

SUELI DA SILVA SANTOS

**Caracterização e comparação molecular de estirpes de
referência e de campo do vírus da bronquite
infecciosa das galinhas**

**São Paulo
2012**

SUELI DA SILVA SANTOS

Caracterização e comparação molecular de estirpes de referência e de campo do vírus da bronquite infecciosa das galinhas

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

Departamento:

Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal

Área de Concentração:


Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses

Orientador:

Prof. Dr. Leonardo José Richtzenhain

**São Paulo
2012**

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


BIBLIOTECA VIRGINIE BUFF D'ÁPICE
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA
E ZOOTECNIA DA USP
3/1/12

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

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

T.2536
FMVZ

Santos, Sueli da Silva

Caracterização e comparação molecular de estirpes de referência e de campo do vírus da bronquite infecciosa das galinhas / Sueli da Silva Santos. -- 2012. 63 f.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, São Paulo, 2012.

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

Área de concentração: Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses.

Orientador: Prof. Dr. Leonardo José Richtzenhain.

1. Bronquite infecciosa das galinhas. 2. IBV. 3. Coronavírus. 4. PCR. 5. Sequenciamento. I. Título.



Comissão de Ética no uso de animais

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Caracterização e comparação molecular de estirpes vacinais e de campo do vírus da bronquite infecciosa das galinhas", protocolado sob o nº 1934/2010, utilizando órgãos internos de aves domésticas, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Leonardo José Richtzenhain, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da "Comissão de Ética no uso de animais" da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 26/05/2010.

We certify that the Research "Molecular characterization and comparison of vaccine strains and field of Bronchitis Virus in chickens", protocol number 1934/2010, under the responsibility Prof. Dr. Leonardo José Richtzenhain, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by "Ethic Committee in the use of animals" of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo and was approved in the meeting of day 05/26/2010.

São Paulo, 27 de maio de 2010

Profa. Dra. Denise Tabacchi Fantoni
Presidente

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: SANTOS, Sueli da Silva

Título: Caracterização e comparação molecular de estirpes de referência e de campo do vírus da bronquite infecciosa das galinhas

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

Data: ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

*Ao meu amado marido, Felipe,
por todo amor e carinho e, acima de tudo,
por não só acreditar nos meus sonhos
mas sempre me apoiar
para torná-los realidade.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço a **Deus** pela maravilhosa família, pais, irmãs, amigos e, principalmente, todas as oportunidades, incluindo os obstáculos, que me foram dados para o meu crescimento pessoal e profissional.

Aos meus pais, **Antonio e Genoveva**, por me ensinarem o significado de humildade, respeito e coragem e, acima de tudo, sempre me mostrar o melhor caminho a ser trilhado mesmo que não fosse o mais fácil.

Ao **Me. Henrique Leomil** pela amizade, pelos conhecimentos compartilhados e pela indicação para cursar o mestrado sob orientação do Prof. Dr. Leonardo José Richtzenhain.

Ao **Prof. Dr. Leonardo José Richtzenhain** pela confiança, valiosos ensinamentos e apoio à realização desse trabalho.

Ao **Prof. Dr. Paulo Eduardo Brandão**, pela paciência, conselhos e direcionamento dados no início deste trabalho.

À **Dra. Laura Villarreal**, pela amizade e envio de todas as amostras utilizadas no estudo.

Aos meus “anjos da guarda” **Sheila Oliveira e Giselle Ayres** pela amizade extrema, paciência, inúmeras ajudas prestadas, inclusive na elaboração dessa dissertação, e por terem evitado que esse trabalho desaparecesse dos freezers por diversas vezes.

Às amigas **Carolina Torres, Cintia Baldin, Cintia Maria, Haila Chagas e Juliana Martins** pela companhia, força e inesgotável bom humor.

À **Dra. Alessandra Castro**, pelo convívio, conselhos e oportunidades jamais esquecidos.

Aos amigos e funcionários do VPS **Alexandre, Carol, Danival, Pedrinho, Sandrinha e Tânia** por toda a ajuda, torcida e ótimos momentos compartilhados.

Aos meus colegas, pós-graduandos, funcionários e professores do VPS pela ajuda na realização deste trabalho e pela convivência agradável.

Às funcionárias da Biblioteca Virgínie Buff D' Ápice e da Secretaria de Pós-Graduação pelo carinho com o qual me receberam e auxiliaram nesta etapa.

Ao Prof. Dr. Silvio Arruda Vasconcelos e à Profa. Dra. Solange Maria Gennari pela dedicação ao programa de pós-graduação.

Aos animais utilizados nesse estudo.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pela bolsa concedida.

Fé em Deus

*A luta está difícil, mas não posso desistir
Depois da tempestade, flores voltam a surgir
Mas quando a tempestade demora a passar
A vida até parece fora do lugar
Não perca a fé em Deus, fé em Deus
Que tudo irá se acertar*

*Pois o sol de um novo dia vai brilhar
E essa luz vai refletir na nossa estrada
Clareando de uma vez a caminhada
Que nos levará direto ao apogeu
Tenha fé, nunca perca a fé em Deus*

*Pra quem acha que a vida não tem esperança
Fé em Deus
Pra quem estende a mão e ajuda a criança
Fé em Deus
Pra quem acha que o mundo acabou
Pra quem não encontrou um amor
Tenha fé, vá na fé
Nunca perca a fé em Deus*

*Pra quem sempre sofreu e hoje em dia é feliz
Fé em Deus
Pra quem não alcançou tudo que sempre quis
Fé em Deus
Pra quem ama, respeita e crê
E pra aquele que paga pra ver
Tenha fé, vá na fé
Nunca perca a fé em Deus*

*Aquilo que não mata só nos faz fortalecer
Vivendo aprendi que é só fazer por merecer
Que passo a passo um dia a gente chega lá
Pois não existe mal que não possa acabar
Não perca a fé em Deus, fé em Deus
Que tudo irá se acertar*

*Pois o sol de um novo dia vai brilhar
E essa luz vai refletir na nossa estrada
Clareando de uma vez a caminhada
Que nos levará direto ao apogeu
Tenha fé, nunca perca a fé em Deus*

(Diogo Nogueira)

RESUMO

SANTOS, S. S. **Caracterização e comparação molecular de estirpes de referência e de campo do vírus da bronquite infecciosa das galinhas.** [Molecular characterization and comparison of strains of reference and field of infectious bronchitis virus]. 2012. 63 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

A bronquite infecciosa é uma doença viral, aguda e altamente contagiosa que afeta as aves da espécie *Gallus gallus*, de todas as idades, causando grandes perdas econômicas devido à mortalidade, queda na produção e qualidade dos ovos. Variações na sequência de aminoácidos na região hipervariável da subunidade S1 da proteína de espícula (S) levam à emergência de novos sorotipos do vírus da bronquite infecciosa das galinhas (IBV). Este estudo teve como objetivo seqüenciar parcialmente o gene S1 para determinar a relação filogenética entre amostras vacinais e de campo com o intuito de investigar os genótipos circulantes. Cento e sessenta amostras foram coletadas, na forma de pools, de plantéis sintomáticos durante 2009/2010. Cada pool continha tecidos de 3 a 5 aves e foram compostos por diferentes órgãos (traquéia, pulmões, rins, conteúdo entérico, trato reprodutivo e swabs traqueais). As amostras foram triadas para a presença de IBV utilizando-se uma nested RT-PCR, direcionada a região 3'UTR. As amostras positivas, (n=89) foram submetidas a nova nested RT-PCR dirigida para o gene S, resultando em 10 amplicons de 390pb que foram então submetidos a seqüenciamento de DNA e análise filogenética. As amostras brasileiras segregaram-se em dois grupos filogenéticos: Massachusetts (Mass) e tipos marcadamente brasileiros. Seis amostras agruparam-se no grupo Mass, com vacinas vivas atenuadas utilizadas no Brasil. Quatro amostras agruparam com cepas de campo brasileiras previamente descritas (acesso no GeneBank: FJ791257 to FJ791273). A identidade de aminoácidos no grupo Mass variou de 98% a 100%, sugerindo a detecção de vírus vacinal. Enquanto que entre as amostras brasileiras e o grupo Mass, a variabilidade de aminoácidos foi de 79% a 81%. Esses resultados mostram uma variação importante em genótipos virais circulantes nos plantéis industriais avícolas brasileiros. Portanto, o presente estudo reforça a contínua emergência e disseminação de novas linhagens de IBV no Brasil e a importância de constantes

pesquisas e monitoramento, para que se compreendam aos fenômenos de emergência de novas linhagens e suas consequências, bem como para otimizar as medidas de controle do vírus.

Palavras-chave: Bronquite infecciosa das galinhas. IBV. Coronavírus. PCR. Sequenciamento.

ABSTRACT

SANTOS, S. S. **Molecular characterization and comparison of reference and field strains of infectious bronchitis virus.** [Caracterização e comparação molecular de estirpes de referência e de campo do vírus da bronquite infecciosa das galinhas]. 2012. 63 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

Infectious bronchitis is a viral disease, acute and highly contagious that affects birds of the *Gallus gallus* species, of all ages, causing huge economic losses due to mortality, drop in production and quality eggs. Differences between serotypes of IBV are due to variations in the amino acids sequence in S1 hypervariable region subunit of spike protein (S). This study aimed to partially sequence the S1 gene to determine the phylogenetic relationship between field and vaccine viral types, and to investigate circulating genotypes in Brazil. One hundred and sixty pool samples were collected from symptomatic flocks during 2009/2010. Each pool contained tissues from 3 to 5 birds and was composed by different organs (tracheas, lungs, kidneys, enteric contents, tract reproductive and tracheal swabs). Samples were screened for the presence of IBV using a nested RT-PCR targeted to the 3'UTR. Positive samples (n=56) were submitted to a nested RT-PCR target to S gene resulting in 10 amplicons of 390pb that were then submitted to DNA sequencing and analysis. Brazilian IBV genotypes segregated in two phylogenetic groups: Massachusetts (Mass) and Brazilian types. Six samples clustered in the Mass group, with live attenuated vaccines used in Brazil. Four samples grouped with field Brazilian strains previously described (GeneBank accession: FJ791257 to FJ791273). In Mass cluster aminoacids identity range from 98% to 100%, suggesting vaccine virus detection, in this last case. Moreover, the verified identity between samples from this study and Mass group ranged 79% to 81%. Therefore the present study reinforces the emergence and circulation of news lineages of IBV in commercial Brazilian flocks, as well as the importance of consistent research and monitoring to better understand this phenomem and its consequences, aiming to improved control measures against the virus.

Keywords: Infectious bronchitis. PCR. Sequencing.

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

aa	aminoácidos
%	porcento
BLAST/n	Basic Local Alignment Search Tool
BIG	Bronquite Infecciosa das Galinhas
°C	graus Celsius
cDNA	DNA complementar
dNTP	deoxinucleosídeo-trifosfato
DNA	ácido desoxirribonucléico
DEPC	dietil-pirocarbonato
et al.	e colaboradores
G	aceleração da gravidade terrestre (9,8m/s ²)
IBV	Vírus da Bronquite Infecciosa das Galinhas
kb	kilobase
kDa	quiloDalton
M	Molar
mM	milimolar
ng	nanogramas
mL	mililitro
µg	micrograma
µL	microlitro
nt	nucleotídeos
pb	pares de bases
PCR	reação em cadeia pela polimerase
RNA	ácido ribonucléico
RT	transcrição reversa
S	espícula

*Algumas abreviaturas, dada a sua consagração na literatura científica, seguem a sua grafia no idioma inglês.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	OBJETIVOS.....	22
3	MATERIAIS E MÉTODOS	24
3.1	COLETA DE AMOSTRAS	24
3.2	CONTROLES POSITIVOS E NEGATIVOS.....	25
3.3	DETECÇÃO DO VÍRUS DA BRONQUITE INFECCIOSA DAS GALINHAS ...	26
3.3.1	Preparo da suspensão de amostras	26
3.3.2	Extração de RNA	27
3.3.3	Síntese de cDNA (transcrição-reversa).....	27
3.3.4	Primeira amplificação.....	27
3.3.5	Segunda amplificação (semi - nested PCR)	28
3.4	GENOTIPAGEM DAS AMOSTRAS DE IBV UTILIZANDO UMA MULTIPLEX NESTED RT-PCR DIRIGIDA AO GENE CODIFICADOR DA PROTEÍNA DE ESPÍCULA (S).....	29
3.4.1	Síntese de cDNA (transcrição-reversa).....	29
3.4.2	Primeira amplificação.....	29
3.4.3	Segunda amplificação (nested PCR)	30
3.5	NESTED RT-PCR PARA AMPLIFICAÇÃO PARCIAL DA REGIÃO CODIFICADORA DA SUBUNIDADE S1 DA PROTEÍNA S DE IBV	31
3.5.1	Síntese de cDNA (transcrição-reversa).....	31
3.5.2	Primeira amplificação.....	32
3.5.3	Segunda amplificação (nested PCR)	32
3.6	SEQÜENCIAMENTO DE DNA	34
3.6.1	Purificação dos produtos de PCR e seqüenciamento de DNA	34
3.6.2	Edição de seqüências	35
3.7	ANÁLISE GENEALÓGICA	35
4	RESULTADOS	37
4.1	SEMI-NESTED RT-PCR PARA DETECÇÃO DA BRONQUITE INFECCIOSA DAS GALINHAS.....	37
4.1.1	Resultados por pools de órgãos	37
4.1.2	Resultados por lotes	39
4.2	MULTIPLEX NESTED RT-PCR PARA TIPIIFICAÇÃO DAS AMOSTRAS POSITIVAS PARA IBV	40

4.2.1	Resultados por pools de órgãos	40
4.2.2	Resultados por lotes	41
4.3	SEQUENCIAMENTO DE DNA	43
4.4	ANÁLISE GENEALÓGICA	43
5	DISCUSSÃO	48
6	CONCLUSÃO	54

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

No que se refere à produção de carne de frango, em 2010, constatou-se que o Brasil produziu 12,23 milhões de toneladas, ocupando o terceiro lugar no ranking mundial, ficando atrás apenas de China e EUA. Em exportações, registrou-se um recorde em volume, com total de 3,8 milhões de toneladas de frango, exportadas para mais de 150 países, tornando o Brasil o maior exportador do mundo e gerando uma receita cambial de US\$ 6,808 bilhões (UBABEF, 2010).

