CAROLINA TORRES ALEJO

Coronavírus em codornas: ocorrência, diversidade molecular e estudo do papel epidemiológico das codornas como reservatório para a bronquite infecciosa das galinhas

São Paulo

2012

CAROLINA TORRES ALEJO

Coronavírus em codornas: ocorrência, diversidade molecular e estudo do papel epidemiológico das codornas como reservatório para a 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. Paulo Eduardo Brandão

São Paulo

2012

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.2553
FMVZ

Torres, Carolina Alejo

Coronavírus em codornas: ocorrência, diversidade molecular e estudo do papel epidemiológico das codornas como reservatório para a bronquite infecciosa das galinhas / Carolina Torres Alejo. -- 2012.

76 p.

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.

Área de concentração: Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Eduardo Brandão.

1. Coronavírus aviário. 2. Ocorrência. 3. Codornas. 4. Galinhas. 5. Reservatório.
I. Título.

Comissão de Ética no uso de animais

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Coronavirus em codornas: ocorrência, diversidade molecular e estudo do papel das codornas como reservatório para a bronquite infecciosa das galinhas", protocolado sob o nº 1935/2010, utilizando 50 (cinquenta) galinhas e codornas, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Paulo Eduardo Brandão, 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 "Coronavirus in quails: occurrence, molecular diversity and the role of quails as reservoirs for avian infectious bronchitis", protocol number 1935/2010, utilizing 50 (fifty) chickens and quails, under the responsibility Prof. Dr. Paulo Eduardo Brandão, 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: TORRES, Carolina Alejo

Título: Coronavírus em codornas: ocorrência, diversidade molecular e estudo do papel epidemiológico das codornas como reservatório para a 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: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

*A mis papás Luis y Vilma
y a mis hermanos Luisa y Daniel
por todo el amor, apoyo incondicional,
y por siempre incentivar me a correr atrás
de mis sueños. Sin ustedes nada sería posible.*

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Prof. Dr. Paulo Eduardo Brandão que com sua sabedoria guiou-me por um caminho que era completamente desconhecido e assumiu o desafio de desenvolver junto comigo um trabalho inovador. Agradeço a ele pelo apoio, pela paciência, pelos conselhos e pela oportunidade de adquirir novos conhecimentos.

A Dra. Laura Yaneth Buitrago Villarreal, por me proporcionar conhecimento de campo e me dar oportunidade de vivenciar experiências fora do laboratório. Agradeço pelo carinho, amizade, apoio, confiança, conselhos, disposição e risadas ao longo deste caminho.

Ao professor Leonardo José Richtzenhain pelo aprendizado e disponibilização do Laboratório de Virologia (VPS-USP) para a elaboração de parte deste trabalho.

A Prof. Dra. Maria Solange Gennari, pelo comprometimento com a Pós-Graduação do VPS.

Ao Prof. Dr. Ricardo Augusto Dias pelos auxílios prestados, pelas conversas e pelos bons momentos.

Aos demais professores do VPS.

A meus queridos amigos Giselle Ayres Rosa Razera “Gi”, Cintia Maria Favero “Tíntia”, Sueli da Silva “Su” Santos, Antonio Francisco Malheiros “Ma” e Francismar Petini “Fra” pela amizade verdadeira, carinho, ensinamentos, por sempre estar dispostos a me ajudar e compartilhar momentos muito importantes na minha vida.

A Olivia Steffen Buffo pela ajuda na realização deste trabalho, amizade, apoio incondicional, companhia, disposição, conselhos e exemplo de perseverança.

A Sheila Oliveira de Souza Silva “Sheilita” pela amizade, paciência, conselhos, disposição e ajuda.

A Aline Santana da Hora por todos os momentos, pela amizade, ajuda, risadas e apoio incondicional.

A Karen Linhares Ferrari e Haila Chagas pela amizade, pelos constantes risos e alegria contagiante.

A Iracema Nunes “Cema”, Karen Asano, Cintia Baldin, Cintia Mori, Paloma, Camila Oliveira, Estella Galluci, Hebert Souza, Amalia Barbieri “Amalias”, Juliana Martins “Ju”, Andrea Estevez e Eveline pela amizade e conselhos.

A Alessandra Marnie Martins Gomes de Castro e Rosely Bianca dos Santos Kuroda pelos conselhos e ajuda.

A Alexandre Sanches "Ale", Sandra Sanchez "Sandrinha", Danival Lopes "Dani", Tânia Delonero, Carol, Gisele de Oliveira, Renatinho, Zenaide Moraes, Maria Cristina Paick, Ana Virgínia Prado, Pedrinho, Jucélia, Claudia e aos demais funcionários, pela amizade, convivência e ajuda.

Aos amigos e pós-graduandos: Eveline, Patricia, Sandra, Bruna, João, Marcos "Piauí", Vasco, Danilo, Jonas, Francisco, Andrea, Vivi, Camila, Thiaguinho, Fer e aos demais pós-graduandos do VPS pela agradável convivência.

A Beatriz Panichi Amaro "Cágado" e a sua família e a Debora Guisso "Dé" pela amizade, risadas e apoio.

A Carlos Mori, Fábio Katayama e Milton Naoto Toyoshima, pela grande ajuda, disposição e ensinios.

Aos donos das granjas pela disposição e por permitir realizar as coletas nas propriedades.

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

A todos os que direta ou indiretamente contribuíram no meu crescimento laboral e pessoal.

Ao CNPq pela bolsa concedida para a realização deste mestrado.

RESUMO

TORRES, C. A. Coronavírus em codornas: ocorrência, diversidade molecular e estudo do papel epidemiológico das codornas como reservatório para a bronquite infecciosa das galinhas. [Coronavirus in quails: occurrence, molecular diversity and the role of quails as reservoir for avian infectious bronchitis virus]. 2012. 76 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

Este estudo teve como objetivo pesquisar a ocorrência e diversidade molecular de coronavírus aviários em codornas e galinhas criadas nas mesmas propriedades e determinar o papel epidemiológico das codornas na bronquite infecciosa das galinhas (BIG). Para isso, foram coletados em granjas localizadas no estado de São Paulo e Espírito Santo *pools* de aparelho reprodutivo, pulmões, rins, traquéia e conteúdo entérico de codornas e galinhas com histórico de manifestações clínicas compatíveis com BIG. Estas amostras foram testadas para coronavírus aviário mediante uma *semi-nested* RT-PCR dirigida a região não-traduzida 3' (3'UTR) e as amostras positivas foram submetidas a RT-PCR do gene codificador da proteína RNA-polimerase RNA-dependente (*RdRp*) e duas RT-PCR, incluindo uma tipo multiplex dirigidas a proteína de espícula S do vírus da BIG, para genotipagem. . *Amplicons* ou fragmentos amplificados da 3'UTR (a partir de amostras de codorna) foram clonados e sequenciados. Outras duas RT-PCR foram utilizadas para detecção de metapneumovírus aviário (aMPV) e o vírus da doença de Newcastle (NDV). Coronavírus aviários foram encontrados em todos os tipos de amostras estudadas em galinhas e codornas criadas nas mesmas propriedades, sendo que aMPV subtipo B foi encontrado em galinhas e o NDV não foi encontrado em nenhuma amostras. Todos os coronavírus aviários encontrados, foram classificados como variantes pela multiplex RT-PCR, não sendo entretanto, obtidas sequências de DNA para o gene S. Com base em sequências de DNA para os genes codificadores da proteína *RdRp* e da região 3'UTR pode-se demonstrar que as codornas estudadas apresentaram o coronavírus aviário identificados como próximo àqueles relacionados à bronquite infecciosa das galinhas, havendo diversidade molecular filogeográfica para os vírus de codornas. Desta forma, sugere-se que as codornas

podem servir como reservatórios para coronavírus aviários onde haja criações em proximidade com outras espécies aviárias.

Palavras-chave: Coronavírus aviário. Ocorrência. Codornas. Galinhas. Reservatório.

ABSTRACT

TORRES, C. A. Coronavirus in quails: occurrence, molecular diversity and the role of quails as reservoir for avian infectious bronchitis virus [Coronavírus em codornas: ocorrência, diversidade molecular e estudo do papel epidemiológico das codornas como reservatório para a bronquite infecciosa das galinhas]. 2012. 76 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

This study aimed to investigate the occurrence and molecular diversity of avian coronavirus in quails and laying hens, raised on the same farms and determine the role of quails in the epidemiology of avian infectious bronchitis (IB). To this end, pools of lungs, trachea, female reproductive tracts, kidneys and enteric contents were collected from quails and laying hens flocks with IB-like symptoms, co-housed in farms located in Sao Paulo and Espírito Santo states, Brazil, during 2009-2010. Chickens and quails samples were screened for IBV with an RT-PCR to the 3'UTR and positive samples were submitted to RT-PCRs to the RNA-dependent RNA-polymerase gene (*RdRp*) and two different RT-PCRs to the spike gene, including a typing-multiplex one. *Amplicons* of 3'UTR (from quails samples) were cloned and sequenced. Two other RT-PCRs were used to detect the avian metapneumovirus (aMPV) and Newcastle disease virus (NDV). Avian coronavirus was found in all types of samples analyzed in chickens and quails raised on the same farms, aMPV subtype B was found in chickens and the NDV was not observed in any samples. All avian coronavirus found were classified as variants by multiplex RT-PCR, however, DNA sequences for gene S were not obtained. Based on the DNA sequences for genes encoding the protein *RdRp* and the 3'UTR region can be show that avian coronavirus in quails are closely related to avian infectious bronchitis virus, with a molecular phylogeographic diversity for quails viruses; thus, quails might act as reservoirs for avian coronaviruses when in close contact with other avian species.

Keywords: Avian coronavirus. Occurrence. Quails. Chickens. Reservoir.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Sinais clínicos observados nas granjas do estudo. A: codorna jovem apresentando lacrimejamento; B: galinha jovem apresentando descarga nasal, lacrimejamento e tosse, decorrente da dificuldade respiratória; C e D alteração em casca (fina e porosa), no formato e na pigmentação em ovos de codorna e galinhas, respectivamente (D), São Paulo 2009-2010..... 30
- Figura 2 - Distribuição das granjas estudadas no período de 2009-2010 no município de Bastos/SP. A figura menor à direita mostra a localização do município de Bastos no estado de São Paulo e na área maior estão indicadas as distâncias entre as granjas paulistas do estudo. As setas indicam a localização dos galpões das codornas e das galinhas nas granjas estudadas e os pontos são as coordenadas obtidas a partir do sistema de posicionamento global (Garmin GPSMAP® 60CS)..... 31
- Figura 3 - Representação esquemática das regiões amplificadas pela semi-*nested* RT-PCR para a região 3'UTR e pela RT-PCR para a ORF 1B do gene que codifica a RNA-polimerase RNA dependente..... 35
- Figura 4 - Representação esquemática da amplificação parcial pela semi-*nested* RT-PCR para a região codificadora da subunidade S1 da proteína S de IBV..... 37
- Figura 5 - Representação esquemática da região flanqueadora da inserção do *amplicon* de 179pb no vetor plasmidial pTZ57R/T..... 41
- Figura 6 - Gel de agarose 1.5% corado com brometo de etídeo 0,5µg/ML do produto (320pb) da PCR direcionada para a região flanqueadora da inserção do plasmídeo contendo o inserto de 179pb referente a 3'UTR..... 53
- Figura 7 - Árvore genealógica de distância com o algoritmo Neighbor-joining para nucleotídeos da região 3'UTR (nt 27342 ao 27520), mostrando os

sorotipos/genótipos clássicos (com o numero de acesso do Genbank) e as amostras incluídas no presente estudo (o quadro representa as amostras das codornas, o triangulo as das galinhas e o rombo amostras de aves silvestres brasileiras). 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 substituições de nucleotídeos por sítio..... 54

Figura 8 - Árvore genealógica de distância com o algoritmo Neighbor-joining para nucleotídeos da *RdRp* (nt 15647 ao 15801) mostrando os sorotipos/genótipos clássicos (com o numero de acesso do Genbank) e as amostras incluídas no presente estudo (o quadro representa as amostras das codornas, o triangulo as das galinhas e o rombo a amostra CRG proveniente de um plantel avícola e isolada no laboratório em ovos SPF). 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 substituições de nucleotídeos por sítio..... 55

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Frequência de <i>Gammacoronavirus</i> nas granjas (galinhas e codornas) estudadas durante o período de 2009-2010.....	46
Gráfico 2 - Ocorrência de <i>Gammacoronavirus</i> em codornas nos anos de 2009 e 2010 nas amostras estudadas dos municípios de Santa Maria de Jetibá/ES e Bastos/SP.....	47
Gráfico 3 - Ocorrência de <i>Gammacoronavirus</i> em galinhas poedeiras nos anos 2010 e nas amostras estudadas dos municípios de Santa Maria de Jetibá/ES e Bastos/SP.....	47
Gráfico 4 - Ocorrência de <i>Gammacoronavirus</i> em codornas e galinhas poedeiras no ano 2010 nas amostras estudadas dos municípios de Santa Maria de Jetibá/ES e Bastos/SP.....	48

