p. 179-198, 1983.

WAKENELL, P. S.; SHARMA, J. M.; SLOCOMBE, R. F. Embryo vaccination of chickens with infectious bronchitis virus-histologic and ultrastructural lesion response and immunological response to vaccination. **Avian Diseases**, v. 39, p. 752-765, 1995.

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

WORTHINGTON, K. J.; CURRIE, R. J.; JONES, R. C. A reverse transcriptase-polymerase chain reaction survey of infectious bronchitis virus genotypes in Western Europe from 2002 to 2006. **Avian Pathology**, v.37, p. 247-257, 2008.

YAMADA, Y. K.; TAKIMOTO, K.; YABE, M.; TAGUCHI, F. Acquired fusion activity of a murine coronavirus MHV-2 variant with mutations in the proteolytic cleavage site and the signal sequence of the S protein. **Virology**, v. 227, p. 215-219, 1997.

YAMADA, Y. K.; YABE, M.; OHTSUKI, T.; TAGUCHI, F. *Unique* N-linked glycosylation of murine coronavirus MHV-2 membrane protein at the conserved O-linked glycosylation site. **Virus Research**, v.66, p. 149-154, 2000.