As exportações brasileiras de ovos somaram 27.721 toneladas em 2010 com uma receita de US\$ 41 milhões e as principais regiões de destino foram África, com 13.864 toneladas, e Oriente Médio, com 11.705 toneladas. Entre os países, os maiores compradores foram Angola, com 12.662 toneladas, e Emirados Árabes Unidos, com 10.623 toneladas (UBABEF, 2010).

No Brasil, nos últimos anos, a Bronquite Infecciosa das Galinhas (BIG) tem se tornado um problema sério e é considerada endêmica, isto é, amplamente disseminada nos plantéis nacionais (MONTASSIER, 2010). Isso ocorre em decorrência da contínua emergência e disseminação de novos tipos virais.

Bronquite Infecciosa das Galinhas (BIG) é uma doença viral, aguda e altamente contagiosa em aves (*Gallus gallus*), que acomete animais de ambos os sexos e das mais diferentes idades, tanto aquelas destinadas à produção de frangos de corte ou à produção de ovos. O vírus da Bronquite Infecciosa das Galinhas (*Infectious Bronchitis Virus – IBV*) replica-se, primariamente, no trato respiratório, mas também em células epiteliais do intestino, rins e oviduto.(CAVANAGH; GELB, 2008). Essa enfermidade ocorre em praticamente todas as regiões do mundo, onde existem atividades da avicultura industrial e é considerada de grande importância econômica devido a sua fácil disseminação, podendo afetar também faisões e perus (VILLARREAL, 2010).

O vírus causador da doença foi isolado e identificado pela primeira vez nos EUA, em 1931, depois de um surto de doença respiratória em aves (SCHALK; HAWN, 1931). Em 1933, foi definida a etiologia viral da doença (BUSHNELL; BRANDLY, 1933) que foi estabelecida conclusivamente em 1936 (BEACH; SCHALM, 1936). Beaudette e Hudson (1937) propagaram o vírus em ovos e Jungherr,

Chomiak e Luginbuhl (1956) mostraram a existência de dois diferentes tipos de antígenos (Massachusetts e Connecticut) do IBV. Porém, em um estudo retrospectivo (JIA; MONDAL; NAQI, 2002) utilizando técnicas de biologia molecular e sorologia, foram identificados sorotipos não-Mass nas amostras dos E.U.A. da década de 40, evidenciando uma grande diversidade genética e antigênica nos vírus do início de 1940 e até mesmo antes da introdução das vacinas de IBV no campo.

O vírus da Bronquite Infecciosa das Galinhas (IBV) é um *gammacoronavirus* na subfamília *Coronavirinae*, família *Coronaviridae* e ordem *Nidovirales* (DE WITT et al., 2011). O IBV é envelopado e, por isso, bastante sensível às condições ambientais, não segmentado, pleomórfico e de aproximadamente 80 a 120 nanômetros (nm) de diâmetro. Os genoma dos coronavírus constitui-se de uma molécula de RNA fita simples, com sentido positivo e é considerado um dos maiores genomas de RNA com, aproximadamente, 30 kilobases (kb), que codifica quatro proteínas estruturais (CAVANAGH, 2005). O genoma RNA é complexado com a proteína nucleocapsídeo (N) para formar um capsídeo helicoidal encontrado dentro da membrana viral; a glicoproteína de superfície, chamada de espícula (S) dá ao vírus a morfologia de coroa por originar estruturas com formato de bastão na superfície; a proteína de membrana (M) possui baixa variabilidade; e a proteína do envelope (E) é uma proteína altamente hidrofóbica e juntamente com a proteína M é necessária à formação da partícula viral (WEISS; NAVAS-MARTIN, 2005; CAVANAGH, 2007).

A proteína de espícula (S) é responsável pela fixação do vírus à célula alvo e pela fusão do envelope do vírus à superfície celular, que leva à liberação do genoma de viral dentro do citoplasma da célula, onde a replicação acontece (HAAN et al., 2002). Essa glicoproteína quando clivada dá origem a duas subunidades: S1 e S2. A subunidade amino-terminal S1 possui aproximadamente 520 aminoácidos, e constitui uma cabeça globular que contém um sítio de ligação que é responsável pela fixação do vírus ao receptor da célula hospedeira. S2 é a porção carboxi-terminal, com 625 aminoácidos, que forma uma estrutura na forma de haste e fica ancorada à membrana para dar suporte à S1, desempenhando um papel essencial para a fusão da superfície viral à membrana da célula (POPOVA; ZHANG, 2002).

Sanchez et al. (1999) demonstrou que a subunidade S1 determina a infectividade viral e o tropismo por determinados tecidos, além da indução para a produção de anticorpos neutralizantes. A principal estratégia do IBV para escapar

dos mecanismos de defesa do hospedeiro é a variação na sequência de aminoácidos das mais importantes regiões antigênicas, assim, mutações no gene da glicoproteína S1 determinam o surgimento de novas variantes gênicas e até mesmo sorotipos desse mesmo vírus, sendo que a diferenciação dos genótipos do IBV fundamenta-se na identificação da região variável da proteína S tanto no que concerne à caracterização antigênica como genética das diferentes estirpes do vírus. (CAVANAGH, 2005).

O vírion, inicialmente, infecta células do trato respiratório superior, ficando restrito às células ciliadas e muco secretoras. O trato respiratório é o principal local de replicação do IBV e é a partir dele que ocorre a viremia, sendo os vírus disseminados para outros tecidos (DHINAKAR; JONES, 1997a). Durante a fase clínica da doença, os picos máximos de título do vírus podem ocorrer de dois a cinco dias após infecção e os principais órgãos atingidos são: traquéia, sacos aéreos e pulmões. (AMBALI; JONES, 1990).

A patogenia do vírus é variável, podendo atingir também rins, oviduto, testículos, muitas partes do trato digestório como, esôfago, proventrículo, duodeno, jejuno, além de bursa, tonsila cecal e cloaca. A infecção no oviduto causa queda na produção e qualidade de ovos, além de baixa eclodibilidade (VAN ROEKEL et al., 1951; SEVOIAN; LEVINE, 1957) e nos animais jovens produz danos permanentes nos órgãos reprodutivos levando às “falsas poedeiras” (BROADFOOT; POMEROY; SMITH, 1956; JONES; JORDAN, 1971, 1972). A variabilidade na patogenia de IBV também pode demonstrar outra curiosa patogenia como miopatia peitoral, causando edema gelatinoso e hemorragia fascial do músculo peitoral das aves causada pela formação e deposição de imunocomplexos na parede dos capilares (GOUGH et al., 1992).

Inicialmente as cepas variantes eram bem distintas dos sorotipos conhecidos. A capacidade de mutação e recombinação do vírus, além da pressão de seleção através do uso prolongado de vacinas vivas, contribuiu para o aparecimento através dos anos, de uma grande variedade de sorotipos e subtipos. Uma classificação são os patótipos, ou seja, as amostras são classificadas segundo os órgãos mais lesados pelo vírus. Em média, dois ou mais sistemas são afetados, já que as amostras têm diferenças entre elas com relação à virulência e ao tropismo. A variação nos sorotipos deve-se a variações na sequência do gene S1, localizadas nas regiões chamadas de hipervariáveis (DIFABIO, VILLARREAL, 2009).

Alguns trabalhos sugerem a possibilidade de uma nova classificação do vírus, não em sorotipos, mas em protectotipos (COOK et al., 1999, DE WITT et al., 2011). Estes seriam amostras de vírus capazes de, através do teste de imunidade cruzada em anéis de traquéia ou aves SPF, conferir proteção contra sorotipos do mesmo grupo ou de grupos sorologicamente distintos. Essa idéia provém do fato que, somente algumas alterações de aminoácidos na glicoproteína S pode gerar o aparecimento de um novo sorotipo de IBV. Portanto, a maior parte da estrutura viral permanece inalterada acarretando em reações cruzadas entre os sorotipos.

A diversidade antigênica e a pobre proteção cruzada entre os sorotipos de IBV é uma das maiores causas na dificuldade em controlar a doença (WINTERFIELD; FADLY; HOERR, 1976; CAVANAGH, 2003; WOO et al., 2009). Atualmente, existem mais de 100 sorotipos relatados do vírus, sendo que podemos chegar em até 50% de diferença entre cada um quanto à sequência dos aminoácidos de S1 e essas variações ocorrem em duas regiões da subunidade S1, chamadas hipervariáveis (SAPATS et al., 1996; HODGSON et al., 2004).

No entanto, pouca variação é detectada nas sequências de aminoácidos de S2. Assim, fica evidente que as porções variantes em S1 podem ter uma vantagem seletiva, pois a imunidade induzida com vacinação protege muito pouco contra sorotipos heterólogos, e já que a glicoproteína S é a principal responsável pelo estímulo da produção de anticorpos vírus neutralizantes e protetores (CASAIS et al., 2003).

Prevenir a doença é muito difícil devido à facilidade demonstrada pelo vírus em se espalhar por aerossóis e à existência de múltiplos sorotipos e variantes desse agente etiológico. Dessa maneira, em áreas onde há grandes produções de frango é quase impossível manter as aves livres do vírus. Consequentemente, a vacinação é comumente praticada como uma forma de controle da BIG.

No Brasil, a Bronquite Infecciosa das Galinhas (BIG) é uma das doenças virais que mais afeta a indústria avícola, como indicado por estudos realizados aqui e no mundo (DHINAKAR; JONES, 1996; BRANDÃO et al., 2009; VILLARREAL et al., 2010; JI et al., 2011), apesar das taxas de mortalidade não serem tão altas como para determinadas doenças (Newcastle e Influenza aviária). As vacinas atenuadas e inativadas são frequentemente usadas como forma de controle do IBV, sendo que o sorotipo mais utilizado mundialmente é o Massachussetts (DE WIT et al., 2011). Na indústria avícola brasileira, o controle baseia-se na prevenção da infecção através

de medidas de biossegurança e controle sanitário dos plantéis objetivando reduzir perdas econômicas com a queda de peso, aumento da conversão alimentar e baixo desempenho do lote em geral (DI FABIO; VILLARREAL, 2009).

As técnicas para diagnóstico de IBV podem se basear em métodos diretos e indiretos. Dentre os métodos indiretos, ELISA, vírus-neutralização e inibição da hemaglutinação são técnicas importantes para mensurar títulos de anticorpos e para caracterização celular (CAVANAGH; GELB, 2008). O isolamento viral e a inoculação em ovos embrionados são técnicas de diagnóstico direto, no entanto estes métodos são caros, demorados e laboriosos, pois necessita da adaptação do vírus ao meio através de passagens sucessivas no substrato (DI FABIO; ROSSINI, 2000). Outros métodos diretos são baseados na presença de ácidos nucléicos como RT-PCR (reverse transcriptase-polymerase chain reaction), RFLP (restriction fragment length polymorphism) e sequenciamento. A acurácia para diagnóstico e o baixo custo para implementação e execução dessas técnicas têm permitido o seu uso rotineiro em laboratórios públicos e privados (VILLARREAL, 2010).

No Brasil, a doença foi diagnosticada inicialmente por Hipólito (1957) e, é considerada a doença que mais causa perdas econômicas nos plantéis brasileiros. Para controle da doença no país, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) somente permite a forma viva atenuada do sorotipo Massachusetts (Mass) nas vacinas utilizadas nos plantéis. Diferentes genótipos de IBV são conhecidos por todo país (DI FABIO et al., 2000; MONTASSIER et al., 2008; VILLARREAL et al.; 2010), entre eles Arkansas, Connecticut, 4/91(D274) e outros sorótipos já descritos.

Até meados da década de 90 não havia muitos estudos sobre a diversidade antigênica de IBV, mas Difabio et al. (2000) demonstraram cinco diferentes sorótipos, sendo apenas um sorotipo classificado como pertencente a Mass. Além disso, esses sorótipos foram encontrados coexistindo em aves comerciais de todos os tipos no Brasil, principalmente na maior área produtora do sul do país.

Montassier et al. (2008) analisaram doze isolados de campo do Brasil e um genótipo de referência vacinal do vírus da bronquite infecciosa das galinhas (IBV). Observou-se a existência de cinco genótipos diferentes: M (Massachusetts), A, B, C e D. Cinco dos doze isolados de campo do IBV foram classificados no genótipo Massachusetts e os sete vírus restantes foram classificados em quatro genótipos diferentes. Os resultados desta genotipagem destacaram a ocorrência de uma

variabilidade significativa entre os isolados do IBV circulantes nas granjas avícolas comerciais do Brasil.

Em pesquisa realizada por Sandri et al. (2008), foram analisadas 380 amostras provenientes de 75 granjas avícolas pertencentes a cinco estados do Brasil, colhidas durante 2007 e 2008. Do total das amostras analisadas, 57,51% (221/380) foram positivas para IBV e o genotipo predominante foi de não-Mass com 89,14% (197/221) contra apenas 10,86% (24/221) do genotipo Massachusetts, ressaltando que somente o sorotipo Mass é permitido em vacinas empregadas no Brasil, estes resultados demonstraram que a baixa imunidade do plantel podem levar a emergência de novas linhagens.