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 -	Descrição da localização, número de aves/lote e idade das aves nas granjas estudadas durante o período de 2009–2010.....	29
Quadro 2 -	Resultados da genotipagem das amostras segundo o ano de coleta, estado (ES= Espírito Santo; SC= Santa Catarina; SP= São Paulo; PR= Paraná; MG= Minas Gerais), lote, espécie e tipo de amostra.....	50

LISTA DE TABELAS

Tabela 1-	Frequência de <i>Gammacoronavirus</i> nas granjas (galinhas e codornas) estudadas durante o período de 2009-2010.....	46
Tabela 2 -	Identidade média (em porcentagem) de nucleotídeos da região 3'UTR (nt 27342 ao 27520 em relação à amostra Beaudette de IBV e RdRp (nt 15647 ao 15801 em relação à amostra Tor2 do SARS-CoV) para os grupamentos de amostras estudadas no presente estudo (codornas e galinhas) e o sorotipos Massachusetts (H120 e Ma5). ND = Dados não disponíveis.....	56

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BLAST/n	Basic Local Alignment Search Tool
cDNA	DNA complementar
DEPC	dietil-pirocarbonato
dNTP	deoxinucleosídeo-trifosfato
DNA	ácido desoxirribonucleico
DTT	Dithiothreitol
et al.	e colaboradores
EUA	Estados Unidos da América
<i>g</i>	aceleração da gravidade terrestre (9,8 m/s ²)
g	Gramas
kb	Quilobase
kDa	Quilo Dalton
M	Molar
Min	minuto de hora
mM	Milimolar
M-MLV	Moloney Murine Laeukemia Vírus
ng	Nanogramas
mL	Mililitro
µg	Micrograma
µL	Microlitro
ORF	open reading frame
pb	pares de bases
PCR	reação em cadeia pela polimerase
pmol	Picomoles
q.s.p	Quantidade suficiente para
RNA	ácido ribonucleico
RT	transcrição reversa
S	Espícula
U	unidade internacional

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcento
°C	graus Celsius
+	Positivo
-	Negativo

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	21
2	OBJETIVOS	27
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	28
3.1	GRANJAS.....	28
3.2	AMOSTRAS	30
3.3	CONTROLES POSITIVOS E NEGATIVOS.....	32
3.4	EXTRAÇÃO DE RNA	32
3.5	REAÇÃO DE TRANSCRIÇÃO-REVERSA (RT)	32
3.6	DETECÇÃO DE CORONAVÍRUS AVIÁRIO MEDIANTE A REAÇÃO EM CADEIA PELA POLIMERASE SEMI-NESTED (SEMI-NESTED RT- PCR) DIRIGIDA A REGIÃO 3'UTR.....	33
3.7	AMPLIFICAÇÃO DE SEGMENTOS PARCIAIS DO GENE CODIFICADOR DA RNA-POLIMERASE RNA DEPENDENTE MEDIANTE UMA REAÇÃO EM CADEIA PELA POLIMERASE (PCR)	34
3.8	REAÇÃO DE TRANSCRIÇÃO-REVERSA SEGUIDA DE REAÇÃO EM CADEIA PELA POLIMERASE MULTIPLEX NESTED (MULTIPLEX NESTED RT-PCR) PARA GENOTIPAGEM DAS AMOSTRAS POSITIVAS PARA O CORONAVÍRUS AVIÁRIO.....	35
3.9	SEMI NESTED RT-PCR PARA AMPLIFICAÇÃO PARCIAL DA REGIÃO CODIFICADORA DA SUBUNIDADE S1 DA PROTEÍNA S DE IBV	36
3.10	DETECÇÃO DE METAPNEUMOVIRUS AVIÁRIO MEDIANTE A REAÇÃO EM CADEIA PELA POLIMERASE SEMI-NESTED (SEMI-NESTED RT- PCR).....	38
3.11	DETECÇÃO DO VÍRUS DA DOENÇA DE NEWCASTLE MEDIANTE A REAÇÃO EM CADEIA PELA POLIMERASE (RT- PCR)	39
3.12	CLONAGEM DO PRODUTO DA PCR DAS AMOSTRAS POSITIVAS DE CORDORNAS PARA 3'UTR	39

3.12.1 Purificação dos <i>amplicons</i> a partir do gel de agarose.....	40
3.12.2 Inserção no plasmídeo, transformação bacteriana e extração plasmidial...	40
3.13 SEQÜENCIAMENTO DE DNA.....	41
3.14 EDIÇÃO DE SEQUENCIAS DE DNA.....	42
3.15 ANÁLISE FILOGENÉTICA.....	43
3.16 FORMA DE ANÁLISE DOS RESULTADOS	43
4 RESULTADOS	45
4.1 DETECÇÃO DE CORONAVÍRUS AVIÁRIOS MEDIANTE A REAÇÃO EM CADEIA PELA POLIMERASE SEMI-NESTED (SEMI-NESTED RT- PCR) DIRIGIDA A REGIÃO 3'UTR.....	45
4.2 AMPLIFICAÇÃO DE SEGMENTOS PARCIAIS DO GENE CODIFICADOR DA RNA- POLIMERASE RNA DEPENDENTE MEDIANTE UMA REAÇÃO EM CADEIA PELA POLIMERASE (PCR)	48
4.3 REAÇÃO DE TRANSCRIÇÃO-REVERSA SEGUIDA DE REAÇÃO EM CADEIA PELA POLIMERASE MULTIPLEX NESTED (MULTIPLEX NESTED RT-PCR) PARA GENOTIPAGEM DAS AMOSTRAS POSITIVAS PARA O CORONAVÍRUS AVIÁRIO.....	49
4.4 SEMI NESTED RT-PCR PARA AMPLIFICAÇÃO PARCIAL DA REGIÃO CODIFICADORA DA SUBUNIDADE S1 DA PROTEÍNA S DE IBV	51
4.5 DETECÇÃO DE METAPNEUMOVIRUS AVIÁRIO E VÍRUS DA DOENÇA DE NEWCASTLE MEDIANTE A REAÇÃO EM CADEIA PELA POLIMERASE SEMI- NESTED (SEMI-NESTED RT- PCR)	52
4.6 CLONAGEM DO PRODUTO DA PCR DAS AMOSTRAS POSITIVAS DE CORDORNAS PARA 3'UTR	52
4.7 SEQÜENCIAMENTO DE DNA.....	53
4.8 ANÁLISE FILOGENÉTICA.....	53
5 DISCUSSÃO.....	57
6 CONCLUSÕES	67
REFERÊNCIAS.....	68

1 INTRODUÇÃO

As codornas japonesas (*Coturnix coturnix*) são originárias do norte da África, da Europa e da Ásia, pertencendo à família *Phasianidae* e à sub-família *Perdicionidae*, sendo, portanto, da mesma família das galinhas e perdizes (PINTO et al., 2002).

São produzidas principalmente para carne na Europa e América, e para ovos na Ásia e no Brasil (MINVIELLE, 2004), onde a criação foi introduzida no início da década de 50, destacando-se no mercado agropecuário brasileiro pela excelente atividade produtiva, por requerer baixos custos com investimento inicial e mão-de-obra, utilizando pequenas áreas e proporcionando rápido retorno financeiro (PINTO et al., 2002; MINVIELLE, 2004).

De acordo com o levantamento sobre a Produção da Pecuária Municipal do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) (2010) a produção de ovos de codorna foi de 232 milhões de dúzias, sendo São Paulo (SP) o principal estado produtor e Espírito Santo (ES) o segundo. Os municípios de Bastos (SP) e Santa Maria de Jetibá (ES) são uns dos mais importantes, sendo que o primeiro mantém 59,3% do total nacional da produção nacional.

O estado de São Paulo é também o maior produtor nacional de ovos de galinha, respondendo com uma participação de 28.7% (633 milhões de dúzias no segundo trimestre de 2011) (IBGE, 2011).

Esses dados evidenciam a importância do Brasil na indústria avícola, mas são poucas as informações e pesquisas sobre a epidemiologia das doenças que afetam as codornas (LIMA et al., 2004). O diagnóstico presuntivo das doenças que acometem estas aves é realizado com a finalidade de solucionar o quadro clínico, mas não há estudos etiológicos (OLIVEIRA, 2004). Adicionalmente, há falhas na biossegurança, como a proximidade entre galpões de galinhas e codornas, muitas vezes de idades e procedências múltiplas, permitindo a transmissão de patógenos (OLIVEIRA et al., 2007).

Dentre os vírus de elevada importância para a exploração avícola, tanto em função das perdas econômicas, quanto pela possibilidade de transmissão entre as espécies de aves, destacam-se o coronavírus aviário, o vírus da doença de Newcastle e o metapneumovírus aviário (COOK; CAVANAGH, 2002; CAVANAGH, 2007; MILLER, DECANINI; AFONSO, 2010)

Os coronavírus, nome proveniente da palavra coroa (do latim *corona*) sugerido em 1968 devido à morfologia observada no microscópio eletrônico, (WEISS; NAVAS-MARTIN, 2005), são classificados na ordem *Nidovirales*, família *Coronaviridae*, subfamília *Coronavirinae*, subdividida nos gêneros *Alphacoronavirus*, *Betacoronavirus* e *Gammacoronavirus* (ICTV, 2009).

Nos gêneros *Alphacoronavirus* e *Betacoronavirus* encontram-se os coronavírus dos mamíferos, enquanto o *Gammacoronavirus* contem as espécies Beluga wale coronavirus (BWCoV) e Coronavírus aviário (avian coronavirus), esta última incluindo o Vírus da Bronquite Infecciosa das Galinhas (IBV, Infectious Bronchitis Virus) e o Coronavírus dos Perus (TCoV), tendo sido descritos também coronavírus em faisões (PhCoV), patos (DCoV) e pombos (PCoV) (CAVANAGH, 2005; MCKINLEY; HILT; JACKWOOD, 2008). No presente trabalho, os termos Coronavírus aviário (no singular) e coronavírus aviários (no plural) serão utilizados indistintamente quando não se fizer referência específica ao IBV ou a outro tipo de Coronavírus aviário.

Doenças causadas por coronavírus já foram descritas há mais de 70 anos, mas esta família de vírus permaneceu relativamente obscura por décadas. No entanto, em 2003, quando se tornou claro que um novo coronavírus humano foi responsável por uma grave síndrome respiratória aguda (SARS), o coronavírus se tornou muito mais conhecido. A origem da SARS levanta questões interessantes sobre a evolução e a especificidade dos coronavírus pelas espécies (WEISS; NAVAS-MARTIN, 2005).

Os coronavírus são vírus envelopados, esféricos ou elípticos, moderadamente pleomórficos, com diâmetro entre 100-150 nm, compostos por 5-6 proteínas estruturais (N, M, S, HE, S e I) dependendo da espécie viral (BRYAN, 2009).

O envelope é composto por uma camada dupla de lipídeos, na qual estão localizadas três proteínas, no caso do Coronavírus aviário: a glicoproteína de espícula (S), a proteína de membrana (M) e a pequena proteína de membrana ou proteína de envelope (E) (LAI; CAVANAGH, 1997; CHU et al., 2006). Além disso, encontra-se a proteína de nucleocapsídeo (N) associada com o genoma viral (CAVANAGH, 2007).

A proteína N é multifuncional, facilita a síntese de RNA, mas também possui um papel importante na imunidade mediada por células, na formação de partículas virais e provavelmente facilita o transporte do genoma viral desde o sítio de síntese até o local de formação das partículas virais (VERHEIJE et al., 2010).

A proteína S é uma glicoproteína do tipo I que forma os peplômeros das partículas virais (WEISS; NAVAS-MARTIN, 2005), oligomeriza-se na membrana do retículo endoplasmático e insere-se no viron através de interações não covalentes com as proteínas da membrana (GODEKE et al., 2000). Tem um peso molecular de 180 kDa e é clivada nas subunidades S1 e S2 (CAVANAGH, 2007). S1 é a responsável pela ligação aos receptores celulares (CASAIS et al., 2003), tropismo celular, especificidade pela espécie hospedeira, patogenicidade, indução de anticorpos neutralizantes e resposta imune celular e emergência de tipos variantes em no caso do coronavírus aviário (CASAIS et al., 2003; MCKINLEY; HILT; JACKWOOD, 2008; MONTASSIER et al., 2010); enquanto que S2 tem capacidade de fusão das membranas virais e celulares para a liberação do genoma no citoplasma (sítio de replicação do RNA) e formação de sincícios, sendo assim responsável pelo efeito citopático (CAVANAGH, 2005).

A glicoproteína de membrana M (de aproximadamente 230 aa) tem um papel importante na formação do envelope e do core do vírion, enquanto que a pequena proteína de envelope (E), composta de 84 a 109 aa, é necessária para a montagem das partículas virais (CAVANAGH, 2007).

A mais conservada proteína não estrutural dos coronavírus é a RNA polimerase RNA-dependente (*RdRp*) (ESCUTENAIRE et al., 2007), produto da janela aberta de leitura (ORF) 1b, sendo responsável pela transcrição e pela replicação do genoma viral, fazendo parte do complexo replicase, que é responsável, ainda, pelo processo

descontínuo de transcrição que leva a geração de um conjunto de mRNAs co-terminais subgenômicos. (STEPHENSEN; CASEBOLT; GANGOPADHYAY, 1999; SAWICKI; SAWICKI; SIDDELL, 2007).