Mais recentemente, diferentes genotipos de IBV foram encontrados nos plantéis brasileiros (VILLARREAL et al., 2010) e, além disso foi feita uma relação entre estes e os sorotipos vacinais utilizados na vacinação. Foi demonstrado que amostras brasileiras reuniram-se num grupo exclusivo, as quais ainda subdividiram-se em outros três subgrupos, distantes, filogeneticamente, do genotipo Mass e, ainda, observou-se a presença do genotipo 4/91 que ainda não havia sido descrito no nosso país. Assim, ficou demonstrada a presença de genotipos variantes (ou seja, genotipos que não enquadraram-se em nenhum sorotipo/genotipo classicamente conhecido) do vírus da bronquite infecciosa em aves domésticas no Brasil, podendo ser essa a razão de falhas no controle do vírus no país, além de reforçar a idéia do sorotipo Mass não fornecer uma ampla cobertura vacinal aos plantéis brasileiros.

Sendo assim, considerando a importância da indústria brasileira de frangos, tais ocorrências reforçam a necessidade de maiores investigações sobre a caracterização molecular dos genotipos do vírus da bronquite infecciosa das galinhas no Brasil, com o intuito de compará-los aos sorotipos/genotipos utilizados nas vacinas e, dessa maneira, fornecer subsídios para aprimoramento dos programas de controle mais adequados às variantes virais circulantes no país.

OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

Os objetivos do presente trabalho estão descritos a seguir:

- Detectar o vírus da Bronquite Infecciosa das Galinhas através de semi-nested RT-PCR dirigida para a região 3'UTR do vírus em amostras provenientes de plantéis comerciais brasileiros cujas aves apresentem sintomas clínicos compatíveis com a infecção;
- Classificar as amostras virais detectadas em sorotipo/genotipo: Massachusetts, 4/91, D274 e variante (caso não pertença a um desses três tipos) e;
- Realizar sequenciamento parcial do gene S1 e determinar filogeneticamente a relação entre as amostras de campo e vacinais.

MATERIAIS E MÉTODOS

3 MATERIAIS E MÉTODOS

A seguir estão descritos os materiais e métodos empregados na execução desse trabalho na sequência em que foram executados.

3.1 COLETA DE AMOSTRAS

O presente projeto utilizou material de um banco de conveniência no qual foi realizado o estudo de amostras de conteúdo entérico, pulmões, rins, traquéia e trato reprodutivo de matrizes e frangos com suspeita clínica de infecção por IBV de lotes de granjas de todo Brasil.

No total foram colhidas 160 amostras de 31 lotes de granjas localizadas nas regiões Nordeste, Centro-oeste, Sudeste e Sul no período de novembro de 2009 a outubro de 2010. As amostras foram colhidas sob a forma de *pool* de órgãos, sendo um *pool* constituído pelo conjunto de órgãos de cinco aves, obtendo-se, assim, de modo separado, *pools* de pulmões, traquéias, rins, trato reprodutivo completo no caso das matrizes, testículos no caso de reprodutores machos e conteúdo entérico (conjunto dos intestinos delgado e grosso). Também foram utilizados suabes traqueais sendo testados de modo individual. Considerou-se lote cada grupo de aves alojado num mesmo galpão e com diferenciação no tipo de criação e idade, podendo haver, dessa maneira, dois lotes diferentes numa mesma granja.

Os órgãos foram colhidos através de necropsia nas granjas, sendo separados por tipo de órgãos, embalados e enviados sob refrigeração de 4°C para a Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo onde foram armazenados a -20°C até o momento do seu processamento.

Todas as aves analisadas eram vacinadas contra IBV, sendo que aves de ciclo curto (frangos de corte) receberam uma dose de vacina atenuada sorotipo Massachusetts e aves de ciclo longo (matrizes) receberam uma primeira dose de vacina viva atenuada sorotipo Massachusetts e reforço de vacina inativada sorotipo Massachusetts.

A seguir, fluxograma dos procedimentos realizados com cada amostra (Figura 1):

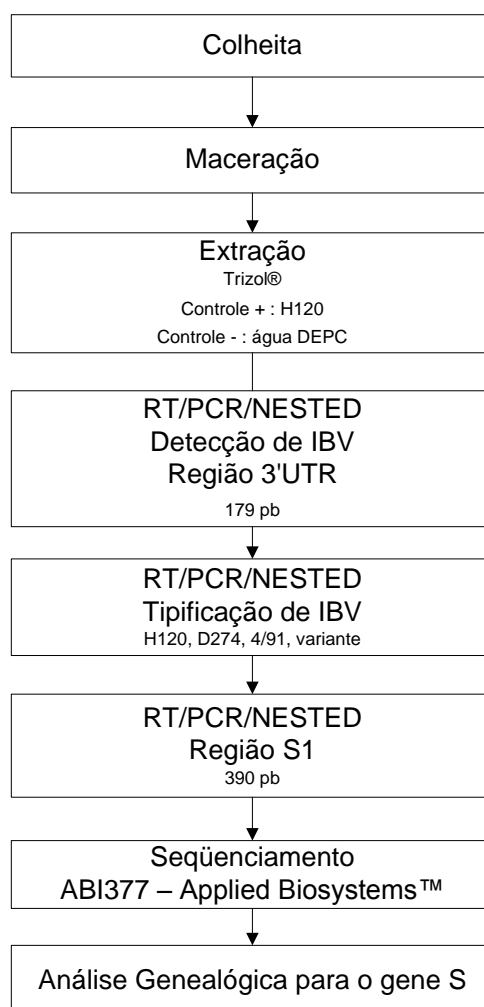


Figura 1 - Fluxograma das atividades realizadas com cada amostra

3.2 CONTROLES POSITIVOS E NEGATIVOS

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

3.3 DETECÇÃO DO VÍRUS DA BRONQUITE INFECCIOSA DAS GALINHAS

Para o diagnóstico de triagem de IBV, foi utilizada uma reação de semi-nested RT-PCR dirigida para a região 3'UTR do genoma dos coronavírus da família *Coronaviridae* (Figura 2), de acordo com o proposto por Cavanagh et al. (2002).

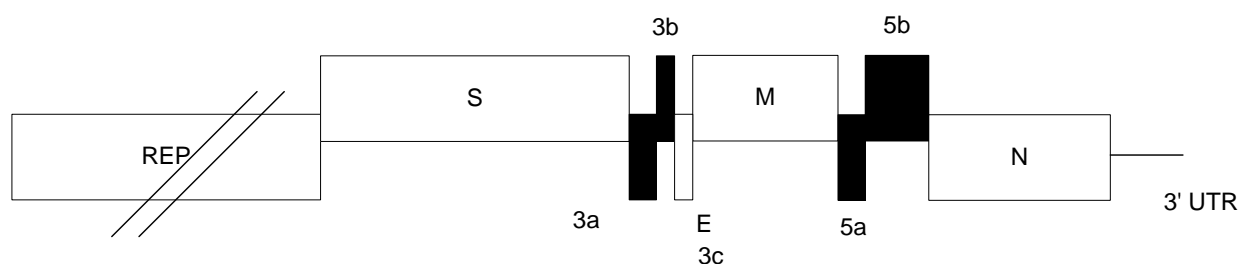


Figura 2 – Organização do genoma de IBV (adaptado de CAVANAGH, 2002). As barras duplas indicam que a região codificadora do gene da replicase não está representado proporcionalmente como as demais regiões

3.3.1 Preparo da suspensão de amostras

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 cinco intestinos foi colhido em tubos plásticos esterilizados de centrífuga de 50 mL.

A seguir, a partir de cada homogeneizado e amostra de conteúdos entéricos, foi preparada uma suspensão a 20% (volume/ volume) em água DEPC, em microtubos plásticos para centrífuga, de 1,5 mL, esterilizados e livres de nucleases.

Os tubos foram então submetidos a três ciclos de congelamento em nitrogênio líquido e descongelamento a 56°C, para promover a lise celular e a seguir, centrifugada a 5000 x g/ 15 minutos a 4°C, sendo o sobrenadante empregado como amostra e armazenado a -20°C para as etapas seguintes.

Os macerados de órgãos e os conteúdos entéricos excedentes foram armazenados a -20°C para casos de necessidade de repetição do preparo de suspensão de amostras.

3.3.2 Extração de RNA

Para a extração de RNA total das suspensões de amostras e dos controles positivo e negativo, foi seguido o protocolo de extração do TRIzol (Invitrogen™), conforme instruções do fabricante.

3.3.3 Síntese de cDNA (transcrição-reversa)

Foram desnaturados 7µL do RNA a 95° C durante 5 minutos e adicionados ao mix de transcrição reversa contendo 1 x First Strand Buffer (Invitrogen™), 1mM de cada dNTP, 10mM DTT, 1µM de cada primer (UTR41+ e UTR11-, Quadro 1, Figura 3) e 200U de M-MLV Reverse Transcriptase (Invitrogen™) para um volume de reação final de 20µL, realizando-se a transcrição reversa a 42°C/60 minutos.

3.3.4 Primeira amplificação

A seguir, para a amplificação de um segmento de 266 pares de bases (pb) da região 3' UTR, 5 µL de cada cDNA foram adicionados ao mix de PCR [1 x PCR Buffer (Invitrogen™), 0,2mM de cada dNTP, 0,5 µM de cada primer (UTR41+ e UTR11-, Quadro 1, Figura 3), 1,5mM MgCl₂, 25,25 µL água ultra-pura esterilizada e 1,25U de Platinum Taq DNA polymerase (Invitrogen™) para uma reação final de 50µL] e submetidos a 35 ciclos de 94°C/ 1 minuto, 48°C/1,5 minutos e 72°C/2 minutos, seguidos por 72°C/10 minutos para extensão final.

3.3.5 Segunda amplificação (semi - nested PCR)

Cinco microlitros de cada amostra amplificada (item 3.3.4) foram adicionados ao mix de nested [1 x PCR Buffer (Invitrogen™), 0,2mM de cada dNTP, 0,5 µM de cada primer (UTR31- e UTR41+, Quadro 1, Figura 3), 1,5 mM MgCl₂, 25,25 µL água ultra-pura esterilizada e 1,25U de Platinum Taq DNA polymerase (Invitrogen™) para uma reação final de 50µL] e submetidos a 35 ciclos de 94°C/ 1minuto, 48°C/1,5minutos e 72°C/2minutos, seguidos por 72°C/ 10 minutos para extensão final. Nesta etapa, foram adicionados tubos com água ultra-pura a cada quatro amostras para monitoramento de contaminações por DNA amplificado. As diferentes etapas foram feitas em salas separadas para evitar possíveis contaminações.

Foram consideradas positivas as amostras que resultaram na banda correspondente de 179 pb em gel de agarose a 1,5% corado com brometo de etídeo 0,5 µg/mL.

Primer	Seqüência	Posição
UTR41+	5' ATGTCTATCGCCAGGGAAATGTC 3'	27342-27364
UTR11-	5' GCTCTAACTCTATACTAGCCTA 3'	27586-27607
UTR 31-	5' GGCGTCCAAGTGCTGTACCC 3'	27501-27520

Quadro 1 – Primers e respectivas seqüências para a detecção do vírus da bronquite infecciosa aviária dirigidos à amplificação de um segmento de 179 pb da região 3'UTR

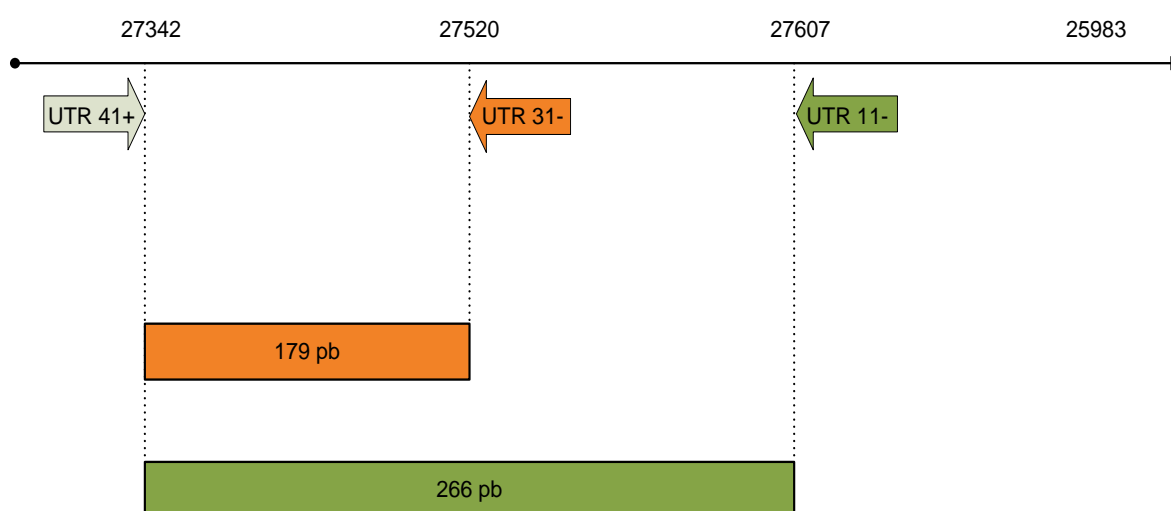


Figura 3 – Representação esquemática da posição dos primers na região 3'UTR de IBV. As setas coloridas são representações dos primers, com suas respectivas identificações. As faixas retangulares representam o produto amplificado. A numeração assinalada, na horizontal, corresponde à adotada pela seqüência da amostra Beaudette de IBV GeneBank M95169

3.4 GENOTIPAGEM DAS AMOSTRAS DE IBV UTILIZANDO UMA MULTIPLEX NESTED RT-PCR DIRIGIDA AO GENE CODIFICADOR DA PROTEÍNA DE ESPÍCULA (S)

Com o objetivo de determinar se as amostras que se apresentaram positivas para a semi-nested RT-PCR de triagem para IBV (item 3.3) pertenciam ou não ao sorotipo Massachusetts, utilizados nas vacinas contra a BIG no Brasil, as mesmas foram submetidas a uma multiplex nested RT-PCR descrita por Cápua et al. (1999), com algumas modificações nas seqüências dos primers, 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 (Quadro 2 e Figura 4).