O RNA genômico dos coronavírus aviários tem um tamanho de 27kb, sendo de fita simples de sentido positivo (LAI; CAVANAGH, 1997; CAVANAGH, 2005). O número de genes varia entre os coronavírus, em coronavírus aviários o RNA genômico inclui os genes 3 e 5 que codificam as pequenas proteínas acessórias não estruturais 3a, 3b e 3c e 5a e 5b e podem ter um papel importante na patogênese (CASAIS et al., 2005). Nas terminações 5' e 3' do genoma, estão localizadas regiões não-traduzidas (*untranslated regions*, UTRs) que atuam nos processo de replicação genômica e transcrição de mRNA (MASTERS, 2006).

As infecções por Coronavírus aviário não estão necessariamente associadas a sinais clínicos, visto que estes vírus foram também detectados no intestino de aves assintomáticas, incluindo pavões, marrecos (LIU et al., 2005), pombos selvagens (FELIPPE et al., 2010), gansos e pato-real, (JONASSEN et al., 2005) e diversas espécies de aves silvestres em cativeiro (CARDOSO et al., 2011).

Quanto ao IBV, patógeno epiteliotrópico de aves domésticas altamente contagioso em galinhas de todas as idades (MCKINLEY; HILT; JACKWOOD, 2008), a importância reside em perdas econômicas pelo retardo do crescimento, infertilidade, falsas poedeiras, declínio na produção de ovos, ovos com alterações internas e na casca, diarreia, aumento da susceptibilidade às infecções secundárias e moderada a grave mortalidade (CAVANAGH, 2001; CAVANAGH, 2003; SAIF, 2004; MENDONÇA PITANGUI et al., 2009; VILLAREAL, 2010a).

O vírus da doença de Newcastle (NDV) e o metapneumovírus aviário (aMPV) podem interagir sinergicamente com o IBV, aumentando a gravidade e a duração da doença (MATTHIJS et al., 2009). O NDV, classificado no gênero *Avulavirus*, família *Paramyxoviridae*, possui RNA de fita simples, não segmentado, com genoma de 15 kb (NAGAI; KLENK; ROTT, 1976; ALEXANDER; SENNE, 2008), sendo a proteína de fusão um marcador de virulência (ALDOUS; ALEXANDER, 2001; DE LEEUW et al.,

2005; OIE, 2011). As infecções com vírus virulento causam três formas clínicas bem definidas: (1) velogênica viscerotrópica, (2) velogênica neurotrópica e (3) mesogênica. O NDV pode se apresentar ainda como um vírus de baixa virulência (lentogênico), também classificado como entérico, de infecção assintomática sem sinais respiratórios (ALDOUS; ALEXANDER, 2001; MILLER; DECANINI; AFONSO, 2010).

O Metapneumovírus aviário, também denominado vírus da rinotraqueíte dos perus (TRT), pertence ao gênero *Metapneumovirus*, família *Paramyxoviridae*, subfamília *Pneumovirinae* e contém um RNA não-segmentado, de sentido negativo e um genoma de aproximadamente 13 kb, que codifica oito proteínas (YU et al., 1992; EASTON; DOMACHOWSKIE; ROSENBERG, 2004). Causa infecção do trato respiratório superior em perus e em outras espécies aviárias (COOK; CAVANAGH, 2002), sendo associado à síndrome da cabeça inchada (SHS) em frangos e matrizes pesadas. Tanto em perus quanto em galinhas, foi descrita uma queda transitória na produção de ovos e/ou um aumento em anormalidades nos mesmos após infecção pelo aMPV (JONES, 1996; COOK et al., 2000).

Quatro subtipos (A, B, C e D) foram reconhecidos com base nas diferenças das sequências do gene que codifica a glicoproteína G (responsável pela ligação do vírus ao receptor celular) e em propriedades sorológicas (BAYON-AUBOYER et al., 2000; COOK; CAVANAGH, 2002), sendo que no Brasil já foram descritos os subtipos A e B em galinhas, perus e aves silvestres e sinatrópicas (D'ARCE et al., 2005; CHACÓN et al., 2007; CHACÓN et al., 2011a; FELIPPE et al., 2011).

No Brasil, a bronquite infecciosa é controlada principalmente mediante o uso de vacinas vivas atenuadas ou inativadas do sorotipo Massachusetts; entretanto surtos de IBV continuam ocorrendo em lotes vacinados (DI FABIO et al., 2000), causados por linhagens de IBV divergentes das linhagens vacinais (ABREU et al., 2006; VILLARREAL et al., 2007a,b; MONTASSIER et al., 2008; MONTASSIER, 2010; FELIPPE et al., 2010; VILLARREAL, et al. 2010b; CHACÓN et al., 2011b), permitindo que uma das maiores populações de galinhas no mundo fique vulnerável (BRANDÃO, 2010).

O primeiro relato de coronavírus em codornas ocorreu em 2000 a partir de uma amostra isolada, proveniente do Estado de Rondonia/ Brasil de uma granja de codornas adultas sem histórico de doença e vacinação contra IBV (DI FABIO et al., 2000), para qual se demonstrou baixa identidade antigênica com os sorotipos de IBV Massachusetts, Connecticut, e D207.

Em estudos de transmissão do coronavírus da SARS a diversas aves, incluído codornas, demonstrou-se que este coronavírus não se transmitia para estas espécies (SWAYNE et al., 2004; WEINGARTL et al., 2004), evidenciando a ausência de susceptibilidade das aves a este vírus específico.

Em 2005, uma síndrome entérica foi observada em codornas criadas em uma fazenda no sul da Itália, sendo um coronavírus detectado no conteúdo intestinal destes animais, denominado de Quail coronavirus (QCoV). Com o estudo de fragmentos genômicos do gene codificador da RNA-polimerase RNA dependente, observou-se uma identidade de 16-18% com o IBV, sugerindo que especificamente este QCoV não é uma variante do IBV. Em contraste, a sequência de aminoácidos da porção S1 do QCoV teve 79-81% de identidade com as amostras de TCoV, o que pode significar que o QCoV seja um coronavírus similar ao dos perus (CIRCELLA et al., 2007).

Assim sendo, em relação ao coronavírus que infectam codornas, há ainda pouca clareza sobre sua caracterização e diversidade moleculares, bem como sobre o papel deste hospedeiro na epidemiologia das coronaviroses aviárias. Este conhecimento não é apenas essencial para se entenderem as relações genealógicas entre as diferentes espécies de coronavírus de aves, mas também para que se possam ter inferências sobre proximidade antigênica entre as mesmas e sobre sua transmissão a outras espécies de aves, para o desenvolvimento de medidas de profilaxia e controle adequadas.

A hipótese testada no presente estudo é a de que as codornas são susceptíveis à infecção por Coronavírus aviário e que podem servir com reservatórios para a bronquite infecciosa em galinhas.

2 OBJETIVOS

Este estudo teve por objetivos:

- Pesquisar a ocorrência de coronavírus aviários em codornas e galinhas provenientes de granjas com relatos de manifestações clínicas compatíveis com bronquite infecciosa das galinhas a partir de amostras de órgãos e de conteúdo entérico.
- Estudar a diversidade molecular dos coronavírus encontrados com base em sequências de DNA para os genes codificadores das proteínas RNA-polimerase RNA-dependente e de espícula e da região não-traduzida 3'.
- Determinar o papel epidemiológico das codornas como reservatório de IBV para galinhas.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 GRANJAS

As aves do estudo eram procedentes de granjas de codornas e galinhas poedeiras criadas em mesmas propriedades. As granjas estavam localizadas no Estado de São Paulo e Espírito Santo, nos municípios de Bastos e Santa Maria de Jetibá, respectivamente (Quadro 1). Nestas granjas, havia histórico de galinhas e codornas com sinais respiratórios, dentre eles: descargas nasais, lacrimejamento, conjuntivite, tosse e sinais reprodutivos como queda na produção de ovos, alteração de casca (fina e porosa) ou alteração no formato dos ovos e falsas poedeiras (Figura 1).

Em todas as granjas estudadas, o esquema de vacinação das galinhas compreendia a primo vacinação de IBV com o sorotipo Massachusetts atenuado e reforços de vacina inativada com o mesmo sorotipo; vacinação com o subtipo A e B de aMPV e a vacina lentogênica de VDN.

Quanto às codornas, não era aplicado nenhum esquema de vacinação contra IBV e aMPV; no entanto as aves eram vacinadas com a vacina lentogênica de VDN.

Quadro 1 - Descrição da localização, número de aves/lote e idade das aves nas granjas estudadas durante o período de 2009 – 2010

Ano	Estado	Município	Granja	Lote	Idade (meses)	Espécie	Aves por lote	Total de aves
2009	São Paulo	Bastos	1	R1	2	Codorna	2.000	50.000
				R2	6		12.000	
				R3	9		12.000	
				R4A	11		12.000	
				R4B	13		12.000	
	Espírito Santo	Santa Maria de Jetibá	2	1A	8.5	Codorna	37.798	181.000
				1B	3		52.462	
				2	6.5		90.761	
2010	Espírito Santo	Santa Maria de Jetibá	3	1	11	Codorna	37.798	181.000
				2	6		52.462	
				3	9		90.761	
				30	10	Galinhas	100.000	600.000
				31	21		100.000	
				32	7		100.000	
	São Paulo	Bastos	4	4	2	Codorna	6.660	40.000
				5	13		6.660	
				6	9		6.660	
				12	25	Galinhas	16.667	50.0000
				13	20		16.667	
				14	10		16,667	
				15	12		25.000	
				16	18		25.000	50.0000
			5	7	8	Codorna	5.820	5.820
				20	15	Galinhas	3.898	3.898
			6	8	6	Codorna	5.550	50.000
				9	10		5.550	
				10	3		5.550	
				17	14	Galinhas	12,500	100.000
				18	2.3		12.500	100.000
				19	15		12,500	100.000

Figura 1 - Sinais clínicos observados nas granjas do estudo. A: codorna jovem apresentando lacrimejamento; B: galinha jovem apresentando descarga nasal, lacrimejamento e tosse, decorrente da dificuldade respiratória; C e D alteração em casca (fina e porosa), no formato e na pigmentação em ovos de codorna e galinhas, respectivamente (D), São Paulo 2009- 2010

3.2 AMOSTRAS

Em cada granja foram coletadas cinco aves por galpão, numero suficiente para obter uma detecção de IBV bem sucedida (DE WIT, 2000). Na granja um (1) em 2009 foram amostrados cinco lotes de codornas, totalizando 25 aves. Em 2010 foram amostradas três granjas (uma delas coletada em 2009), totalizando sete lotes de codornas (35 aves ao total) e nove lotes de galinhas poedeiras (45 aves em total) (Figura 2). Foram coletadas aves (codornas e galinhas) com e sem sinais clínicos.

Também em 2009, na granja dois (2) foram amostradas cinco aves por lote em três galpões de codornas e em 2010 três lotes de codornas e três de galinhas poedeiras, totalizando 15 codornas e 15 galinhas amostradas em cada ano.

Figura 2 - Distribuição das granjas estudadas no período de 2009-2010 no município de Bastos/SP. A figura menor à direita mostra a localização do município de Bastos no estado de São Paulo e na área maior estão indicadas as distâncias entre as granjas paulistas do estudo. As setas indicam a localização dos galpões das codornas e das galinhas nas granjas estudadas e os pontos são as coordenadas obtidas a partir do sistema de posicionamento global (Garmin GPSMAP® 60CS)

Foi incluído no estudo um total de 90 amostras de codornas e 48 amostras de galinhas colhidas na forma de *pools* de órgãos de aparelho reprodutivo, pulmões, rins e traqueia de codornas e galinhas, e *pools* de amostras de conteúdo entérico de codornas, mantidas e transportadas sob refrigeração (4°C) para o Laboratório de Biologia Molecular Aplicada e Sorologia (LABMAS) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (FMVZ/USP), onde foram armazenadas a -20°C até o momento do seu processamento.

3.3 CONTROLES POSITIVOS E NEGATIVOS

Como controle positivo das reações foi utilizada a amostra vacinal MA5 (sorotipo Massachusetts) de Bronquite infecciosa, amostra vacinal NOBILIS® RTV 8544 de metapneuvírus aviário e vírus da doença de Newcastle lentogênica (NOBILIS® ND LA SOTAL). Como controle negativo, utilizou-se água ultra-pura tratada com 0,1% de dietil-pirocarbonato (DEPC).

3.4 EXTRAÇÃO DE RNA

Cada *pool* de órgãos foi macerado com o uso placas de Petri esterilizadas descartáveis e tesouras e pinças esterilizadas, mantendo-se as amostras em gelo.