3.4.1 Síntese de cDNA (transcrição-reversa)

Foram desnaturados 7 µL do RNA obtido conforme o item 3.3.2 a 95 °C durante 5 minutos e adicionados ao mix de transcrição reversa contendo 1 x First Strand Buffer (Invitrogen™), 1mM de cada dNTP, 10mM DTT, 1µM de cada primer (IBVAS e IBVS, QUADRO 2) e 200U de M-MLV Reverse Transcriptase (Invitrogen™) para um volume de reação final de 20µL, realizando-se a transcrição reversa a 42°C/60 minutos.

3.4.2 Primeira amplificação

A seguir, para a amplificação de um segmento de 458pb da região codificadora de S1, empregando-se *primers* direcionados a regiões comuns a todos os genotipos de IBV, 5 µL de cada cDNA foram adicionados ao mix de PCR [1 x PCR Buffer (Invitrogen™), 0,2mM de cada dNTP, 0,5 µM de cada primer (IBVAS e

IBVS, QUADRO 2), 1,5mM MgCl₂, 25,25 µL água ultra-pura esterilizada e 1,25U de Platinum Taq DNA polymerase (Invitrogen™) para uma reação final de 50µL] e submetidos a 35 ciclos de 94°C/ 1 minuto, 48°C/1,5 minutos e 72°C/2 minutos, seguidos por 72°C/10 minutos para extensão final.

3.4.3 Segunda amplificação (nested PCR)

A seguir, 5 µL do produto da primeira amplificação (item 3.4.2) foram adicionados ao mix de nested PCR [1 x PCR Buffer (Invitrogen™), 0,2mM de cada dNTP, 0,5 µM de cada primer (IBVNA, 793S, D274S e H120S, QUADRO 2, FIGURA 4) 20,25 µL água ultra-pura esterilizada e 1,25U de Platinum Taq DNA polymerase (Invitrogen™) para uma reação final de 50µL] e submetidos a 35 ciclos de 94°C/ 1minuto, 48°C/1,5minutos e 72°C/2minutos, seguidos por 72°C/ 10 minutos para extensão final. Nesta etapa, foram adicionados tubos com água ultra-pura a cada quatro amostras para monitoramento de contaminações por DNA amplificado. As diferentes etapas foram feitas em salas separadas para evitar possíveis contaminações.

A determinação do sorotipo/genotipo presente na amostra em estudo foi determinada pelo tamanho do amplicon obtido em gel de agarose a 1,5% corado com brometo de etídeo 0,5 µg/mL após a fase de nested PCR, conforme o quadro 2, figura 4:

Primer	Seqüência	Especificidade	Posição
IBVAS	5' CWCTATAAACACCYTTRCA 3'	Todos os genotipos	1170-1193
IBVS	5' YACTGGYAATTTTTCAGATGG 3'	Todos os genotipos	729-749
IBVNA	5' CAGATTGCTTRCAACCACC 3'	Todos os genotipos	1093-1111
793S	5' AGTAGTTTTGTGTATAAAYCA 3'	4/91	958-978
D274S	5' ATACAATTATATCAAACCAGC 3'	D274	895-915
H120S	5' AATACTACTTTTACGTTACAC 3'	Massachusetts	817-837

Quadro 2 – Primers e respectivas seqüências dirigidos à região codificadora da subunidade S1 da proteína S do vírus da bronquite infecciosa das galinhas para a tipificação das amostras detectadas

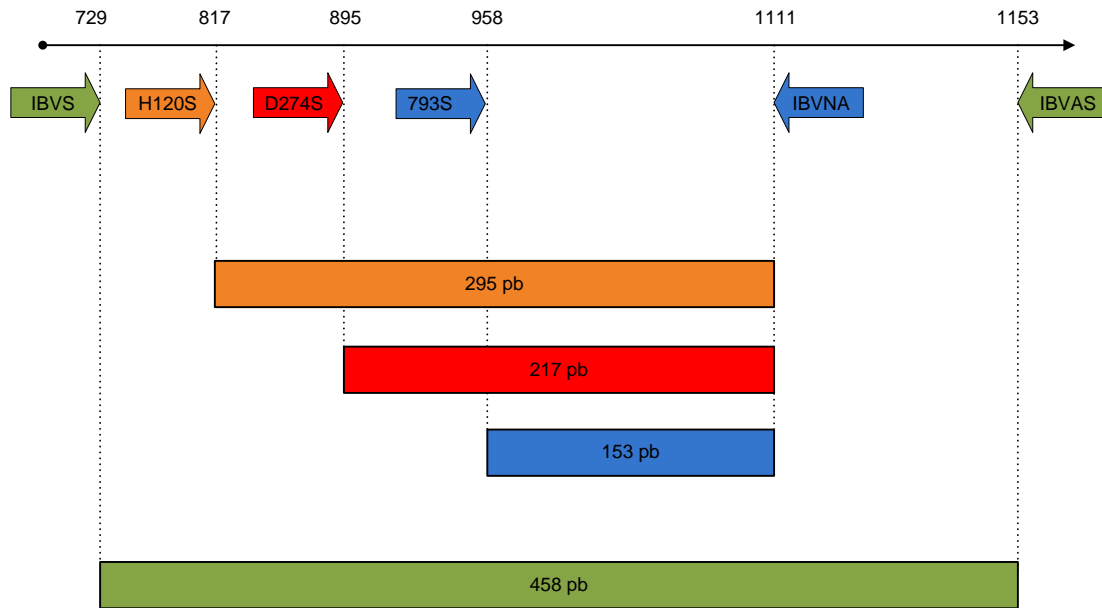


Figura 4 - Representação esquemática da posição dos primers na região codificadora da subunidade S1 da proteína S de IBV. As setas coloridas são representações esquemáticas dos primers e suas respectivas identificações. As faixas retangulares representam o produto amplificado. A numeração assinalada, na horizontal, corresponde à adotada pela amostra no gene S1 em relação à amostra de IBV

3.5 NESTED RT-PCR PARA AMPLIFICAÇÃO PARCIAL DA REGIÃO CODIFICADORA DA SUBUNIDADE S1 DA PROTEÍNA S DE IBV

As amostras classificadas como positivas para a presença de IBV conforme o item 1.3, mas que não resultaram nos fragmentos esperados após a reação de multiplex nested RT-PCR (item 3.4), foram submetidas ao seqüenciamento de DNA a partir de um segmento de 390pb da região codificadora da subunidade S1 da proteína S de IBV, com os primers descritos por Worthington et al. (2008), segundo o protocolo a seguir:

3.5.1 Síntese de cDNA (transcrição-reversa)

Foram desnaturados 7 µL do RNA obtido conforme o item 3.3.2 a 95 °C durante 5 minutos e adicionados ao mix de transcrição reversa contendo 1 x First

Strand Buffer (Invitrogen™), 1mM de cada dNTP, 10mM DTT, 1µM de cada primer (SX1+ e SX2-, Quadro 3, Figura 5) e 200U de M-MLV Reverse Transcriptase (Invitrogen™) para um volume de reação final de 20µL, realizando-se a transcrição reversa a 42°C/60 minutos.

3.5.2 Primeira amplificação

A seguir, 5 µL de cada cDNA foram adicionados ao mix de PCR [1 x PCR Buffer (Invitrogen™), 0,2mM de cada dNTP, 0,5 µM de cada primer (SX1+ e SX2-, Quadro 3, Figura 5), 1,5mM MgCl₂, 25,25 µL água ultra-pura esterilizada e 1,25U de Platinum Taq DNA polymerase (Invitrogen™) para uma reação final de 50µL] e submetidos a 35 ciclos de 94°C/ 1 minuto, 48°C/1,5 minutos e 72°C/2 minutos, seguidos por 72°C/10 minutos para extensão final.

3.5.3 Segunda amplificação (nested PCR)

Cinco microlitros do produto da primeira amplificação (item 3.5.2) foram adicionados ao mix de nested PCR [1 x PCR Buffer (Invitrogen™), 0,2mM de cada dNTP, 0,5 µM de cada primer (SX3+ e SX4-, Quadro 3, Figura 5) 25,25 µL água ultra-pura esterilizada e 1,25U de Platinum Taq DNA polymerase (Invitrogen™) para uma reação final de 50µL] e submetidos a 35 ciclos de 94°C/ 1minuto, 48°C/1,5minutos e 72°C/2minutos, seguidos por 72°C/ 10 minutos para extensão final.

Nesta etapa, foram adicionados tubos com água ultra-pura a cada quatro amostras para serem avaliadas contaminações por DNA amplificado. As diferentes etapas foram feitas em salas separadas para evitar possíveis contaminações.

Foram consideradas positivas as amostras que resultaram na banda correspondente de 390 pb em gel de agarose a 1,5% corado com brometo de etídeo 0,5 µg/mL.

Primer	Seqüência	Posição
SX1+	5' CACCTAGAGGTTTGYTWGCAT 3'	677-697
SX2-	5' TCCACCTCTATAAACACCYTT 3'	1150-1170
SX3+	5' TAATACTGGYAATTTTTCAGA 3'	705-725
SX4-	5' AATACAGATTGCTTACAACCACC 3'	1072-1094

Quadro 3 – Primers e respectivas seqüências dirigidos à região codificadora da subunidade S1 da proteína S do vírus da bronquite infecciosa das galinhas para a tipificação das amostras detectadas

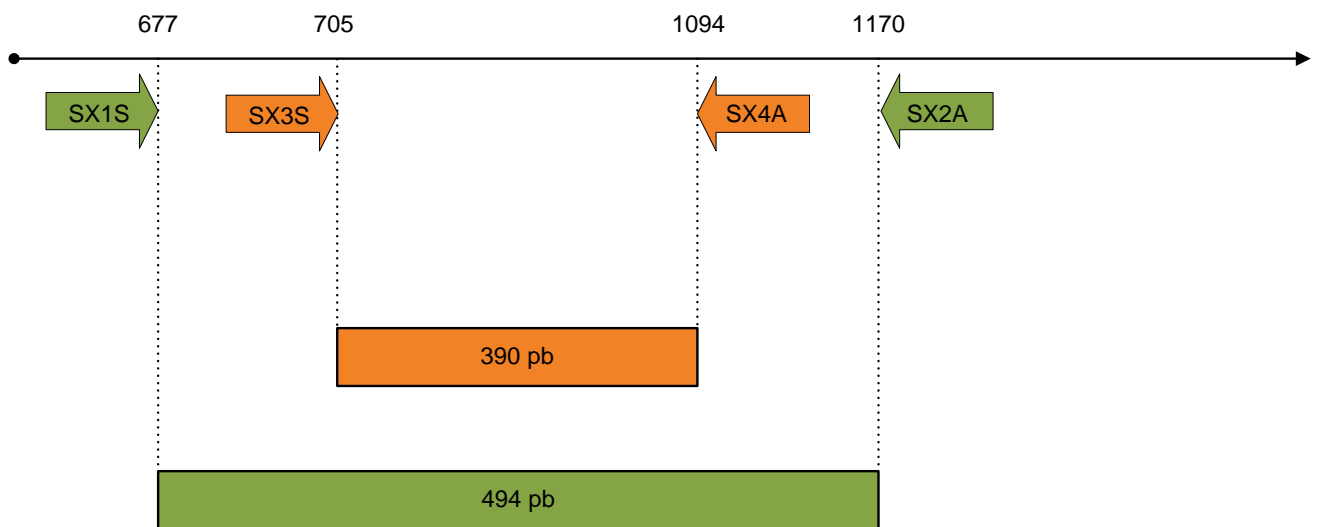


Figura 5 - Representação esquemática da posição dos primers na região codificadora da subunidade S1 da proteína S de IBV. As setas coloridas são representações dos primers e suas respectivas identificações. As faixas retangulares representam o produto amplificado. A numeração assinalada, na horizontal, corresponde à posição no gene S, com base na amostra UK/793 de IBV GeneBank Z83979

3.6 SEQÜENCIAMENTO DE DNA

Para obtenção das sequências de interesse, foram empregados os seguintes materiais e métodos.

3.6.1 Purificação dos produtos de PCR e seqüenciamento de DNA

A purificação dos produtos de PCR para o gene S com 390pb obtidos conforme o item 3.5 foi realizada utilizando-se GeneJET™ Gel Extraction Kit (Fermentas), conforme indicado pelo fabricante, sendo o DNA assim purificado e quantificado visualmente com Low Mass DNA Ladder (Invitrogen™), segundo instruções do fabricante.

A reação de seqüenciamento de DNA consistiu em 4 µL de BigDye 3.1 (Applied Biosystems™), 4 µL de 5x Sequencing buffer (Applied Biosystems™), 3,2 µmol de cada primer (SX3+ e SX4-) em reações separadas, 30ng do DNA alvo e água ultra-pura esterilizada q.s.p. para uma reação final de 10 µL, levando-se ao termociclador Mastercycler Gradient (Eppendorf™) para 35 ciclos de 96 °C/10 segundos, 50 °C/5 segundos e 60°C/4 minutos, com rampa de 1°C/segundo 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 x g/ 25 minutos, removendo-se o sobrenadante e adicionando-se 250µL de etanol a 70%, centrifugando-se a 12.000 x g/5 minutos e secando-se o precipitado.