As amostras, suspendidas a 50% (volume/volume) em água DEPC, foram congeladas (-80°C por 15 min) e descongeladas (57°C por 15 min) por três ciclos, centrifugadas a 5.000 g a 4°C por 15 min. O sobrenadante resultante da centrifugação das amostras, bem como dos controles positivos e negativos foram utilizados para extração de RNA total com Trizol Reagent™ (Life Technologies Brasil), seguindo as instruções do fabricante.

3.5 REAÇÃO DE TRANSCRIÇÃO-REVERSA (RT)

Para a síntese do DNA complementar (cDNA) foram desnaturados 3,5µL do RNA, obtido conforme o item 3.4, a 95 °C durante 5 minutos e adicionados ao mix de transcrição reversa contendo 1 x *First Strand Buffer*™ (Life Technologies Brasil), 1mM de cada dNTP, 10mM DTT, 2,5ng de *Random primers*™ (Life Technologies Brasil), 100U de M-MLV *Reverse Transcriptase* (Life Technologies Brasil™) e 0,5µL de água

DEPC para um volume final de 10µL. Em seguida a transcrição reversa foi realizada utilizando um ciclo de 42°C/60 minutos e 72°C/10 minutos.

3.6 DETECÇÃO DE CORONAVÍRUS AVIÁRIO MEDIANTE A REACÇÃO EM CADEIA PELA POLIMERASE SEMI-NESTED (SEMI-NESTED RT- PCR) DIRIGIDA À REGIÃO 3'UTR

Utilizou-se a reacção de *semi-nested* RT-PCR dirigida para a região 3'UTR do genoma dos *Gammacoronavirus*, de acordo com o protocolo proposto por Cavanagh et al. (2002).

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

Para a primeira amplificação, 2.5µL de cada cDNA foram adicionados ao mix de PCR contendo 1 x PCR BufferTM (Life Technologies Brasil), 0,2mM de cada dNTP, 0,5 µM de cada primer (UTR41+ e UTR11-), 1,5mM MgCl₂, 12,625µL água DEPC e 0,625U de Platinum Taq DNA polimeraseTM (Life Technologies Brasil) para uma reacção final de 25µL e submetidos a 35 ciclos a 94°C/1 minuto, 48°C/1,5 minutos e 72°C/2 minutos, seguidos por 72°C/10 minutos para extensão final.

A seguir, 5µL de cada DNA amplificado foram adicionados ao mix de *nested* (segunda amplificação) contendo 1 x PCR BufferTM (Life Technologies Brasil), 0,2mM de cada dNTP, 0,5µM de cada primer (UTR31- e UTR41+), 1,5mM MgCl₂, 20,25µL água DEPC e 1,25U de Platinum Taq DNA polimeraseTM (Life Technologies Brasil) para uma reacção final de 50µL e submetidos a 35 ciclos a 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 cinco amostras para se avaliar possíveis contaminações pela manipulação do DNA amplificado.

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

3.7 AMPLIFICAÇÃO DE SEGMENTOS PARCIAIS DO GENE CODIFICADOR DA RNA-POLIMERASE RNA DEPENDENTE MEDIANTE UMA REAÇÃO EM CADEIA PELA POLIMERASE (PCR)

Nas amostras positivas para região 3'UTR foi aplicada uma RT-PCR dirigida a ORF 1B contendo o gene codificador da RNA-polimerase RNA dependente (*RdRp*), de acordo com o proposto por Escutenaire et al. (2007), sendo altamente conservado para a subfamília *Coronavirinae*.

O par de *primers* 11-FW 5' TGATGATGSNGTTGTNTGYTAYAA 3' (senso) e 13-RV 5'GCATWGTRTGYTGNGARCARAATTC 3' (anti-senso), permitem a amplificação de um fragmento 179 pb da ORF 1B do gene codificador da RNA-Polimerase RNA dependente (nt 15647 ao 15801 em relação à amostra Tor2 do SARS-CoV (número de acesso no GenBank AY274119) (Figura 3).

Para a amplificação, 5µL de cada cDNA foram adicionados ao mix de PCR contendo 1 x PCR Buffer (Life Technologies Brasil), 0,2mM de cada dNTP, 0,5µM de cada *primer* (11FW+ e 13RV-), 1,5mM MgCl₂, 20,25µL água DEPC e 1.25U de Platinum Taq DNA polimerase (Life Technologies BrasilTM) para uma reação final de 50µL, e submetidos a 94°C/5 minutos, 94°C/1 min, 40°C/1 min e 72°C/1 min, seguidos por 30 ciclos de 94°C/1 min, 50°C/1 min e 72°C/1 min, seguidos por 72°C/10 minutos para extensão final.

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

Figura 3 - Representação esquemática das regiões amplificadas pela semi-*nested* RT-PCR para a região 3' UTR e pela RT-PCR para a ORF 1B do gene que codifica a RNA-polimerase RNA dependente

3.8 REAÇÃO DE TRANSCRIÇÃO-REVERSA SEGUIDA DE REAÇÃO EM CADEIA PELA POLIMERASE MULTIPLEX NESTED (MULTIPLEX NESTED RT-PCR) PARA GENOTIPAGEM DAS AMOSTRAS POSITIVAS PARA O CORONAVÍRUS AVIÁRIO

Para determinar se as amostras positivas para coronavírus aviário na triagem, utilizando a semi- *nested* RT-PCR (item 3.6) pertencem ou não a alguns sorotipos vacinais, as mesmas foram submetidas a uma multiplex *nested* RT-PCR descrita por Capua et al. (1999) para a amplificação de segmentos da região codificadora da subunidade S1 da proteína S dos sorotipos Massachusetts, D274 e 4/91 ou 793.

O par de *primers* externos (IBVS 5' YACTGGYAATTTTTCAGATGG 3' e IBVAS 5' CWCTATAAACACCYTTRCA 3') produz um fragmento de 464pb (nt 729 ao 1193 do gene S1 em relação à amostra de IBV Beaudette), utilizado a seguir em uma multiplex *nested* PCR com o primer IBVNA (5' CAGATTGCTTRCAACCACC 3'), desenhado para hibridizar em todos os três soro/genótipos, e os *primers* soro/genótipo-específicos: 793S (5' AGTAGTTTTGTGTATAAAYCA 3'), D274S (5' ATACAATTATATCAAACCAGC 3') e H120S (5' AATACTACTTTTACGTTACAC 3'), gerando fragmentos de 153 pb (nt 958 a 1111), 217 pb (nt 895 a 1111) e 295 pb (nt 817 a 1111) respectivamente.

A seguir 2,5µL de cada cDNA (transcrição reversa) foram adicionados ao mix de PCR contendo 1 x PCR Buffer™ (Life Technologies Brasil), 0,2mM de cada dNTP, 0,5

μM de cada primer (IBVS+ e IBVAS-), 1,5mM MgCl_2 , 12,625 μL água DEPC e 0,625U de Platinum Taq DNA polimerase™ (Life Technologies Brasil) para uma reação final de 25 μL e submetidos a 35 ciclos a 94°C/1 minuto, 48°C/1,5 minutos e 72°C/2 minutos, seguidos por 72°C/10 minutos para extensão final.

Para a segunda amplificação, 2,5 μL do produto da primeira amplificação foram utilizados no mix de *nested*, com 1 x PCR Buffer™ (Life Technologies Brasil), 0,2mM de cada dNTP, 0,5 μM de cada primer (IBVNA, 793S, D274S e H120S), 1,5mM MgCl_2 , 10,125 μL água DEPC e 0,625U de Platinum Taq DNA polimerase™ (Life Technologies Brasil) para uma reação final de 25 μL e submetidos a 35 ciclos a 94°C/1 minuto, 48°C/1,5 minutos e 72°C/2 minutos, seguidos por 72°C/ 10 minutos para extensão final. Um tubo contendo água DEPC foi adicionado a cada cinco amostras na reação de multiplex *nested* para o monitoramento de possíveis contaminações na manipulação do DNA amplificado.

A determinação do sorotipo/genótipo presente na amostra em estudo foi realizada pelo tamanho do fragmento obtido, pela eletroforese em gel de agarose a 1.5%, corados com brometo de etídeo a 0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e observados sob luz ultravioleta.

O *amplicon* de 153pb foi atribuído ao sorotipo 4/91, o de 217pb ao sorotipo D274 e o de 295pb ao sorotipo Massachusetts. Com a ausência de *amplicons* observada em gel de agarose submetido à eletroforese, a amostra foi considerada Variante.

3.9 SEMI 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 *Gammacoronavirus* após a análise de sequências de 3'UTR conforme o item 3.13 foram submetidas à tentativa de caracterização por seqüenciamento de DNA a partir de um segmento de 390pb (nt 705 a 1094 em relação à amostra UK/793 do IBV número de acesso GenBank Z83979) da região codificadora da subunidade S1 da proteína S de IBV, com os *primers* descritos por Worthington; Currie; Jones (2008), sendo o par de *primers* externos SX1S (5' CACCTAGAGGTTTGYTWGCAT 3') e SX2A (5'

TCCACCTCTATAAACACCYTT 3') que produz um fragmento de 494 pb (nt 677 a 1170 do genoma do IBV) e o par de *primers* internos SX3S (5' TAATACTGGYAATTTTTCAGA 3') e SX4A (5' AATACAGATTGCTTACAACCACC 3') (Figura 4).

A seguir, 2.5µL de cada cDNA foram adicionados ao mix de PCR [1 x PCR Buffer™ (Life Technologies Brasil), 0,2mM de cada dNTP, 0,5µM de cada primer (SX1+ e SX2-), 1,5mM MgCl₂, 12,625µL água DEPC e 0,625U de Platinum Taq DNA polimerase™ (Life Technologies Brasil) para uma reação final de 25µL e submetidos a 35 ciclos a 94°C/1 minuto, 48°C/1,5 minutos e 72°C/2 minutos, seguidos por 72°C/10 minutos para extensão final.

Para segunda amplificação, 5µL do produto da PCR foram adicionados ao mix de *nested* PCR com 1 x PCR Buffer™ (Life Technologies Brasil), 0,2mM de cada dNTP, 0,5µM de cada primer (SX3+ e SX4-) 20,25 µL água DEPC e 1,25U de Platinum Taq DNA polymerase (Life Technologies Brasil™) para uma reação final de 50µL e submetidos a 35 ciclos a 94°C/1minuto, 48°C/1,5minutos e 72°C/2minutos, seguidos por 72°C/10 minutos para extensão final. Para se avaliarem possíveis contaminações pela manipulação do DNA amplificado nesta etapa, foram adicionados tubos com água ultra-pura a cada cinco amostras.

As amostras que resultassem na banda correspondente de 390pb em gel de agarose a 1,5% submetido a eletroforese e corado com brometo de etídeo 0,5µg/mL seriam consideradas positivas.

Figura 4 - Representação esquemática da amplificação parcial pela semi-*nested* RT-PCR para a região codificadora da subunidade S1 da proteína S de IBV

3.10 DETECÇÃO DE METAPNEUMOVIRUS AVIÁRIO MEDIANTE A REACÇÃO EM CADEIA PELA POLIMERASE SEMI-NESTED (SEMI-NESTED RT- PCR)

Para investigar a presença de metapneumovírus aviário, utilizou-se uma *semi-nested* RT- PCR dirigida aos subtipos A e B do gene codificador da proteína G, descrita por Cavanagh et al. (1999).

O par de *primers* da primeira amplificação, G1 5' GGGACAAGTATCT/CC/AT/GAT 3' (senso) com três bases degeneradas, correspondente ao começo do gene (nt 1 ao 17) e o G6 5' CTGACAAATTGGTCCTGATT 3' (anti-senso) (nt 422 ao 441), são capazes de se hibridizar com o RNA dos dois subtipos. O produto de 444pb foi utilizado na *nested* com os primer G5 5' CAAAGAA/GCCAATAAGCCCA 3' (anti-senso) (nt 401 ao 419), capaz de hibridizar com o RNA dos dois subtipos e os *primers* G8 5' CACTCACTGTTAGCGTCATA 3' (senso) (nt 152 ao 171) e G9 5' TAGTCCTCAAGCAAGTCCTC 3' (senso) (nt 68 ao 87) específicos para os subtipos A e B respetivamente.

A seguir, 2.5µL de cada DNA amplificado foram adicionados ao mix de *nested* (segunda amplificação) contendo 1 x PCR BufferTM (Life Technologies Brasil), 0,2mM de cada dNTP, 0,5 µM de cada primer (G5-, G8+A e G9+B), 1,5mM MgCl₂, 12,625µL água DEPC e 1,25U de Platinum Taq DNA polimeraseTM (Life Technologies Brasil) para uma reacção final de 25µL e submetidos a 35 ciclos a 94°C/1minuto, 48°C/1,5minutos e 72°C/2minutos, seguidos por 72°C/10 minutos para extensão final. Nesta etapa, foram acrescentados tubos com água ultra-pura a cada cinco amostras para se avaliar possíveis contaminações pela manipulação do DNA amplificado.

As amostras que resultaram na banda correspondente a 268 e 361pb em gel de agarose a 1,5%, submetido a eletroforese e corado com brometo de etídeo 0,5µg/mL e observados sob luz ultravioleta foram consideradas como positivas para os subtipos A e B, respetivamente.

3.11 DETECÇÃO DO VÍRUS DA DOENÇA DE NEWCASTLE MEDIANTE A REACÇÃO EM CADEIA PELA POLIMERASE (RT- PCR)

Com a finalidade de investigar a presença do vírus da doença de Newcastle, foi realizada uma RT- PCR dirigida ao uma região do gene que codifica a proteína F das linhagens virulentas e avirulentas descrita por Tiwari et al. (2004).

Para isso, 2,5µL de cada cDNA foram adicionados ao mix de PCR que contem 1 x PCR BufferTM (Life Technologies Brasil), 0,2mM de cada dNTP, 0,5µM de cada primer NCF 5' TTGATGGCAGGCCTCTTGC 3' (senso) (nt 141 ao 159) e NCC 5' (A/G)CG(A/T)CCCTGT(C/T)TCCC-30 (anti-senso) (nt 395 ao 380), ,5mM MgCl₂, 12,625µL água DEPC e 0,625U de Platinum Taq DNA polimerase (Life Technologies BrasilTM) para uma reacção final de 25µL e submetidos a 35 ciclos a 94°C/1 minuto, 50°C/1minuto e 30 segundos e 72°C/2 minutos, seguidos por 72°C/10 minutos para extensão final.

Dez microlitros do produto da PCR de cada amostra foram analisados em gel de agarose a 1,5%, submetido a eletroforese, corado com brometo de etídeo a 0,5µg/mL e observados sob luz ultravioleta. As amostras que resultaram numa banda correspondente a 255pb foram consideradas positivas.

3.12 CLONAGEM DO PRODUTO DA PCR DAS AMOSTRAS POSITIVAS DE CORDORNAS PARA 3'UTR

Com o objetivo de aumentar a concentração dos *amplicons* de DNA para a região 3'UTR obtidos para as amostras de codornas a serem sequenciados, os mesmos foram clonados em plasmídeos previamente à realização do sequenciamento.

3.12.1 Purificação dos *amplicons* a partir do gel de agarose

Bandas de 179pb visualizadas em luz ultravioleta foram recortadas do gel de agarose e purificadas utilizando o kit GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification kit (GE Healthcare, Fairfield, CT). A concentração total de dsDNA foi medida em espectrofotômetro Nanodrop™ (Thermo Scientific), utilizando comprimento de onda de 280 nm.

3.12.2 Inserção no plasmídeo, transformação bacteriana e extração plasmidial

Os fragmentos purificados foram individualmente inseridos (na região lacZ) em um vetor plasmidial pTZ57R/T (na proporção plasmídeo-inserto de 1:3) utilizando-se o kit InsTaclone™ (Fermentas, Maryland, USA), de acordo com as recomendações do fabricante, e os plasmídeos foram usados separadamente para transformar células competentes da linhagem JM 109 de *Escherichia coli*.

Para tanto, 10µL de cada reação de ligação foram adicionados a 100µL de *E. coli* JM 109 competente e incubados durante 30 min em gelo. A seguir, as amostras foram submetidas a um choque térmico aquecendo-se a 42° C por 2 min e imediatamente colocadas no gelo durante 2 min. As bactérias transformadas foram então cultivadas em 900µL de meio SOC por 1,5 horas à 37° C e 150 rpm. Após este período, 100µL das culturas foram plaqueadas em meio Luria–Bertani (LB) contendo 50µg/mL de ampicilina, IPTG (0,5mM) e X-Gal (40µg/ml) e incubadas a 37°C por 24 horas.

O sucesso da clonagem interrompe a sequência codificadora da β-galactosidase, codificada na região do gene lacZ do plasmídeo, sendo que aqueles que receberam o inserto de cDNA formam colônias brancas por não metabolizarem o substrato X-gal e as que não o receberam, formam colônias azuis.

Finalmente, dois clones de JM109 para cada *amplicon* foram selecionados e submetidos à reação de PCR utilizando os *primers* M13/Puc (5' GTAAAACGACGGCCAG 3') senso e M13/pUC (5' CAGGAAACAGCTATGAC 3')

antisense direcionados para a região flanqueadora da inserção do plasmídeo seguindo as instruções do fabricante (Figura 5) para confirmação da presença do inserto. Em seguida os clones contendo os fragmentos desejados foram crescidos em meio LB contendo ampicilina (50µg/mL) durante 12 horas (*overnight*). A extração plasmidial foi realizada utilizando-se o kit NucleoSpin Plasmid™ (Macherey Nagel, Düren, Germany) como recomenda o protocolo do fabricante.

Após a corrida eletroforética em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídio 0,5µg/mL os produtos extraídos foram quantificados visualmente por meio de comparação das bandas obtidas com um padrão de tamanho molecular com Low Mass DNA Ladder (Life Technologies Brasil™, EUA) segundo instruções do fabricante.

Figura 5 - Representação esquemática da região flangeadora da inserção do *amplicon* de 179pb no vetor plasmidial pTZ57R/T

3.13 SEQÜENCIAMENTO DE DNA

A purificação dos *amplicons* de 179pb (*RdRp*) e 390pb (gene S) foi realizada utilizando-se *GFX™ PCR DNA and gel band Purification Kit* (GE Healthcare), sendo o DNA posteriormente quantificado visualmente com Low Mass DNA Ladder (Life Technologies Brasil™) segundo instruções do fabricante. Os insertos de *amplicons* referentes a 3'UTR foram purificados conforme descrito no item 3.10.1. A reação de seqüenciamento de DNA dos produtos purificados junto com os produtos da clonagem

para a região 3'UTR consistiu em 0.5µL de BigDye® Terminator v3.1 (Cycle Sequencing Kit, Applied Biosystems™ EUA, 2 µL de 1x Sequencing buffer (Applied Biosystems™), 0,25µM de cada primer (M13/pUC+ e M13/pUC-, 11FW+ e 13RV- ou SX3+ e SX4-) em reações separadas, 20ng do DNA alvo e água DEPC q.s.p. 10µL. As condições da reação de sequenciamento no termociclador Mastercycler Gradient (Eppendorf™) foram de 96°C/1 minuto, 40 ciclos a 96°C/15 minutos, 50°C/15 minutos e 60°C/4 minutos, com rampa de 1°C por segundo entre cada temperatura.

A seguir, o produto desta reação foi precipitado à temperatura ambiente com 5 µL de EDTA (125mM) e 60µL de etanol absoluto, seguindo de homogeneização e incubação por 15 minutos em temperatura ambiente. Em seguida, a solução foi centrifugada a 16.000 x g/45 minutos a 4°C, o sobrenadante removido, adicionado 65 µL de etanol a 70% e centrifugado a 16.000 x g/15 minutos a 4°C. Procedeu-se a secagem do precipitado a 95°C/5 minutos. Após esta etapa, as sequências foram resolvidas em seqüenciador capilar Genetic Analyser 3500 (Applied Biosystems™).

3.14 EDIÇÃO DE SEQUENCIAS DE DNA

Os cromatogramas gerados para cada uma das sequências senso e antisenso de cada amostra e gene foram submetidos ao aplicativo Phred¹ disponível *online* em: <http://asparagin.cenargen.embrapa.br/phph/> para avaliação da qualidade dos mesmos, utilizando-se apenas posições com escore superior a 20 (probabilidade de um erro a cada 100 nucleotídeos).

A seguir, os cromatogramas foram conferidos manualmente com o programa FinchTV 1.4 (© 2011 PerkinElmer) para a busca por erros de interpretação e discrepâncias entre cada uma das fitas seqüenciada. A sequência 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

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

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>)² para confirmação da especificidade do seqüenciamento.

3.15 ANÁLISE FILOGENÉTICA

A árvore genealógica para as sequências de nucleotídeos de cada região genômica estudada foi gerada após o alinhamento das mesmas com sequências homólogas recuperadas do Genbank e correspondentes as diversas espécies de coronavírus aviário pelo método CLUSTAL/W com o programa Bioedit v. 7.0.5.3 (HALL, 1999).

O alinhamento assim obtido foi utilizado para a geração da árvore de distância, com algoritmo Neighbor-Joining e modelo evolutivo Maximum Composite Likelihood, com 1000 repetições de bootstrap, utilizando-se o programa MEGA 5.0 (TAMURA et al., 2011).

Para as sequências referentes aos genes *S* e *RdRp*, árvores de aminoácidos seriam geradas a partir das traduções das sequências de nucleotídeos, com algoritmo Neighbor-Joining e modelo de Poisson, com 1000 repetições de bootstrap, utilizando-se o programa MEGA 5.0.

3.16 FORMA DE ANÁLISE DOS RESULTADOS

A frequência de ocorrência de coronavírus nas codornas e nas galinhas poedeiras foi determinada pela razão entre o número de amostras positivas pela *semi-nested* RT-PCR para a região 3'UTR para cada classe de amostras e o total de amostras testadas em cada classe. A associação entre a espécie de ave (codorna e

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

galinha) e a presença do vírus foi determinada com a aplicação do teste exato de Fisher com o programa Minitab® 15.1.0.0.(© 2006 Minitab Inc.).

As espécies de coronavírus encontradas nas codornas e nas galinhas foram determinadas por meio do seqüenciamento e da filogenia da 3'UTR e o gene codificador da proteína RNA- polimerase RNA dependente.

Finalmente o papel das codornas como reservatório para a Bronquite infecciosa das galinhas foi inferido pela ocorrência simultânea de uma mesma linhagem de IBV nas duas espécies de aves estudadas.

4 RESULTADOS

A ocorrência de coronavírus aviário em codornas e galinhas provenientes das mesmas granjas, a associação de co-infecção com o metapneumovírus aviário e vírus da doença de Newcastle, a classificação das amostras de coronavírus encontradas, assim com o sequenciamento parcial das regiões do genoma estudadas encontram-se descritos nos itens a seguir.

4.1 DETECÇÃO DE CORONAVÍRUS AVIÁRIOS MEDIANTE A REACÇÃO EM CADEIA PELA POLIMERASE SEMI-NESTED (SEMI-NESTED RT-PCR) DIRIGIDA A REGIÃO 3'UTR

Durante o período de 2009 a 2010, foi analisado de seis granjas um total de 30 lotes (18 de codornas e 12 de galinhas) sendo 13 lotes de codornas e 4 de galinhas identificados como positivos (56.6%) para presença de *Gammacoronavirus*. Dos 18 lotes de codornas, 7 (7/8 - 87.5%) foram positivos em 2009 e 6 (6/10 – 60%) em 2010. Do total de lotes analisados, 18.11% (25/138) dos pools entre galinhas e codornas resultaram positivos para o coronavírus aviário (Tabela 1 e Gráfico 1).

Tabela 1 - Frequência de *Gammacoronavirus* nas granjas (galinhas e codornas) estudadas durante o período de 2009-2010

Granja	Positivo		Negativos		Total
	n	%	N	%	N
1	6	24	19	76	25
2	3	20	12	80	15
3	8	30	19	70	27
4	4	12	31	88	35
5	0	0	9	100	9
6	4	15	23	75	27

Gráfico 1 - Frequência de *Gammacoronavirus* nas granjas (galinhas e codornas) estudadas durante o período de 2009-2010

Levando-se em consideração a divisão por *pools*, 5.5% (1/18) dos aparelhos reprodutores e pulmões, 16.6% (3/18) dos rins, 22% (4/18) das traquéias e 61% (11/18) dos conteúdos entéricos testados das codornas foram positivos para os *Gammacoronavirus* (Gráfico 2). Quanto às galinhas, o RNA viral foi identificado em *pools* dos pulmões (1/12 – 8.3%), dos rins (3/12 - 25%) e das traquéias (1/12- 8.3%) (Gráfico 3).

Gráfico 2 - Ocorrência de *Gammacoronavirus* em codornas nos anos de 2009 e 2010 nas amostras estudadas dos municípios de Santa Maria de Jetiba/ES e Bastos/SP

Gráfico 3 - Ocorrência de *Gammacoronavirus* em galinhas poedeiras nos anos 2010 e nas amostras estudadas dos municípios de Santa Maria de Jetibá/ES e Bastos/SP

A análise da presença de RNA dos *Gammacoronavirus* nos *pools* de órgãos das codornas e galinhas em 2010 evidenciou uma maior ocorrência no aparelho reprodutor (1/11 – 9%) e traquéia (2/11 – 18.2%) das amostras provenientes das codornas quando comparado com os resultados obtidos das galinhas, sendo que nenhum pool de aparelho reprodutor de galinhas foi positiva e em 9% (1/11) dos *pools* de traquéia foi confirmada a presença do RNA viral. No entanto, nos *pools* dos rins houve uma maior frequência

nas amostras provenientes das galinhas (3/11 – 27,2%) e no *pool* dos pulmões (1/11 – 9%) a frequência foi igual para as duas espécies. No total foram observados 54,5% (6/11) e 45,5% (5/11) de *pools* positivos para *Gammacoronavirus* nas codornas e galinhas, respectivamente (Gráfico 4).