Após esta etapa, as seqüências foram resolvidas em seqüenciador automático ABI-377 (Applied Biosystems™).

3.6.2 Edição de seqüências

Os cromatogramas gerados para cada uma das seqüências senso e antisenso de cada amostra foram submetidos ao aplicativo Phred *online* em <http://asparagin.cenargen.embrapa.br/phph/>¹ para avaliação da qualidade dos mesmos, utilizando-se apenas posições com escore superior a 20 (1 erro a cada 100 nucleotídeos).

A seqüência final de cada amostra foi obtida com o aplicativo Cap-Contig com o programa Bioedit v. 7.0.5.3 (HALL, 1999), sendo a mesma submetida ao BLASTn para confirmação do seqüenciamento em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>².

3.7 ANÁLISE GENEALÓGICA

As seqüências finais obtidas foram analisadas utilizando-se o aplicativo Phred (*online* em <http://asparagin.cenargen.embrapa.br/phph/>), prosseguindo na análise apenas seqüências com escores superiores a 20.

A árvore genealógica para as seqüências de nucleotídeos foi gerada após o alinhamento das mesmas com seqüências homólogas recuperadas dos Genbank correspondentes aos diversos genotipos de IBV pelo método CLUSTAL/W com o programa Bioedit v. 7.0.5.3 (HALL, 1999).

Os alinhamentos foram utilizados para a geração da árvore com critério de otimização de distância, com algoritmo Neighbour-Joining e modelo evolutivo Maximum Composite Likelihood utilizando-se o programa MEGA 4.0 (TAMURA et al., 2007).

¹Phred Aplicativo disponível em: <<http://asparagin.cenargen.embrapa.br/phph/>>. Acesso em: 2011.

²BLAST Aplicativo disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>. Acesso em: 2011.

RESULTADOS

4 RESULTADOS

Os resultados foram divididos conforme a metodologia empregada para melhor compreensão.

4.1 SEMI-NESTED RT-PCR PARA DETECÇÃO DA BRONQUITE INFECCIOSA DAS GALINHAS

Os resultados da triagem das amostras positivas para a presença de RNA de IBV foram divididos em pools de órgãos e lote para melhor apresentação.

4.1.1 Resultados por pools de órgãos

Dos 160 pools de diversos órgãos testados, 89 (89/160) foram positivos para a presença do RNA de IBV (55,63%) como demonstrou a reação de semi-nested RT-PCR dirigida à região 3'UTR (item 3.3.3).

Considerando-se a divisão por órgãos, 40% (6/15) dos aparelhos reprodutores femininos eram positivos; não houve positividade para IBV nos pools de baço, coração e fígado analisados; 69,7% (23/33) dos conteúdos entéricos foram positivos; 40% (2/5) dos músculos peitorais foram positivos para IBV; 48% (12/25) dos pools de pulmões foram positivos; 44% (11/25) dos rins foram positivos; 66,7% (2/3) dos testículos foram positivos; dos pools de traquéias foram positivos 41,9% (13/31) e a positividade para os pools de suabes traqueais foi de 100% (20/20), segundo a tabela 1 e gráfico 1 a seguir:

Tabela 1 - Frequência de detecção de RNA de IBV em pools de diversos órgãos

ORGÃOS	TOTAL	POSITIVO		NEGATIVO	
	N	n	%	n	%
Aparelho Reprodutor Feminino	15	6	40	9	60
Baço	1	0	0	1	100
Conteúdo Entérico	33	23	69,7	10	30,3
Coração	1	0	0	1	100
Fígado	1	0	0	1	100
Músculo Peitoral	5	2	40	3	60
Pulmão	25	12	48	13	52
Rim	25	11	44	14	56
Testículo	3	2	66,7	1	33,3
Traquéia	31	13	41,9	18	58,1
Suabes Traqueais	20	20	100	0	0
TOTAL	160	89		71	

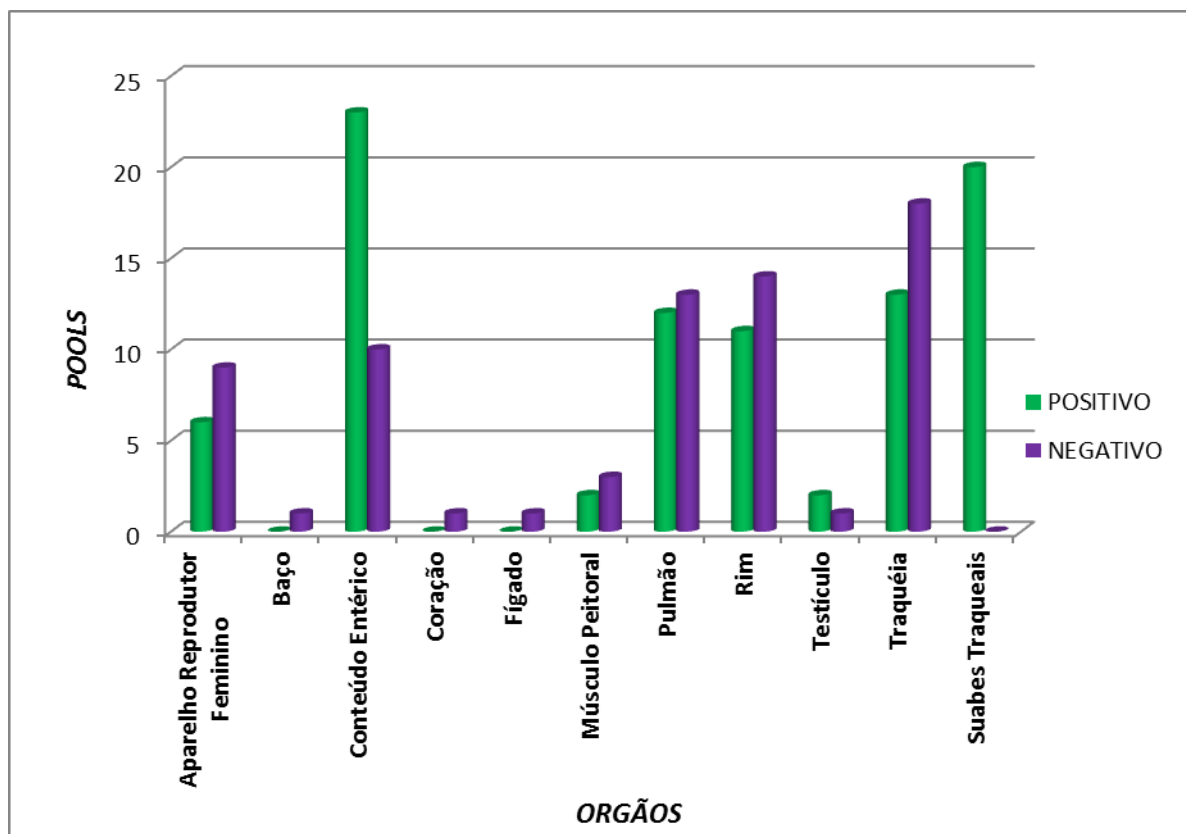


Gráfico 1 - Frequência de detecção RNA de IBV em pools de diversos órgãos

4.1.2 Resultados por lotes

Em 30 dos 31 lotes testados (96,77%) foi detectada a presença de IBV.

Considerando-se a região geográfica, as regiões Nordeste, Sudeste e Sul foram 100% positivas para a presença de IBV, enquanto que, para região Centro-oeste, 90% (9/10) dos lotes analisados foram positivos. Houve, também, positividade de 100% (11/11) para os lotes que não tiveram sua origem informada, conforme tabela 2 e gráfico 2 a seguir:

Tabela 2 – Frequência de detecção de RNA de IBV por região geográfica

REGIÃO	TOTAL		POSITIVO		NEGATIVO	
	n		n	%	n	%
Centro-oeste	10		9	90	1	10
Nordeste	3		3	100	0	0
Sudeste	1		1	100	0	0
Sul	6		6	100	0	0
Não Informada	11		11	100	0	0
TOTAL	31		30		1	

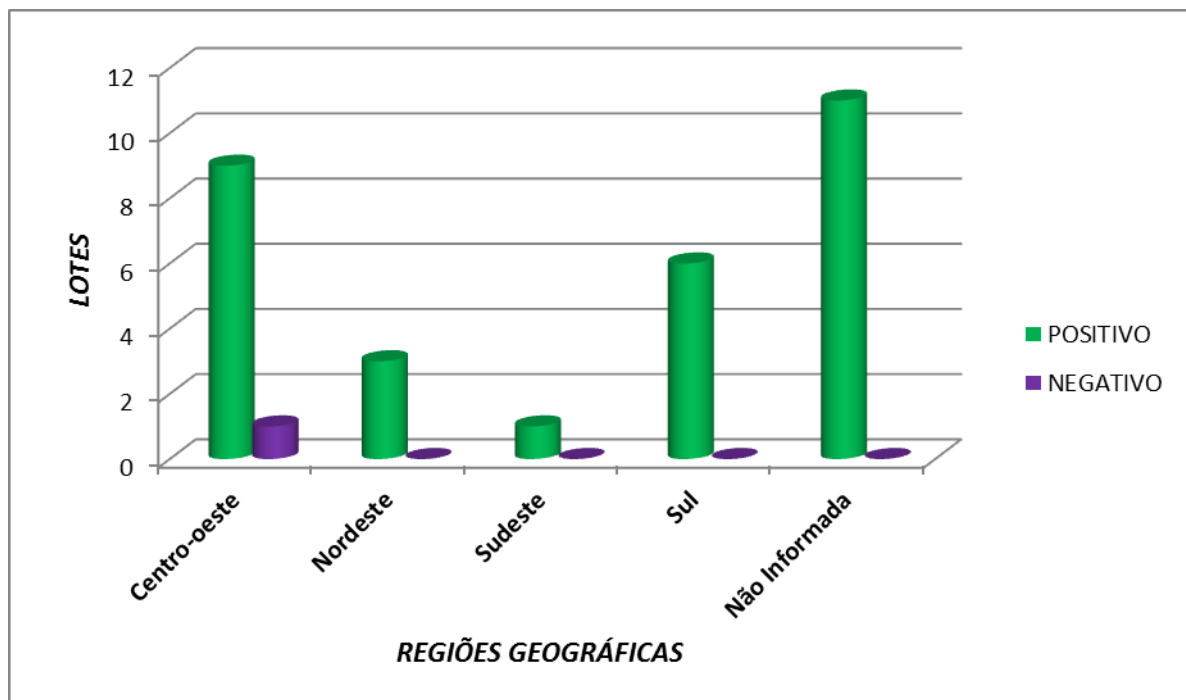


Gráfico 2 - Frequência de detecção de RNA de IBV por região geográfica

4.2 MULTIPLEX NESTED RT-PCR PARA TIPIFICAÇÃO DAS AMOSTRAS POSITIVAS PARA IBV

As 89 amostras positivas para IBV foram testadas para a região codificadora da subunidade S1 da proteína de espícula para determinar se pertenciam ao sorotipo/genotipo Massachusetts, D274, 4/91 ou variante (caso a amostra não classificasse em nenhum desses sorotipos/genotipos), item 3.4.1.

4.2.1 Resultados por pools de órgãos

Destas 89 amostras testadas, 79 foram consideradas do genotipo Variante (88,46%), enquanto que, 10 pools foram do genotipo/sorotipo Massachusetts (11,54%).

Conforme tabela 3 e gráfico 3 a seguir, quando classificados por órgãos, 83,33% (05/06) dos aparelhos reprodutivos feminino pertencem ao genotipo Variante e 16,67% (01/06) pertencem ao sorotipo/genotipo Massachusetts; todos os pools de pulmão, rim, testículo, traquéia e músculo peitoral pertencem ao genotipo Variante; dos conteúdos entéricos positivos, 86,95% (20/23) são pertencentes ao genotipo Variante e 13,05% (03/23) pertencem ao sorotipo/genotipo Massachusetts. Houve, também, 80% (16/20) de pools de suabes traqueais pertencentes ao genotipo Variantes e 20% (04/20) pertencem ao sorotipo/genotipo Massachusetts.