Gráfico 4 - Ocorrência de *Gammacoronavirus* em codornas e galinhas poedeiras no ano 2010 nas amostras estudadas dos municípios de Santa Maria de Jetiba/ES e Bastos/SP

Utilizando-se o programa Minitab® 15.1.0.0.(© 2006 Minitab Inc.), aplicou-se o teste exato de Fisher para se determinar a associação entre a espécie de ave e a presença de coronavírus aviário nos *pools* de órgãos avaliados em 2010, não tendo sido verificada associação estatisticamente significativa entre as mesmas ($p=1$).

4.2 AMPLIFICAÇÃO DE SEGMENTOS PARCIAIS DO GENE CODIFICADOR DA RNA-POLIMERASE RNA DEPENDENTE MEDIANTE UMA REAÇÃO EM CADEIA PELA POLIMERASE (PCR)

A reação de RT-PCR para o gene codificador da proteína *RdRp* foi positiva em *pools* de conteúdo entérico em seis (6) de vinte (20) amostras testadas das codornas, dos dois municípios em estudo, e seis (6) de dez (10) amostras das galinhas, sendo

que o *pool* de traqueia pertencia ao município de Bastos e os cinco restantes a *pools* de conteúdo entérico de lotes de galinhas poedeiras de diversas regiões do Brasil, todas estas positivas para a RT-PCR tendo como alvo a 3'UTR.

As reações referentes ao controle negativo e aos controles incluídos na fase de *nested* (DPEC) não apresentaram quaisquer bandas.

4.3 REAÇÃO DE TRANSCRIÇÃO-REVERSA SEGUIDA DE REAÇÃO EM CADEIA PELA POLIMERASE MULTIPLEX NESTED (MULTIPLEX NESTED RT-PCR) PARA GENOTIPAGEM DAS AMOSTRAS POSITIVAS PARA O CORONAVÍRUS AVIÁRIO

Em todas as amostras positivas na triagem com a semi- *nested*-RT-PCR dirigida à região 3'UTR foi aplicada o multiplex nested RT-PCR para a amplificação de segmentos da região codificadora da subunidade S1 da proteína S dos sorotipos Massachusetts, D274 e 4/91 ou 793.

Todas as linhagens detectadas do IBV nas amostras provenientes das galinhas e codornas pertencem a algum tipo variante (100%), isto é, diferem dos genótipos vacinais pesquisados (Quadro 2).

Quadro 2 - Resultados da genotipagem das amostras segundo o ano de coleta, estado (ES= Espírito Santo; SC= Santa Catarina; SP= São Paulo; PR= Paraná; MG= Minas Gerais), lote, espécie e tipo de amostra.

Ano	Estado	Lote	Espécie	Amostra	Resultado
2009	SP	R1	Codorna	Traquéia	Variante
2009	SP	R2	Codorna	Conteúdo entérico	Variante
2009	SP	R2	Codorna	Rim	Variante
2009	SP	R3	Codorna	Conteúdo entérico	Variante
2009	SP	R4A	Codorna	Conteúdo entérico	Variante
2009	SP	R4B	Codorna	Traquéia	Variante
2009	ES	1A	Codorna	Conteúdo entérico	Variante
2009	ES	1B	Codorna	Conteúdo entérico	Variante
2010	ES	1	Codorna	Aparelho reprodutor	Variante
2010	ES	1	Codorna	Conteúdo entérico	Variante
2010	ES	1	Codorna	Rim	Variante
2010	ES	1	Codorna	Traquéia	Variante
2010	ES	1	Codorna	Traquéia	Variante
2010	ES	2	Codorna	Pulmão	Variante
2010	ES	30	Galinha	Rim	Variante
2010	ES	31	Galinha	Rim	Variante
2010	ES	31	Galinha	Traquéia	Variante

Quadro 2 - Resultados da genotipagem das amostras segundo o ano de coleta, estado (ES= Espírito Santo; SC= Santa Catarina; SP= São Paulo; PR= Paraná; MG= Minas Gerais), lote, espécie e tipo de amostra (Continua)

Ano	Estado	Lote	Espécie	Amostra	Resultado
2010	SP	5	Codorna	Conteúdo entérico	Variante
2010	SP	5	Codorna	Rim	Variante
2010	SP	8	Codorna	Conteúdo entérico	Variante
2010	SP	9	Codorna	Conteúdo entérico	Variante
2010	SP	9	Codorna	Traquéia	Variante
2010	SP	10	Codorna	Conteúdo entérico	Variante
2010	SP	13	Galinha	Rim	Variante
2010	SP	16	Galinha	Traquéia	Variante
2011	SC	09	Galinha	Pulmão	Variante
2011	PR	01	Galinha	Conteúdo entérico	Variante
2011	RS	05	Galinha	Conteúdo entérico	Variante
2011	MG	04	Galinha	Rim	Variante
2011	SP	16	Galinha	Pulmão e traquéia	Variante

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

Não foram obtidos *amplicons* para quaisquer um dos 20 pools de amostras das codornas e 10 *pools* de amostras de galinhas testados para a amplificação de um

segmento de 390pb da região S1 do gene S que seriam utilizados no estudo da genealogia para este gene.

4.5 DETECÇÃO DE METAPNEUMOVIRUS AVIÁRIO E VÍRUS DA DOENÇA DE NEWCASTLE MEDIANTE A REACÇÃO EM CADEIA PELA POLIMERASE SEMI-NESTED (SEMI-NESTED RT-PCR)

Nos *pools* de órgãos e conteúdo entérico das codornas o RNA viral de metapneumovírus aviário não foi detectado, no entanto em um dos *pools* de aparelho reprodutor e em dois *pools* de pulmão das galinhas provenientes dos dois municípios estudados, foi possível detectar o subtipo B de metapneumovírus.

Quanto ao vírus da doença de Newcastle, o RNA viral não foi detectado em nenhuma das amostras estudadas.

4.6 CLONAGEM DO PRODUTO DA PCR DAS AMOSTRAS POSITIVAS DE CORDORNAS PARA 3'UTR

Vinte produtos purificados de 179pb obtidos a partir da aplicação da *semi-nested*-RT-PCR dirigida à região 3'UTR nas amostras originárias das codornas foram inseridos no vetor plasmidial pTZ57R/T, clonados e submetidos a reacção de PCR com *primers* direccionados a região verificados mediante a observação de uma banda de flaqueadora da inserção do plasmídeo, resultando em um produto de 320 pb (Figura 6).

Figura 6 - Gel de agarose 1.5% corado com brometo de etídeo 0,5 µg/ML do produto (320pb) da PCR direcionada para a região flanqueadora da inserção do plasmídeo contendo o inserto de 179pb referente a 3'UTR

4.7 SEQÜENCIAMENTO DE DNA

Para os *amplicons* referentes à região 3' UTR (produto da clonagem no caso das codornas) e da ORF1b do gene que codifica a proteína *RdRp*, 10 pools de amostras das galinhas (traquéia, rim e conteúdo entérico) e 20 *pools* de amostras das codornas (aparelho reprodutor, conteúdo entérico, pulmão, traquéia e rim), foram submetidos ao sequenciamento de DNA. Foram obtidas sequências de 97 nucleotídeos (3' UTR) de 5 amostras das galinhas e 4 amostras de das codornas e de 116 nucleotídeos (*RdRp*) de 4 amostras das galinhas e 3 amostras das codornas.

4.8 ANÁLISE FILOGENÉTICA

Na árvore filogenética da região 3' UTR (Figura 7), as 9 sequências geradas no presente estudo segregaram em dois grupamentos, um correspondente às amostras

das galinhas estudadas, que segregaram juntamente com duas sequências correspondentes a linhagens vacinais (Massachusetts e Arkansas) e uma sequência originária do TCoV e um outro grupamento próprio das codornas, subdivididos em dois clusters diferentes, um correspondente a granja 4 e o outro a granja 6, ambas localizadas na região de Bastos/SP.

Na árvore filogenética gerada para o gene da *RdRp* (Figura 8), houve também a separação de um grupamento exclusivo para amostras de codornas, enquanto que as amostras de galinhas do presente estudo, segregaram com amostras de IBV do sorotipo Massachusetts.

Figura 7 - Árvore genealógica de distância com o algoritmo Neighbor-joining para nucleotídeos da região 3' UTR (nt 27342 ao 27520), mostrando os sorotipos/genótipos clássicos (com o número de acesso do Genbank) e as amostras incluídas no presente estudo (o quadro representa as amostras das codornas, o triângulo as das galinhas e o rombo amostras de aves silvestres brasileiras). 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 substituições de nucleotídeos por sítio

Figura 8 - Árvore genealógica de distância com o algoritmo Neighbor-joining para nucleotídeos da *RdRp* (nt 15647 ao 15801) mostrando os sorotipos/genótipos clássicos (com o número de acesso do Genbank) e as amostras incluídas no presente estudo (o quadro representa as amostras das codornas, o triângulo as das galinhas e o rombo a amostra CRG proveniente de um plantel avícola e isolada no laboratório em ovos SPF). 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 substituições de nucleotídeos por sítio

A identidade de nucleotídeos para região 3'UTR entre o do grupo das codornas foi de 98,9%, entre 97,5% e 97,6% em relação as galinhas e o genótipo Massachusetts (H120). Entre as amostras de galinhas não houve variação e entre o grupo das galinhas e o genótipo H120 a identidade foi de 98.9%.

Em relação ao *RdRp* a identidade de nucleotídeos entre o grupo das codornas foi de 98.8%, 92.13% entre as galinhas e 93.1% com o genótipo Massachusetts (H120 e Ma5). Já entre as amostras de galinhas a identidade foi de 90.5% e 95.3% com o genótipo Massachusetts (H102 e Ma5) (Tabela 2).

Tabela 2 - Identidade média (em porcentagem) de nucleotídeos da região 3'UTR (nt 27342 ao 27520 em relação à amostra Beaudette de IBV e RdRp (nt 15647 ao 15801 em relação à amostra Tor2 do SARS-CoV) para os grupamentos de amostras estudadas no presente estudo (codornas e galinhas) e o sorotipos Massachusetts (H120 e Ma5). ND = Dados não disponíveis

Grupos	3'UTR		RdRp	
	Média %	Desvio padrão	Média %	Desvio padrão
Codornas vs codornas	98	0,086	98,8	1,0392
Galinhas vs galinhas	100	0	90,5	0
Codornas vs galinhas	97,525	0,4887	92,13	2,4513
Codornas vs H120	97.68	2,442	93,1	0
Codornas vs Ma5	ND	ND	93.1	0
Galinhas vs H120	98.9	0	95.3	4,041
Galinhas vs Ma5	ND	ND	95.3	4,04

5 DISCUSSÃO

Nesta investigação, o coronavírus aviário foi detectado em cinco de seis granjas de codornas e galinhas poedeiras estudadas. Algumas dessas granjas apresentaram o vírus em ambas às espécies de hospedeiro simultaneamente, sendo que tanto os coronavírus encontrados em codornas quanto em galinhas foram identificados como próximo àqueles relacionados ao vírus da bronquite infecciosa das galinhas.

Variáveis como o manejo, instalações, biossegurança, densidade populacional, região geográfica, número de animais amostrados e condições de coleta de amostras podem influenciar na detecção do coronavírus aviário e, portanto, nas diferenças encontradas nas frequências de ocorrência entre as granjas estudadas. Isso é devido às diferentes fases na dinâmica da infecção nas diferentes populações no momento da amostragem (JONASSEN et al., 2005).

A granja três, por exemplo, cumpria com a maioria das normas de biossegurança como: limpeza, desinfecção, controle de trânsito de pessoas, animais, veículos, aves de descarte, manutenção de registros sobre produção, morbidade, mortalidade, vacinações e testes de monitoramento; no entanto, a população era alta (181.000 codornas e 600.00 galinhas) e a distância entre os galpões de codornas e galinhas poedeiras era menor do que 100m, o que permite a transmissão de coronavírus aviários entre os lotes (DE WIT, 2000).

No caso da granja número um não existia um rodolúvio ou equipamentos para lavagem e desinfecção dos veículos. Atividades como coleta de ovos, vacinação e alimentação nos lotes das aves eram realizadas pelos mesmos funcionários sem uma devida troca de roupa ou de calçado. Além disso, outra propriedade de galinhas poedeiras, mas de diferente proprietário, encontrava-se próxima à granja de estudo, sendo separada apenas por uma cerca e algumas árvores. Segundo o Programa Nacional de Sanidade avícola (PNSA) , estabelecimentos avícolas, importadores, exportadores e produtores de ovos comerciais e estabelecimentos de explorações de outras aves destinadas à produção comercial de carnes e/ou ovos, como codornas, devem ter localização geográfica adequada, devendo ser respeitada uma distância

mínima de 2km entre os estabelecimentos avícolas com objetivos produtivos. Estes fatos significam que as populações aviárias nestas granjas se encontravam sob risco de ocorrência de diversos patógenos, entre eles os coronavírus aviários.

Quanto à granja quatro, os visitantes deviam tomar banho dentro das instalações da granja antes de ter contato com as aves, caso houvessem visitado outra propriedade no mesmo dia. A desinfecção do carro também era obrigatória. Além disso, árvores de eucalipto e seringueira isolavam a propriedade de outras granjas e uma cerca viva de eucalipto de 200m separava uma parte dos lotes de galinhas dos lotes das codornas. Nesses lotes de galinhas não foram encontradas amostras positivas para IBV.