Tabela 3 – Frequência das estirpes de IBV em pools de diversos órgãos

ORGÃOS	VARIANTES		MASSACHUSETTS		TOTAL
	N	%	n	%	n
Aparelho Reprodutor Feminino	5	83,3	1	16,7	6
Conteúdo Entérico	20	87,0	3	13,0	23
Músculo Peitoral	2	100	0	0	2
Pulmão	11	91,7	1	8,3	12
Rim	11	100	0	0	11
Testículo	2	100	0	0	2
Traquéia	12	92,3	1	7,7	13
Suabes Traqueais	16	80,0	4	20,0	20
TOTAL	79		10		89

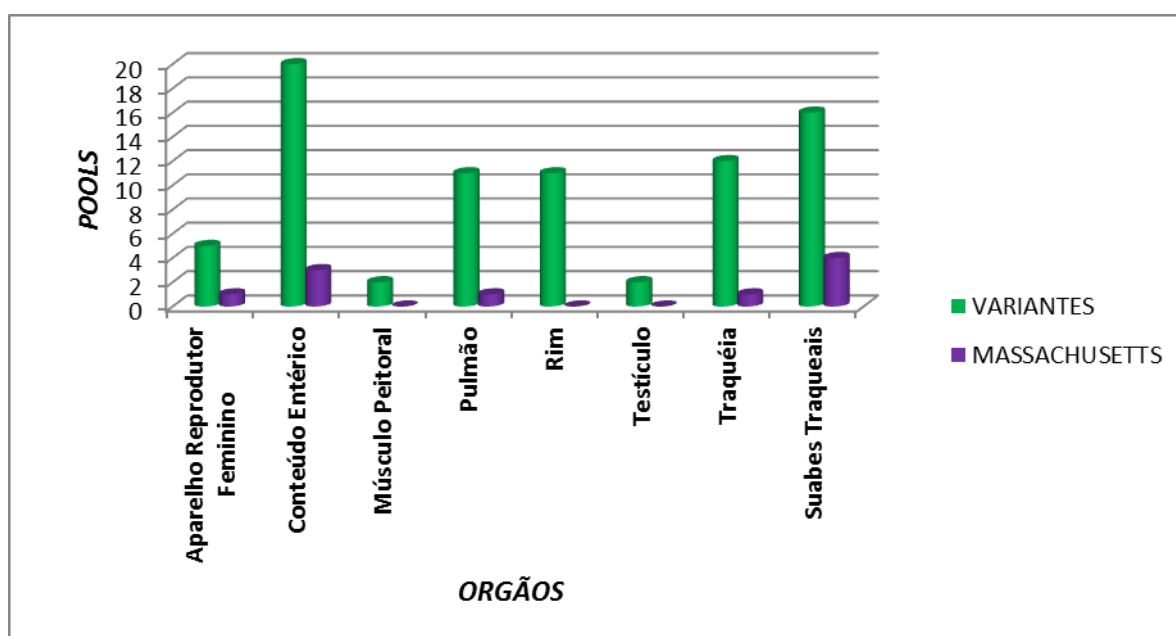


Gráfico 3 - Frequência das estirpes de IBV em pools de diversos órgãos

4.2.2 Resultados por lotes

Dentre os 30 lotes positivos para IBV, 73,33% (22/30) foram classificados como genotipo Variante e 26,67% (08/30) foram detectados o sorotipo/genotipo Massachusetts.

Quando considerada a região de origem, temos: na região centro-oeste, 66,67% (06/09) dos lotes positivos para IBV pertencem ao genotipo Variante e

22,23% (03/09) pertence ao sorotipo/genotipo Massachusetts; na região Nordeste (03) e Sudeste (01), todos os lotes positivos pertencem ao genotipo Variante; da região Sul, 83,33% (05/06) dos lotes positivos foram classificados como genotipo Variante e 16,67% (01/06) pertencentes ao sorotipo/genotipo Massachusetts. Dos lotes cuja origem não foi informada, 63,63% (07/11) daqueles positivos para IBV foram detectados como pertencentes ao genotipo Variante e 33,37% (04/11) foram classificados como sorotipo/genotipo Massachusetts, conforme tabela 4 e gráfico 4.

Tabela 4 - Frequência das estirpes de IBV em pools de diversos órgãos

REGIÕES	VARIANTES		MASSACHUSETTS		TOTAL
	n	%	n	%	n
Centro-Oeste	6	80	3	20	9
Nordeste	3	100	0	0	3
Sudeste	1	100	0	0	1
Sul	5	60	1	40	6
Não informado	7	66,67	4	33,33	11
TOTAL	22		8		30

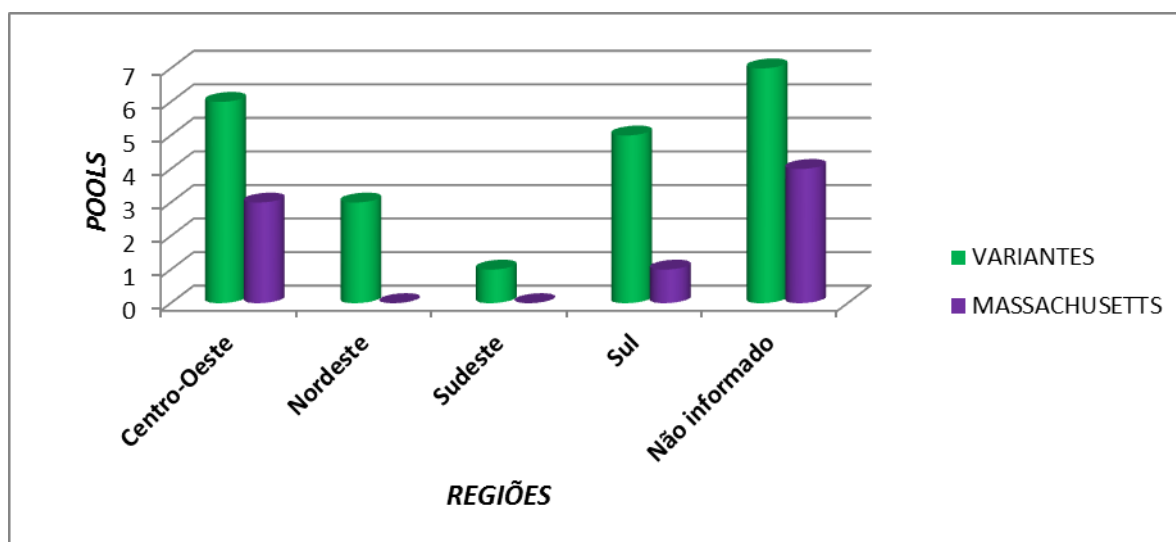


Gráfico 4 - Frequência das estirpes de IBV em pools de diversos órgãos

4.3 SEQUENCIAMENTO DE DNA

Cinquenta e oito amostras foram submetidas à nested RT-PCR para amplificação parcial da região codificadora da subunidade S₁ da proteína S de IBV (item 3.5). As amostras foram sequenciadas aleatoriamente conforme seguia-se a realização das reações para detecção e tipificação de IBV.

Quinze amostras foram positivas para esta NESTED-PCR, resultando em amplicons de 390 pb entre os nucleotídeos 705 e 1094 da região codificadora de S₁, e destas, 10 amostras (Quadro 4) demonstraram escore superior a 21 quando submetidas ao PHRED (Phil's Read Editor), para avaliação da qualidade das sequências.

Amostra	Tipo de criação	Região	Idade	Genbank	Genotipo	Sinais	Órgão
5T	Matriz	S	33		Massachusetts	NI	traquéia
7	Matriz	S	27		Brasil	NI	pulmão
11	Matriz	CO	28		Massachusetts	NI	traquéia
21	Matriz	NE	48		Massachusetts	NI	suabe traqueal
22 A1	Frango de Corte	NE	8		Brasil	NI	suabe traqueal
22 A2	Frango de Corte	NE	8		Brasil	NI	suabe traqueal
23 A1	Frango de Corte	NE	6		Massachusetts	NI	suabe traqueal
23 A2	Frango de Corte	NE	6		Massachusetts	NI	suabe traqueal
23 A3	Frango de Corte	NE	6		Massachusetts	NI	suabe traqueal
24 AR	Matriz	CO	61		Brasil	respiratório e reprodutivo	aparelho reprodutor
MASS 01				FJ791274			
MASS 02				FJ791275			

Quadro 4 – Informação epidemiológica das amostras de IBV sequenciadas e utilizadas no presente estudo. MASS 01 e MASS 02 referem-se a amostras vacinais sorotipo Massachusetts de diferentes fabricantes utilizadas no Brasil

4.4 ANÁLISE GENEALÓGICA

Na árvore genealógica (Figura 6), as dez sequências geradas neste estudo, dividiram-se, em dois grupamentos: um grupamento exclusivo de amostras brasileiras de IBV e um grupamento referente ao sorotipo/genotipo Massachusetts.

O grupamento exclusivo de amostras brasileiras, sustentado por um valor de bootstrap de 83, inclui a sequência das amostras 5T (traquéia), 7 (pulmão), 22A1 e 22A2 (suabes traqueais), sendo as duas últimas procedentes de mesmo lote e de suabes traqueais. As amostras 5T, 22A1 e 22A2 formaram um subgrupo exclusivo dentro do grupamento de amostras brasileiras. Esse cluster inclui outras amostras de campo de IBV do Brasil, denominadas USP, com um valor 100. No entanto, as sequências referentes às amostras 11(traquéia), 21, 23A1, 23A2, 23A3 (suabes traqueais) e 24AR (aparelho reprodutor feminino) segregaram em um cluster formado pelas sequências pertencentes ao genotipo Massachussets e de duas das principais vacinas de diferentes fabricantes, identificadas como Mass 01 e Mass 02, utilizadas no Brasil, com um valor de bootstrap de 99 .

Considerando as amostras variantes brasileiras e as que agruparam no sorotipo/genotipo Massachusetts, a análise de aminoácidos apresentou uma variação de identidade de 79% a 100% entre elas. As amostras brasileiras quando comparadas aos sorotipos clássicos utilizados neste estudo obtiveram uma identidade de aminoácidos que variou entre: 79% a 80% para Mass; 81% a 82% para o sorotipo Arkansas; 80% a 81% para California 99; 54% a 55% para sorotipo DE072; 79% a 81 para o sorotipo Connecticut e para o sorotipo a variação foi de 53% a 54%. Para o sorotipo D274 não houve variação de identidade quando comparado com as amostras brasileiras e a análise de aminoácidos obteve uma identidade de 79%. As identidades de aminoácidos encontram-se descritas na tabela 5.

Para as amostras 23A1, 23A2, 23A3 e 24AR a identidade de aminoácidos para Mass 01 e Mass 02 foi de 100% e 97,9%, respectivamente. No entanto para a amostra 21 a identidade de aminoácidos foi 100% para Mass 02 e 97,9% para Mass 01.

Não houve observação de tendências de grupamento das sequências em relação a ano de coleta, origem geográfica, criação, órgão ou sinais clínicos das amostras.

Tabela 5 – Comparação de identidade média de aminoácidos (em porcentagem) da região S1 da proteína S de IBV (sequência Z83979) para amostras do presente estudo e os sorotipo/genotipos de referência

Sequências	Percentual de similaridade de aminoácidos									
	5T	7	11	21	22A1	22A2	23A2	23A3	23A1	24AR
5T		88%	79%	79%	100%	100%	79%	79%	79%	79%
7	88%		81%	81%	88%	88%	81%	81%	81%	81%
11	79%	81%		97%	79%	79%	98%	98%	98%	98%
21	79%	81%	97%		79%	79%	99%	99%	99%	99%
22A1	100%	88%	79%	79%		100%	80%	80%	80%	80%
22A2	100%	88%	79%	79%	100%		80%	80%	80%	80%
23A2	79%	81%	98%	99%	80%	80%		100%	100%	100%
23A3	79%	81%	98%	99%	80%	80%	100%		100%	100%
23A1	79%	81%	98%	99%	80%	80%	100%	100%		100%
24AR	79%	81%	98%	99%	80%	80%	100%	100%	100%	
Mass	79%	81%	99%	98%	80%	80%	99%	99%	99%	99%
D274	79%	79%	82%	82%	79%	79%	83%	83%	83%	83%
Arkansas	81%	81%	80%	80%	82%	82%	81%	81%	81%	81%
California	80%	81%	80%	80%	81%	81%	81%	81%	81%	81%
DE072	54%	55%	54%	55%	54%	54%	55%	55%	55%	55%
Connecticut	79%	81%	97%	96%	79%	79%	97%	97%	97%	97%
4/91	53%	54%	62%	61%	53%	53%	62%	62%	62%	62%

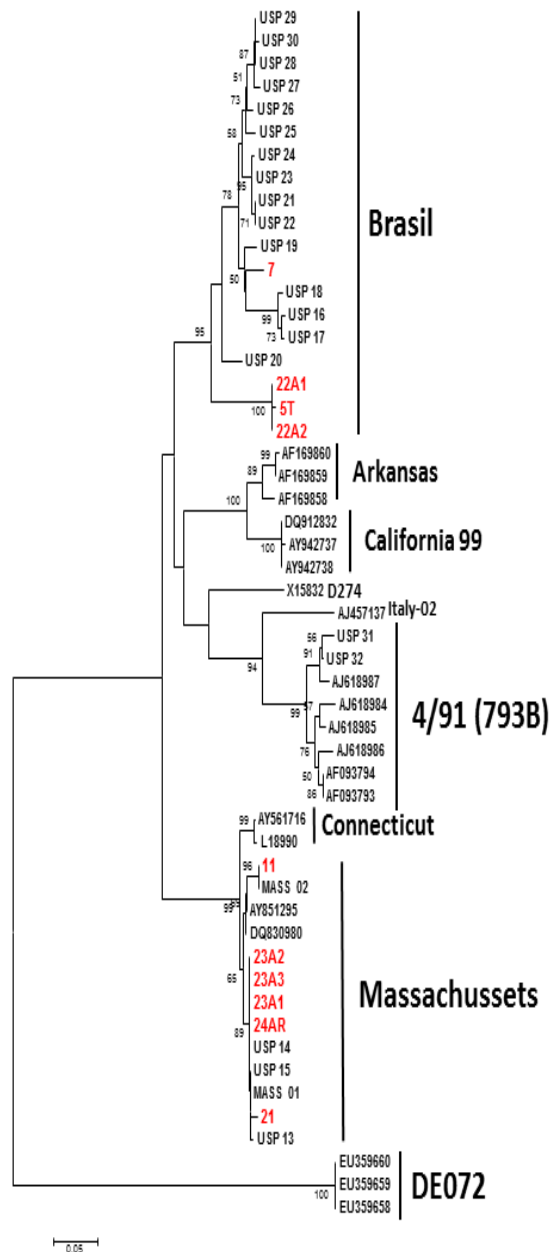


Figura 6 - Árvore genealógica para seqüências parciais do gene codificador da subunidade S1 da proteína S do vírus da Bronquite Infecciosa das galinhas construída com critério de otimização de distância, com algoritmo Neighbour-Joining e modelo evolutivo Maximum Composite Likelihood, destacando-se em vermelho as amostras do presente estudo (5T, 7, 11, 21, 22A1, 22A2, 23A1, 23A2, 23A3 e 24AR), mais amostras clássicas de IBV. Mass 01 e Mass 02 são amostras vacinais de diferentes fabricantes que também foram incluídas no estudo. Os números próximos de cada nó representam os valores de 1000 repetições de bootstrap, tendo sido demonstrados apenas valores de bootstrap acima de 50%. A barra representa o número de substituições por sítio

DISCUSSÃO

5 DISCUSSÃO

No presente estudo, foi detectada a presença do RNA de IBV de forma disseminada no organismo das aves e em várias regiões brasileiras, além da diversidade genotípica entre amostras de campo e vacinais.

Em relação ao aparelho reprodutor feminino, a detecção de IBV em 40% das amostras é um importante achado, pois é conhecido que a presença do vírus em órgãos reprodutivos de aves pode causar declínios severos na produção, assim como, comprometer a qualidade interna e da casca dos ovos (CHOUSALKAR; ROBERTS, 2004).

O vírus da bronquite infecciosa das galinhas não foi detectado no baço, coração e fígado, mas podemos considerar que o número de amostras para estes órgãos foi muito baixo, não permitindo realizar uma avaliação estatística melhor quando comparado aos demais órgãos. Em alguns estudos já foi detectado IBV nestes órgãos (ALEXANDER; GOUGH, 1977; OTSUKI et al., 1990), mas os achados foram atribuídos à viremia, uma vez que se encontra grande quantidade de sangue dentro desses órgãos, podendo então ter sido detectado o vírus presente em células sanguíneas circulantes e não por replicação no órgão em si. Também devemos

Ambali e Jones (1990) demonstraram por imunofluorescência a replicação de IBV em células epiteliais apicais das vilosidades no íleo e reto. Além disso, em outros estudos conseguiu-se isolar o vírus do proventrículo (ABDEL – MONEIN et al., 2009), jejuno e íleo (DHINAKAR; JONES, 1997a). No presente estudo, houve a detecção de RNA de IBV em 69,7% dos conteúdos entéricos no presente estudo, podendo-se sugerir que houve replicação viral nos enterócitos como já descrito por Saif (1993). A replicação nessas células, resulta em atrofia, causando diarreia e má absorção. Por outro lado, é possível que a excreção de IBV e sua conseqüente detecção nas fezes, ocorra devido à presença de metabólitos oriundos dos rins de aves infectadas com o vírus (CHOUSALKAR; CHEETHAM; ROBERTS, 2010).

Nas amostras de musculatura peitoral do presente estudo, não foram observadas lesões macroscópicas que podem ser atribuídas à formação e deposição de imunocomplexos nas paredes capilares (DHINAKAR; JONES, 1996). Porém, até hoje, sabe-se que o sorotipo 793B é responsável por causar esse tipo de lesão (DHINAKAR; JONES, 1997a).

Considerando a detecção de IBV em 48% e 41,9%, respectivamente, dos pulmões e traquéias, é possível afirmar que esses achados são decorrentes do fato do vírus afetar primariamente o trato respiratório superior das aves, sendo esse o sítio de replicação principal do IBV (MCMARTIN, 1993). O vírus é epiteliotrópico, ocorrendo replicação nas células epiteliais e muco-secretoras da traquéia (DHINAKAR; JONES, 1997a) e nas células epiteliais dos pulmões e dos sacos aéreos (JANSE; VAN ROOZELAAR; KOCH, 1994).

A frequência de IBV nos rins foi de 44% e em algumas amostras detectaram-se cálculos renais. Nefropatogenicidade tem sido associada com algumas cepas do IBV, causando até 30% de mortalidade em aves vacinadas e não vacinadas, caracterizando-se por aumento e palidez dos rins, depósito de uratos nos túbulos, desidratação severa e perda de peso nas aves (LIU; KONG, 2004).

Em 66,7% (02/03) dos testículos testados havia o vírus da bronquite infecciosa das galinhas. Ainda é controverso o papel de IBV no desenvolvimento de infertilidade em reprodutores machos, pois ainda não há uma associação definitiva estabelecida (VILLARREAL et al., 2007). Mahecha et al. (2002), conduziram um experimento para avaliar se o desenvolvimento de cálculos epididimais estava correlacionado com a presença de IBV ou de cálcio na dieta e concluíram que ambos não tinham relação com a formação de cálculos. Em contrapartida, outros estudos (BOLTZ et al., 2004; BOLTZ et al., 2006) utilizando galos vacinados com sorotipo Massachusetts atenuado e inativado descreveram o envolvimento do vírus na formação de cálculos e redução nas concentrações espermáticas e de testosterona das aves, apesar de não terem esclarecido a patogênese.

Nos swabs traqueais a presença de IBV foi unânime em todas as amostras (20/20). Podemos considerar esse achado um dado importante, pois além da vantagem da possibilidade de se fazer amostragem em aves vivas, permitindo o monitoramento do lote em produção, também é possível aumentar o número de amostras investigadas. No entanto, é necessário salientar que, segundo a literatura, os maiores títulos virais encontrados nas traquéias ocorrem entre 5 e 10 dias pós-infecção, ou seja, na fase aguda e clínica da doença (AMBALI; JONES, 1990; OTSUKI, 1990).

Numa análise por regiões geográficas, não foi possível observar se IBV está amplamente disseminado por todo Brasil, uma vez que por tratar-se de amostras de um banco de conveniência não é possível fazer maiores inferências já que o número

de amostras para todas regiões foi baixo. É necessário aumentar o número de lotes por região para se obter uma análise estatística melhor.

A *multiplex* RT-PCR utilizada para tipificação das amostras em sorotipo/genotipo Massachusetts, 793B (4/91) e D274 revelou que 88,46% (79/89) das amostras detectadas para IBV não eram pertencentes a nenhum desses três sorotipo/genotipo (então classificadas como Variantes).

As 79 amostras analisadas foram provenientes de todas as regiões analisadas, evidenciando a alta ocorrência de variantes em lotes vacinados, o que demonstra a falha na proteção cruzada do sorotipo/genotipo Massachusetts contra genotipos Variantes de campo.

A detecção e tipificação de isolados de campo de IBV são necessárias, não somente para estudo de evolução do vírus, mas também para modificações dos programas de vacinação (CAVANAGH, 2005). Por esta razão, 58 amostras tipificadas como genotipo Variante de diferentes regiões geográficas foram submetidas à nested RT-PCR para amplificação parcial da região codificadora da subunidade S₁ da proteína S de IBV afim de realizar o sequenciamento parcial do gene codificador da subunidade S1. No entanto duas amostras (11 e 21) foram tipificadas como Variantes, mas quando sequenciadas foram agrupadas no cluster Massachusetts. Esta ocorrência pode estar atribuída a diminuição na sensibilidade da reação por tratar-se de uma multiplex PCR, na qual há uma oferta limitada de enzimas e nucleotídeos e todos os pares de primers competem pela mesma quantidade de reagentes (MARKOULATOS; SIAFAKAS; MONCANY, 2010).

Foram obtidas sequências de 10 amostras. É possível que esse fato seja atribuível a uma baixa quantidade do RNA viral nas amostras devido à falha na conservação após colheita, durante o transporte, ao processo de congelamento e descongelamento das mesmas durante a extração de RNA total (uma vez que se trata de um ácido nucléico extremamente lábil), além de perdas durante a fase de purificação do *amplicon* a partir dos géis de agarose ou, ainda, na fase de precipitação com propanol/ etanol. A baixa viabilidade dos vírus nas amostras poderia ser corrigida com um pré-enriquecimento das amostras de origem antes da extração, com o objetivo de se obter uma maior quantidade de material genético viável (RAMESH et al., 2002). Além disso, trata-se de uma região genômica de difícil sequenciamento, sendo o isolamento em ovos embrionados uma estratégia que vem

sendo frequentemente utilizada para aumentar o sucesso na obtenção de sequências (JI et al., 2011; POHUANG et al., 2011).

Destas dez sequências obtidas, 6 segregaram no grupamento referente ao tipo clássico de IBV utilizado nas vacinas, Massachusetts (11, 21, 23A1, 23A2, 23A3 e 24AR). No entanto, considerando que as vacinas vivas atenuadas são amplamente utilizadas para este vírus, com a metodologia empregada no estudo não foi possível distinguir entre cepa vacinal e de campo. Além disso, trabalhos recentes (DEWITT, 2000; ALVARADO et al., 2006) têm confirmado que amostras de vírus vivo atenuado de IBV tem sido encontradas nas aves por muitas semanas depois da administração. Deve-se considerar, ainda, que 3 dessas 6 amostras são provenientes de uma mesma propriedade, o que pode ter elevado a detecção desse genótipo.

As amostras 5T, 7, 22A1 e 22A2 segregaram em um grupamento exclusivo de variantes de IBV já relatadas no Brasil (VILLARREAL et al., 2010) demonstrando ser geneticamente similares. Essa emergência pode ser derivada de mutações de nucleotídeos que sofreram seleção positiva em função do uso contínuo e massivo do genótipo/sorotipo Massachusetts, como demonstrado por Gallardo; Vansanten; Toro, 2010.

A análise filogenética demonstrou uma baixa identidade de aminoácidos no seqüenciamento parcial da região codificadora do gene S1 entre as amostras variantes e o grupo Mass (78,7%). Essa região é responsável pela codificação dos epítopos que estão envolvidos na proteção e vírus neutralização (IGNJATOVIC; SAPATS, 2000) e, em geral, há uma maior chance de um bom nível de proteção cruzada entre sorotipos que possuem uma alta homologia entre si (COOK et al., 2001; LIU et al., 2009). Além disso, estudos prévios (CAVANAGH; ELLIS; COOK, 1997; LANDMAN; LOUPOS; GELB, 2006; SUN et al.; 2011) demonstraram que o nível de proteção fornecido por vacinas com H120 contra amostras de IBV com baixa identidade em S1 promovem baixa ou nenhuma proteção-cruzada. Por outro lado, algumas amostras que mostraram pequenas diferenças na região codificadora de S1 mostraram queda na proteção cruzada (ABDEL-MONEIN et al., 2006). Estes dados enfatizam a necessidade de estudos in vivo, com inoculação experimental para maiores inferências definitivas sobre a proteção-cruzada da vacina utilizando o sorotipo Mass frente a estas variantes, já que essas informações não podem ser fornecidas somente com a genotipagem das amostras.

As amostras 5T, 22A1 e 22A2 formaram um subgrupo exclusivo no grupamento Brasil e a identidade de aminoácidos ficou mais próxima dos sorotipos Arkansas e Califórnia (82% e 81%, respectivamente) quando comparadas com o sorotipo Massachusetts (79%). Esse achado vem reforçar a hipótese de falha nas estratégias de vacinação utilizadas no Brasil já que essas aves provêm de plantéis vacinados com sorotipo Mass (MONTASSIER, 2010).

O cluster em que segregam-se as quatro amostras variantes do presente estudo, contém as amostras de IBV descritas por Villarreal et al. (2010) nas quais foi identificada uma variação significativa nos genótipos circulantes na indústria avícola brasileira entre 2007 e 2008.

Com relação à identidade de aminoácidos das amostras brasileiras incluídas no presente estudo, verifica-se que mesmo entre variantes nacionais, a variação para os valores de identidade entre amostras é bastante elevada (79% a 100%), comparável às encontradas para a análise de variantes de países diferentes. Isso pode decorrer pelo fato do Brasil ser um país de dimensões continentais e que, sobretudo, contém uma enorme população de aves, criadas intensivamente (ABREU et al., 2006; MONTASSIER et al., 2008).

Embora tenha-se alcançado um número relativamente reduzido de sequências de S1 das amostras positivas para IBV, os resultados obtidos demonstram que o fenômeno da emergência de genótipos variantes do vírus continua ocorrendo, fato que merece atenção na avaliação das variantes a serem utilizadas em vacinas no Brasil.