A granja cinco possuía um menor número de animais na propriedade (5820 codornas e 3898 galinhas), quando comparada com as outras granjas do estudo. Isso pode ter diminuído a probabilidade de detecção de amostras positivas para coronavírus aviário, pois nesta granja não foram encontradas amostras positivas.

Uma característica observada entre as granjas do estudo foi a curta distância entre lotes de idades diferentes e a proximidade entre os lotes de codornas e galinhas. Essa distância chegava ser de 50 m, como no caso da granja seis. Preconiza-se 500 m de distância entre lotes de diferentes idades e do lote em relação à estrada vicinal, rodovia estadual ou federal, e a distância entre galpões dos lotes deve ser o dobro da largura dos galpões (GONÇALVES, 2002). A alta proximidade entre os lotes pode elevar a transmissão de patógenos, explicando, em parte, a elevada frequência de coronavírus aviários detectados entre as granjas em estudo.

Em áreas onde existem granjas avícolas em contigüidade, é improvável manter as galinhas livres de IBV. Em função de baixa biossegurança, o vírus dissemina-se rapidamente, e, como medida de controle, utiliza-se a vacinação (CAVANAGH, 2007).

Observando a frequência de ocorrência de coronavírus aviário com base em lotes como unidade amostral, nota-se que 56% deles, sendo 13 de codornas e 4 de galinhas, foram identificados como positivos para presença de coronavírus aviário. Em relação às galinhas, esta frequência é de fato esperada, uma vez que estudos feitos em populações de galinhas do Brasil demonstraram que a ocorrência de IBV é disseminada e freqüente mesmo em lotes vacinados. (DI FABIO et al., 2000; ABREU et al., 2006;

VILLARREAL et al., 2007a,b; MONTASSIER et al., 2008; MONTASSIER, 2010, FELIPPE et al., 2010; VILLARREAL, et al., 2010b; CHACÓN et al., 2011b).

Para as aves amostradas em 2010, a frequência de coronavírus aviário nos lotes das galinhas (4/12- 33.3%) foi baixa quando comparada aos de codornas (6/10 - 60%) nas 4 granjas estudadas. Uma vez que as galinhas receberam vacinação contra a bronquite infecciosa das galinhas (item 3.1), pode-se especular que uma das razões para uma menor detecção de coronavírus aviário nas galinhas seja algum grau de proteção conferida pelas vacinas, cuja ausência entre as codornas pode ter tido como consequência uma presença mais intensa deste vírus nestas aves.

É importante indicar que a semi-*nested*-RT-PCR utilizada no estudo para a detecção de coronavírus aviário não diferencia entre a presença de RNA genômico e RNA mensageiro. Dessa forma não é possível afirmar que nas amostras positivas o vírus estivesse se replicando. Após a replicação no trato respiratório superior e a fase de viremia, o vírus pode se disseminar para outros tecidos (LAI;CAVANAGH, 1997; COOK, 2008). Por outro lado, não se pode inferir uma infecção recente quando é detectado um vírus em um lote com suspeita de IBV previamente vacinado ou infectado (DE WIT, 2000).

Nas codornas, 5% dos pools de pulmões e 4% dos *pools* de traqueia foram positivos para coronavírus aviário, sendo que um dos pools estudados pertencia às codornas do lote R1, cuja idade era de 2 meses. Nesses animais foram observados sinais como lacrimejamento, tosse (Figura 2) e letargia. Estes sinais são compatíveis com os observados em galinhas de poucos dias ou semanas de idade, as quais apresentam corrimento nasal, ruídos secos (semelhante ao espirrar), olhos lacrimejantes e letargia (CAVANAGH; GELB, 2008; COOK, 2008).

Os sinais respiratórios observados nas codornas também foram identificados em um lote de galinhas de 2 meses e 3 semanas (granja 6), sendo que, ao contrário do esperado, nenhuma amostra de pulmão ou traqueia foi identificada como positiva para coronavírus aviário. A frequência de amostras positivas nos lotes estudados de galinhas foi baixa (8.3%) para este tipo de amostras devido possivelmente a uma quantidade insuficiente de partículas virais a serem detectadas. Não se deve descartar, entretanto, a ocorrência de patógenos respiratórios não pesquisados no presente estudo, como

Mycoplasma gallisepticum, *Escherichia coli* e *Haemophilus paragallinarum* que podem levar aos sinais observados (CAVANAGH; GELB 2008; MATTHIJS et al., 2009).

Nota-se que o coronavírus aviário foi encontrado no presente estudo em amostras de aparelhos reprodutivos de codornas e galinhas (item 4.1) que apresentavam queda na produção de ovos, cascas com menor espessura, maior porosidade e com alteração de formato (Figura 2), tendo sido observadas também falsas poedeiras.

Em aparelhos reprodutores de poedeiras, a manifestação mais comum de infecção por IBV é evidenciada na produção e qualidade de ovos. Isso se deve à replicação viral no oviduto, o que pode causar, em fêmeas jovens, dano permanente ao desenvolvimento do mesmo, observando-se atrofia parcial ou completa deste órgão, podendo as afetadas ovular normalmente mesmo sem produção de ovos (falsas poedeiras). A infecção das poedeiras durante o período de postura pode reduzir a produção em até 10% ou mais, dependendo da imunidade do lote (CAVANAGH; GELB 2008). A produção retorna ao normal de 4- a 6 semanas, mas pode ser observada uma deterioração na qualidade interna e externa do ovo (COOK, 2008), com hipoplasia glandular, que leva à redução da síntese de proteínas do albúmen, especialmente a ovomucina, lisozima e outras proteínas (DHINAKAR; JONES, 1997).

Assim, é provável que em codornas, a patogenia da infecção reprodutiva por coronavírus aviário seja similar àquela já descrita nas galinhas, levando estas a apresentarem sinais já relacionados à infecção por este vírus em aves com função de poedeiras e reprodutoras.

O encontro de coronavírus aviário em *pools* de rins de codornas e galinhas sem alterações patológicas macroscópicas aparentes, como ocorreu para seis amostras, pode estar relacionado ao fato de que este vírus se replica não apenas nos tecidos respiratórios, mas também em rins, onde podem ocorrer infecções crônicas (DE WIT, 2000; DI FÁBIO; VILLARREAL, 2009). Para definir se nas aves em questão este achado significava uma infecção crônica subclínica, uma infecção em fase pré-patogênica ou mesmo se se tratavam de aves convalescentes após doença renal, seria necessário um enfoque patológico que incluísse a demonstração da presença de vírus no tecido renal por métodos como imunoistoquímica ou hibridização *in situ* associadas à

pesquisa por sinais de inflamação como infiltração linfocítica, mas o achado de RNA viral em rins de codornas pode sugerir alguma similaridade com a patogenia observada em galinhas.

O mesmo pode ser avaliado em relação ao encontro de amostras de conteúdo entérico positivas para coronavírus aviário em codornas, sendo que neste tipo de amostra a frequência de detecção foi a mais alta (61%) quando comparada às demais amostras.

Inicialmente, a importância de tal achado é a sugestão de que a via fecal-oral/respiratória seja relevante para populações de codornas como já sugerido também para galinhas (VILLARREAL et al., 2007b) e gansos após amostragem com swabs cloacais (JONASSEN et al., 2005), sendo o trato intestinal das codornas como um potencial órgão-alvo para a replicação do coronavírus aviário. A replicação no trato entérico pode não causar doença, mas resulta na prolongada excreção do vírus através da matéria fecal, sendo as tonsilas cecais um possível sítio de infecção persistente do vírus em galinhas (SAIF, 2004; VILLARREAL et al., 2007b; CAVANAGH, 2007; DE WIT; COOK; VAN DER HEIJDEN, 2011).

Ainda, como não houve diferença estatisticamente significativa para a ocorrência de coronavírus entre as duas espécies de aves, não há evidência de maior ou menor susceptibilidade relacionada ao tipo de hospedeiro.

É importante destacar que a presença de RNA viral por RT-PCR em uma amostra biológica não significa necessariamente que o vírus em questão esteja ali se replicando, podendo tal resultado ser obtido em casos de viremia ou presença de RNA extra-virion transportado via hematogêna para o tecido em questão.

Como demonstrado no item 4.2, a aplicação de uma RT-PCR para amplificação parcial do gene *RdRp* em amostras positivas para a RT-PCR dirigida à 3'UTR resultou no *amplicon* esperado de 179 pb em seis *pools* de conteúdo entérico de vinte amostras testadas de codornas e cinco *pools* de conteúdo entérico e um de traquéia de um total de dez amostras, evidenciando uma discordância entre as duas RT-PCRs que pode ser primeiramente atribuída às diferenças na sensibilidade dos métodos, pois sabe-se que a *semi-nested*-RT-PCR, utilizada para a 3'UTR, pode ser muito mais sensível do que a RT-PCR convencional, como a utilizada para o *RdRp*, em função da adição de um

segundo passo de amplificação (CAVANAGH et al., 1999). Entretanto, esta RT-PCR não tinha por objetivo a confirmação do diagnóstico, mas sim gerar *amplicons* para sequenciamento de DNA e filogenia.

Todas as amostras de coronavírus aviário detectadas foram classificadas como variantes pela multiplex-RT PCR aplicada para este fim, utilizando-se a nomenclatura “variante” para aquelas amostras virais que não pertencem aos arquétipos de IBV descritos neste método.

A classificação de IBV em genótipos é dificultada pela falta de homogeneidade entre os testes utilizados em todo o mundo, o uso de nomes diferentes para o mesmo tipo de vírus, o grande número de diferentes sistemas de teste disponíveis e, talvez o mais importante, a natureza deste vírus, com uma alta taxa de mutação (SAIF, 2004; MENDONÇA PITANGUI et al., 2009; JACKWOOD et al., 2010). A ocorrência de IBV em lotes vacinados e não vacinados confirmam as observações de campo, que sugerem que o sorotipo vacinal Massachusetts, único permitido no Brasil, confere pouca ou nenhuma proteção cruzada contra os isolados de campo (CAVANAGH; NAQI 2003; CHACÓN, et al., 2011b).

Tipos variantes de coronavírus aviário estão presentes em todo tipo de criações de galinhas e regiões do Brasil (VILLARREAL et al., 2010b) e o encontro de vírus assim classificados também em codornas demonstra similaridade entre os coronavírus das galinhas e das codornas nestas granjas.

Sobre estes resultados, deve-se considerar que a região alvo da multiplex RT-PCR de genotipagem é a região codificadora da subunidade S1 da proteína S, a qual apresenta intensos polimorfismos, o que pode gerar resultados falso-negativos por ineficiente hibridação dos *primers* a seus alvos (DE WIT, 2000), considerando que a ausência de amplificação é a base para a nomenclatura como variante. Ainda, o set de *primers* utilizados nesta reação prevê apenas três genótipos, ainda que o mais importante em termos vacinais no Brasil, Massachusetts, esteja entre eles, fica claro que a utilização de uma maior diversidade de *primers* nesta reação poderia permitir a classificação mais exata de uma amostra de IBV (DI FÁBIO; VILLARREAL, 2009).

Além disso, amostras clínicas como traquéia, rim e fezes podem ter inibidores não específicos da polimerase utilizada na PCR e, portanto pode diminuir a sensibilidade (DE WIT, 2000).

Assim sendo, com o objetivo de se examinar com maior proximidade a identidade das 30 amostras (20 de codornas e 10 das galinhas) classificadas como variantes, aplicou-se uma *nested*-RT-PCR dirigida à amplificação parcial da sequência codificadora da subunidade S1 da proteína de espícula, sem, contudo, a obtenção de nenhum *amplicon*.

Em trabalhos anteriores (SANDRI, 2009; DA SILVA SANTOS, 2012) foi utilizada com êxito a mesma *nested* RT-PCR para amplificação e sequenciamento de diversas amostras brasileiras provenientes de todos os tipos de criação de galinhas (poedeiras, reprodutoras, frango de corte e matrizes), demonstrando que a reação de fato permite a geração de *amplicons* de S1 em amostras consideradas como variantes brasileiras. Entretanto, é possível que houvesse variações gênicas nas regiões de hibridação dos *primers* utilizados no presente estudo e que tenham levado à ausência de amplificação subsequente.

Outro ponto importante a ser considerado neste caso é a interferência negativa de uma baixa concentração de vírus nas amostras, fora do limiar de detecção da RT-PCR utilizada.

Em algumas amostras de galinhas que apresentavam queda na produção de ovos detectou-se o aMPV em co-infecção com IBV (granja 3) ou sem co-infecções (granja 6), o que pode, em parte, ser a causa dos sinais como descargas nasais, lacrimejamento, conjuntivite relatados para estas granjas.