CONCLUSÃO

6 CONCLUSÃO

A partir dos resultados obtidos e dos pontos notados na Discussão, podem ser feitas as seguintes conclusões:

- A detecção do vírus da Bronquite Infecciosa das Galinhas através de semi-nested RT-PCR dirigida para a região 3'UTR do vírus em amostras provenientes de plantéis comerciais brasileiros cujas aves apresentavam sintomas clínicos de infecção pelo vírus foi elevada, especialmente quando considera-se a positividade por órgãos, que foi de 55,63% (89/160).
- A maioria das amostras foi classificada como variantes, apresentando uma frequência total de 88, 46% (79/ 89) quando classificadas por órgãos.
- O sequenciamento parcial do gene S1 nas amostras encontradas nesse estudo demonstrou que quatro delas agruparam-se num grupo exclusivo de amostras brasileiras. Estas quatro amostras quando comparadas com o sorotipo/genotipo Massachusetts apresentou uma divergência bastante elevada na identidade de aminoácidos.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

- ABDEL-MONEIN, A. S.; ZLOTOWSKI, P.; VEITS, J.; KEIL, G. M.; TEIFKE, J. P. Immunohistochemistry for detection of avian infectious bronchitis virus strain M41 in the proventriculus and nervous system of experimentally infected chicken embryos. **Virology Journal**, v. 6, n. 15, 2009.
- ABREU, J. T.; RESENDE, J. S.; FLATSCHART, R. B.; FOLGUERAS-FLATSCHART; MENDES, A. C. R.; MARTINS, N. R. S.; SILVA, C. B. A.; FERREIRA, M. C.; RESENDE, M. Molecular analysis of brazilian infectious bronchitis fields isolates by reverse transcription-polymerase chains reaction, restriction fragment length polymorphism and partial sequencing of the N gene. **Avian Diseases**, v. 50, n. 4, p. 494-501, 2006.
- 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.
- ALVARADO, I. R.; VILLEGAS, P.; EL-ATRACCHE, J.; JACKWOOD, M. W. Detection of Massachusetts and Arkansas serotypes of infectious bronchitis virus in broilers. **Avian Diseases**, v. 50, p. 292-297, 2006.
- AMBALI, A. G.; JONES, R. C. Early pathogenesis in chicks of infection with a non-enterotropic strain of infectious bronchitis virus. **Avian Diseases**, v. 34, p. 809-817, 1990.
- ARMESTO, M.; EVANS, S. CAVANAGH, D.; ABU-MEDIAN, A.-B.; KEEP, S.; BRITTONN, P. A recombinant avian infectious bronchitis virus expressing a heterologous spike gene belonging to the 4/91 serotype. **PLoS ONE**, v. 6, n. 8, 2011.
- BEACH, J. R.; SCHALM, O. W. A filterable virus, distinct from that of laryngotracheitis; the cause of a respiratory disease of chicks. **Poultry of Science**, v. 15, p. 199-206, 1936.
- BEAUDETTE, F. R.; HUDSON, C. B. Cultivation of the virus of infectious bronchitis. **Journal of the American Medical Association**, v. 90, p. 51-60, 1937.
- BOLTZ, D. A.; NAKAI, M.; BAHR, J. M. Avian Infectious Bronchitis Virus: A possible cause of reduced fertility in the rooster. **Avian Diseases**, v. 48, n. 4, p. 909-915, 2004.

BOLTZ, D. A.; ZIMMERMAN, C.R.; NAKAI, M.; BUNICK, D.; SCHERBA, G.; BAHR, J. M. Epididymal stone formation and decreased sperm production in roosters vaccinated with a killed strain of avian infectious bronchitis virus. **Avian Diseases**, v. 50, n. 4, p. 594-598, 2006.

BRANDÃO, P. E.; SANDRI, T. L.; SOUZA, S. P.; KUANA, S. L.; RICHTZENHAIN, L. J.; VILLARREAL, L. Y. B. Recombination, point mutation 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.

BROADFOOT, D. I.; POMEROY, B. S.; SMITH, W. M. Effects of infectious bronchitis on egg production. **Journal of the American Medical Association**, v. 124, p. 128-135, 1956.

BUSHNELL, L. D.; BRANDLY, C. A. Laryngotracheitis in chicks. **Poultry of Science**, v. 12, p. 55-60, 1933.

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.

CASAI, R.; DOVE, B.; CAVANAGH, D.; BRITTON, P. Recombinant avian infectious bronchitis virus expressing a heterologous spike gene demonstrates that the spike proteins is a determinant of cell tropism. **Journal of Virology**, v. 79, p. 9084-9089, 2003.

CAVANAGH, D. Severe acute respiratory vaccine development: experiences of vaccination against avian infectious bronchitis coronavirus. **Avian Pathology**, v. 32, p. 567-582, 2003.

CAVANAGH, D. Coronavirus avian infectious bronchitis virus. **Veterinary Research**, v. 38, p. 181-197, 2007.

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

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

CAVANAGH, D.; GELB, J. Infectious Bronchitis. In: SAIF, Y. M.; FADLY, A. M.; GLISSON, J. R.; MCDUGALD, L. R.; NOLAN, L. K.; SWAYNE, D. E. **Diseases of poultry**. 12th ed. Ames, IA: Iowa State University Press, 2008. p.117-135.

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.

CHOUSALKAR, K. K.; CHEETHAM, B. F.; ROBERTS, J. R. Detection of infectious bronchitis virus strain N1/88 from the oviduct and feces of experimentally infected vaccinated and unvaccinated hens. *Poultry Science*, v. 89, p. 1603-1608, 2010.

CHOUSALKAR, K. K.; CHEETHAM, B. F.; ROBERTS, J. R. Effects of infectious bronchitis virus vaccine on the oviduct of hens. **Vaccine**. v. 27, p. 1485-1489, 2009.

CHOUSALKAR, K. K.; ROBERTS, J. R. Egg and egg shell quality during IBV infection. **Animal Production Science**, v. 49, n. 2, p. 162-169, 2004.

COOK, J. K. A.; CHESHER, J.; BAXENDALE, W.; GREENWOOD, N.; HUGGINS, M. B.; ORBELL, S. J. Protection of chickens against renal damage caused by a nephropathogenic infectious bronchitis virus. **Avian Pathology**, v. 40, p. 423-426, 2001.

COOK, J. K. A.; ORBELL, S. J.; WOODS, M. A.; HUGGINS, M. B. Breadth of the respiratory tract provided by different live-attenuated infectious bronchitis vaccines against challenge with infectious bronchitis viruses of heterologous types. **Avian Pathology**, v. 28, p. 471-479, 1999.

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

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

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 FABIO, J.; ROSSINI, L. I. Bronquite infecciosa das galinhas. In: CURSO SOBRE SANIDADE AVÍCOLA FORT DODGE, 14^o, São Paulo, 2000.

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

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

GALLARDO, R. A.; VAN SANTEN, V. L.; TORO, H. Host intraspatial selection of infectious bronchitis virus populations. **Avian Diseases**, v. 54, n. 2, p. 807-813, 2010.

GOUGH, R. E.; RANDALL, C. J.; DAGLESS, M.; ALEXANDER, D. J.; COX, W. J.; PEARSON, D. A new strain of infectious bronchitis virus infecting domestic fowl in Great Britain. **Veterinary Record**, v. 130, p. 493-494, 1992.

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.

HAAN, C. A.; MASTERS, P. S.; SHEN, X.; WEISS, S.; ROTTIER, P. J. The group-specific murine coronavirus genes are not essential, but their deletion, by reverse genetics, is attenuating in the natural host. **Virology**, v. 296, p. 177-189, 2002.

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

HODGSON, T.; CASAIS, R.; DOVE, B.; BRITTON, P.; CAVANAGH, D. Recombinant infectious bronchitis coronavirus Beaudette with the spike protein gene of the pathogenic M41 strain remains attenuated but induces protective immunity. **Journal Virology**, v. 78, p. 13804-13811, 2004.

IGNJATOVIC, J.; SAPATS, S. Avian infectious virus. **Revue Scientifique et Technique**, v. 19, n. 2, p. 493-508, 2000.

JANSE, E. M.; VAN ROOZELAAR, D.; KOCH, G. Leukocyte subpopulations in kidney and trachea of chickens infected with infectious bronchitis virus. **Avian Pathology**, v. 23, p. 513-523, 1994.

JI, J.; XIE, J.; CHEN, F.; SHU, D.; ZUO, K.; XUE, C.; QIN, J.; LI, H.; BI, Y.; MA, J.; XIE, Q. Phylogenetic distribution and predominant genotype of the avian infectious bronchitis virus in China during 2008-2009. **Virology Journal**, v. 8, p.184, 2011.

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

JONES, R. C.; JORDAN, F. T. W. The site of replication of infectious bronchitis virus in the oviducts of experimentally infected hens. **Veterinary Record**, v. 89, p. 317–318, 1971.

JONES, R. C.; JORDAN, F. T. W. Persistence of the virus in the tissues and development of the oviduct in the fowl following infection at day-old with infectious bronchitis virus. **Research in Veterinary Science**, v. 13, p. 52–60, 1972.

JUNGHERR, E. L.; CHOMIAK, T. W.; LUGINBUHL, R. E. Immunologic differences in strains of infectious bronchitis virus. In: **Proceedings Sixtieth Annual Meeting of the U. S. Livestock Sanitary Association**, p. 203-209, 1956.

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

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

LIU, S.; ZHANG, X.; WANG, Y.; LI, C.; LIU, Q.; HAN, Z. Evaluation of the protection conferred by commercial vaccines and attenuated heterologous isolates in China against the CK/CH/LDL/971 strain of infectious bronchitis coronavirus. **Veterinary Journal**, n. 179, p. 130-136, 2009.

MAHECHA, G. A. B.; OLIVEIRA, C. A.; BALZUWEIT, K.; HESS, R. A. Epididymal lithiasis in roosters and efferent ductule and testicular damage. **Reproduction**, v. 124, p. 821-834, 2002.

MARKOULATOS, P.; SIAFAKAS, N.; MONCANY, M. Multiplex polimerase chain reaction: a practical approach. **Journal of Clinical Laboratory Analysis**, v.16, p. 47-51, 2002.

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

MONTASSIER, H. J. Molecular epidemiology and evolution of avian infectious bronchitis virus. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, v. 12, n. 2, p. 87-96, 2010.

MONTASSIER, M. F.; 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, n. 3, 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.

POPOVA, R.; ZHANG, X. The Spike but not the hemagglutinin/esterase protein of bovine coronavirus is necessary and sufficient for viral infection. **Virology**, v. 294, p. 222-236, 2002.

POHUANG, T.; CHANSIRIPORNCHAI, N.; TAWATSIN, A.; SASIPREEYAJAN, J. Sequence analysis of S1 genes of infectious bronchitis virus isolated in Thailand during 2008-2009: identification of natural recombination in the field isolates. **Virus Genes**, v. 42, n. 2, p. 254-260, 2011.

RAMESH, A.; PADMAPRIYA, B. P.; CHANDRASHEKAR, A.; VARADARAJ, M. C. Application of a convenient DNA extraction method and multiplex PCR for the direct detection of *Staphylococcus aureus* and *Yersinia enterocolitica* in milk samples. **Molecular and Cellular Probes**, v.16, n.4, p. 307-314, 2002.

SANCHEZ, C. M.; IZETA, A.; SANCHEZ-MORGADO, J. M.; ALONSO, S.; SOLA, I.; BALASCH, M.; PLANA-DURAN, J.; ENJUANES, L. Targeted recombination demonstrates that the spike gene of transmissible gastroenteritis coronavirus is a determinant of its enteric tropism and virulence. **Journal of Virology**, v. 73, n. 9, p. 7607-7618, 1999.

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.; SILVA, S. O. S.; RICHTZENHAIN, L. J.; BRANDÃO, P. E. Trends of infectious bronchitis vírus diversity. **Virus Reviews & Research**, v. 13, p.124-124, 2008. Trabalho apresentado no 19º National Meeting of Virology.

SAPATS, S. I.; ASHTON, F.; WRIGHT, P. J.; IGNJATOVIC, J. Sequence analysis of the S1 glycoprotein of infectious bronchitis viruses: identification of a novel genotypic group in Australia. **Journal of General Virology**, v. 77, p. 413–418, 1996.

SCHALK, A F.; HAWN, M. C. An apparently new respiratory disease of baby chicks. **Journal of the American Medical Association**, v. 78, p. 413-422, 1931.

SEVOIAN, M.; LEVINE, P. P. Effects of infectious bronchitis on the reproductive tracts, egg production, and egg quality of laying chickens. **Avian Diseases**, v. 1, n. 2, p. 136-164, 1957.

SUN, C.; HAN, Z.; MA, H.; ZHANG, Q.; YAN, B.; SHAO, Y.; XU, J.; KONG, X.; LIU, S. Phylogenetic analysis of infectious bronchitis coronaviruses newly isolated in China, and pathogenicity and evaluation of protection induced by Massachusetts serotype H120 vaccine against QX-like strains. **Avian Pathology**, v. 40, p. 43-54, 2011.

TAMURA, K.; DUDLEY, J.; NEI, M.; KUMAR, S. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. **Molecular Biology Evolution**, v. 24, n. 8, p. 1596-1599, 2007.

UBABEF. UNIÃO BRASILEIRA DE AVICULTURA. **Relatório Anual 2010/2011**. Disponível em <<http://www.abef.com.br/ubabef/exibenoticiaubabef.php?notcodigo=2761>>. Acesso em 14/ dez. 11.

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.

VANDEKERCHOVE, D.; DE HERDT, P.; LAEVENS, H.; BUTAYE, P.; MEULEMANS, G.; PASMANS, F. Significance of interactions between *Escherichia coli* and respiratory pathogens in layer hen flocks suffering from colibacillosis-associated mortality. **Avian Pathology**, v. 33, p. 298-302, 2004.

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, 2007.

VILLARREAL, L. Y. B. Diagnosis of infectious bronchitis: an overview of concepts and tools. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, v. 12, n. 2, p.111-114, 2010.

VILLARREAL, L. Y. B.; SANDRI, T. L.; SOUZA, S. P.; RICHTZENHAIN, L. J.; DE WITT, J. J.; BRANDÃO, P. E. Molecular epidemiology of avian infectious bronchitis in Brazil from 2007 to 2008 in breeders, broilers and layers. **Avian Diseases**, v. 54, v. 2, p. 894-898, 2010.

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

WINTERFIELD, R.W.; ALBASSAM, M. A. Nephropatogenicity of infectious bronchitis virus. **Poultry Science**, v. 63, p. 2358-2363, 2004.

WINTERFIELD, R. W.; FADLY, A. M.; HOERR, F. J. Immunity to infectious bronchitis virus from spray vaccination with derivatives of a Holland strain. **Avian Disease**, v. 20, p. 42-48, 1976.

WOO, P. C. Y.; LAU, S. K. P.; HUANG, Y.; YUEN, K.-Y. Coronavirus diversity, phylogeny and interspecies jumping. **Experimental Biology and Medicine**, v. 234, p. 117-1127, 2009.

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.