Entretanto, em nenhuma das amostras de codornas avaliadas houve a detecção de aMPV dos tipos A e B. Até o momento não há relatos de caso de aMPV em codornas, mas a doença respiratória relacionada ao mesmo já foi descrita em aves comerciais como peru, frango de corte, matrizes e poedeiras com ou sem vacinação (D'ARCE et al., 2005; CHACÓN et al., 2007; CHACÓN et al., 2011a; FELIPPE et al., 2011) e em aves silvestres como patos, pombos, pardais, gaivotas, gansos, andorinhas, jandaia, pato-corredor, jacu e avestruzes (CADMAN et al., 1994; SHIN et al., 2000;

BENNETT et al., 2002; FELIPPE et al., 2011) em várias partes do mundo, incluindo o Brasil.

Considerando que nas granjas em estudo apenas as galinhas e não as codornas eram submetidas à vacinação contra aMPV, pode-se especular que nas populações estudadas a frequência de ocorrência de aMPV em galinhas foi baixa em função da proteção vacinal e, em codornas, por sua vez, por serem estes animais não susceptíveis a infecção.

Quanto ao NDV, não houve a detecção de amostras positivas, indicando que o controle com a vacinação e o plano de contingência para Influenza aviária e doença de Newcastle do Ministério de agricultura, pecuária e abastecimento (MAPA) está sendo efetivo. Os últimos casos relatados pela Organização Mundial de Saúde Animal (OIE) ocorreram em 2006 nos estados de Rio Grande do Sul e Mato Grosso (em galinhas de quintal) e no Amazonas (em 9 perus e 6 galinhas de quintal).

Dos 30 *amplicons* obtidos (179 pb para 3'UTR e para o gene *RdRp*), foram obtidas quatro sequências das codornas e cinco das galinhas para 3'UTR e seis amostras entre codornas e galinhas para o gene *RdRp* viáveis para a análise genealógica. Uma série de variáveis como baixa concentração ou qualidade de DNA adicionado à reação de sequenciamento, perdas durante a fase de purificação do *amplicon* ou na fase de precipitação com EDTA/ etanol após a reação com os dideoxi-nucleotídeos, ou ineficiência de *primers* para as reações de sequenciamento, podem ter impedido a obtenção de sequências para todas as amostras em questão.

A clonagem, apesar de ser laboriosa e ter um custo alto, é funcional para que se consigam sequências de DNA a partir de *amplicons* inicialmente de baixa concentração, mas procedimentos como a quantificação de DNA devem ser realizados porque uma alta concentração de DNA também pode inibir a reação (COUSINOU; REDONDO, 2007).

Na árvore da 3'UTR (figura 7) as sequências obtidas de amostras de galinhas segregaram com outras referentes ao IBV, TCoV (JACKWOOD et al., 2010) e a uma amostra do pavão silvestre identificada como protótipo Massachussetts, sem histórico de doença ou vacinação (SUN et al., 2007). Isso demonstra que os coronavírus encontrados são de fato amostras do vírus da bronquite infecciosa das galinhas.

Por sua vez, as amostras virais detectadas em codornas segregaram em um grupo diferente e uma das quatro amostras formou um cluster junto com uma amostra de coronavírus aviário de faisão (CAVANAGH et al., 2002), sem, entanto, formarem clusters exclusivos ou distantes de IBV.

Há também, entre as amostras de IBV detectadas em codornas, uma tendência a um padrão filogeográfico, visto que na granja número quatro uma única linhagem foi encontrada, enquanto na granja seis, duas linhagens foram encontradas em duas amostras diferentes de conteúdo entérico, sendo as duas granjas se encontravam localizadas no município de Bastos.

Quanto a árvore filogenética do gene *RdRp* (figura 8), pode-se observar que o padrão de segregação das amostras das codornas e galinhas se manteve, suportando o resultado para 3'UTR, além de indicar que não houve recombinação nas áreas genômicas estudadas.

Com estes resultados, considerando-se também as identidades elevadas de nucleotídeos encontradas entre amostras de codornas e de galinhas (tabela 2) pode-se demonstrar que as codornas estudadas apresentaram o coronavírus aviário do tipo IBV, havendo divergência entre os vírus de codornas e aqueles de galinhas, possivelmente por se tratarem, no caso de codornas, de vírus de campo não detectado em galinhas por estarem estas com algum grau de proteção vacinal, nas quais se detectou, por sua vez, os próprios vírus vacinais, agrupados (figura 7 e 8) juntamente com amostras do sorotipo Massachusetts utilizado em vacinas.

A alta taxa de mutação dos coronavírus não só leva à geração de uma diversidade de estirpes e genótipos de uma espécie coronavírus, mas também a novas espécies que são capazes de se adaptar a novos hospedeiros e nichos ecológicos (WOO; LAU; YUEN, 2006; WOO et al., 2009), como exemplo as codornas.

Recentemente, demonstrou-se a existência de coronavírus isolados de pavão (*Pavo cristatus*), perdiz (*Alectoris* sp.), galinha d'Angola (*Numida Meleagris*) e marreco (*Anas* sp.), alguns mantidos em proximidade com galinhas com características genômicas IBV-semelhantes (LIU et al., 2005).

Além do contato próximo entre infectados e susceptíveis, os vírus RNA se transmitem mais facilmente entre as espécies, quando os dois hospedeiros estão

intimamente relacionados sob o ponto de vista evolutivo (HOLMES; RAMBAUT, 2004, CAVANAGH, 2005) como é o caso das galinhas e codornas que pertencem à família *Phasianidae*.

As codornas podem ser reservatórios para coronavírus aviários considerando-se que as codornas e galinhas são criadas nas mesmas propriedades e a proximidade das granjas mesmo de proprietários diferentes. Esta é uma nova área de pesquisa, porque espécies galiformes e não galiformes podem ser portadores potenciais de IBV e outros coronavírus e podem, portanto ter um papel importante na transmissão global da infecção (COOK, 2008).

Contudo, vários pontos como a obtenção de um maior número de amostras e, sobretudo, de coletas simultâneas de galinhas e codornas em granjas onde as mesmas são mantidas em conjunto, um maior comprimento de sequências gênicas e inclusão de mais áreas genômicas são essenciais para a consolidação e ampliação das discussões aqui apresentadas.

Estudos realizados em pavões, pombos, gansos e perus demonstram a importância de isolar e inocular em ovos SPF amostras de coronavírus de espécies diferentes das galinhas para determinar se esses vírus podem se replicar nos mesmos.

Além disso, inoculações experimentais em galinhas e codornas com amostras homólogas e heterólogas de IBV constituem-se em trabalho interessante para comparar com o comportamento das infecções observadas em campo. Outras técnicas como imunohistoquímica serão de elevada importância para a demonstração de infecção, além de acompanhamento de resposta imune, ampliando o conhecimento na epidemiologia, patogenia e virologia de *Gammacoronavirus* em aves.

6. CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos nesse estudo pode-se concluir:

- Coronavírus aviário pode ser detectado em amostras de trato reprodutivo, respiratório, urinário e entérico de codornas e galinhas em granjas onde se tem a criação conjunta destas aves com relatos de manifestações clínicas compatíveis com bronquite infecciosa das galinhas em ambas das espécies de hospedeiro.
- Com base em sequências de DNA para os genes codificadores da proteína RNA-polimerase RNA-dependente e da região 3'UTR, pode-se demonstrar que codornas apresentaram coronavírus aviários do mesmo tipo relacionado à bronquite infecciosa das galinhas, com tendência à ocorrência de diversidade molecular associada a padrões geográficos.
- Codornas podem ser reservatórios para coronavírus aviários considerando-se codornas e galinhas criadas em proximidade.

REFERÊNCIAS

ABREU, J. T.; RESENDE, J. S.; FLATSCHART, R. B.; FOLGUERAS-FLATSCHART A. V.; MENDES, A. C.; MARTINS, N. R.; SILVA, C. B.; FERREIRA, M. C; RESENDE, M. Molecular analysis of Brazilian infectious bronchitis field isolates by reverse transcription–polymerase chain reaction, restriction fragment length polymorphism , and partial sequencing of the N gene. **Avian Diseases**, v. 50, n. 4, p. 494-501, 2006.

ALDOUS, E. W.; ALEXANDER, D. J. Detection and differentiation of Newcastle disease virus (avian paramyxovirus type 1). **Avian Pathology**, v. 30, n. 2, p. 117-128, 2001.

ALEXANDER, D. J.; SENNE, D. A. Newcastle disease, other avian paramyxoviruses, and pneumovirus infections. In: SAIF, Y. M.; FADLY, A. M; GLISSON, J. R.; MCDOUGALD, L. R.; NOLAN, L. K.; SWAYNE, D. E. **Diseases of Poultry**. 12th. Iowa: Blackwell Publishing, 2008, p. 75- 116.

BAYON-AUBOYER, M. H.; ARNAUD, C.; TOQUIN, D.; ETERRADOSSI, N. Nucleotide sequence of the F, L and G protein genes of two non-A/non-B avian metapneumovirus (aMPV) reveal a novel aMPV subtype. **Journal of General Virology**, v. 81, p. 2723-2733, 2000.

BENNETT, R. S.; MCCOMB, B.; SHIN, H. J.; NJENGA, M. K.; NAGARAJA, K. V.; HALVORSON, D. A. Detection of avian pneumovirus in wild Canada geese (*Branta canadensis*) and blue-winged teal (*Anas discors*) geese. **Avian Diseases**, v. 46, n. 4, p. 1025-1029, 2002.

BRANDÃO, P. E. Avian Infectious Bronchitis Virus in Brazil : a highly complex virus meets a highly susceptible host. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, v. 12, n. 2, p. 121-124, 2010.

BRYAN, M. Coronavírus aviário. In REVOLLEDO, L.; FERREIRA, A .J. P. **Patologia Aviária**. Barueri: Manole, 2009. p. 172-177.

CADMAN, H. F.; KELLY, P. J.; ZHOU, R.; DAVELAAR, F.; MASON, P. R. A serosurvey using enzyme-linked immunosorbent assay for antibodies against poultry pathogens in ostriches (*Struthio camelus*) from Zimbabwe. **Avian Diseases**, v. 38, n. 3, p. 621-625, 1994.

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, n. 6, p. 587-592, 1999.

CARDOSO, T. C.; TEIXEIRA, M. C.; GOMES, D.; JEREZ, A. J. Genetically Diverse Coronaviruses in Captive Bird Populations in a Brazilian Zoological Park. **Vector- Borne and Zoonotic Diseases**, v. 11, n. 2, p. 165-168, 2011.

CASAI, R.; DOVE, B.; CAVANAGH, D.; BRITTON, P. Recombinant Avian Infectious Bronchitis Virus expressing a heterologous spike gene demonstrates that the spike protein is a determinant of cell tropism. **Journal of Virology**, v. 77, n. 16, p. 9084-9089. 2003.

CASAI, R.; DAVIES, M.; CAVANAGH, D.; BRITTON, P. Gene 5 of the Avian Coronavirus Infectious Bronchitis virus is not essential for replication. **Journal of Virology**, v. 79, n. 13, p. 8065-8078, 2005.

CAVANAGH, D. K.; MAWDITT, K.; BRITTON, P.; NAYLOR, C. J. Longitudinal field studies of infectious bronchitis virus and avian pneumovirus in broilers using type-specific polymerase chain reactions. **Avian Pathology**, v. 28, n. 6, p. 593-605, 1999.

CAVANAGH, D. A nomenclature for avian coronavirus isolates and the question of species status. **Avian Pathology**, v. 30, n. 2, p. 119-115, 2001.

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.; McDUGALD, L. R. **Diseases of Poultry**. 10th ed. Iowa: State University Press, Ames, 2003. p. 511-526.

CAVANAGH, D.; GELB JR., J. Infectious bronchitis virus. In: SAIF, Y.M.; FADLY, A. M.; GLISSON, J. R.; McDUGALD, L.R.; NOLAN, L. K.; SWAYNE, D. E. **Diseases of Poultry**, 12th. Iowa: Blackwell Publishing, 2008, p. 117-135.

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

———. Coronavirus avian infectious bronchitis virus. **Veterinary research**, v. 38, n. 2, p. 281-297, 2007.

CHACÓN, J. L.; BRANDÃO, P. E.; BUIM, M.; VILLARREAL, L. Y. B.; FERREIRA, A. J. P. Detection by reverse transcriptase-polymerase chain reaction and molecular characterization of subtype B avian metapneumovirus isolated in Brazil. **Avian Pathology**, v. 36, n. 5, p. 383-387, 2007.

CHACÓN, J. L.; MIZUMA, M.; VEJARANO, M. P.; TOQUÍN, D.; ETERRADOSSI, N.; PATNAYAK, D. P.; GOYAL, S. M.; FERREIRA, A. J. P. Avian Metapneumovirus

subtypes circulating in Brazilian vaccinated and nonvaccinated chicken and turkey Farms. **Avian Diseases**, v. 55, n. 1, p. 82-89, 2011a.

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

CHAMBERS, P.; MILLAR, N. S.; BINGHAM, R. W.; EMMERSON, P. T. Molecular cloning of complementary DNA to Newcastle disease virus, and nucleotide sequence analysis of the junction between the genes encoding the haemagglutinin-neuraminidase and the large protein. **The Journal of General Virology**, v. 67, n. 3, p. 475-86, 1986.

CIRCELLA, E.; CAMARADA, A.; MARTELLA, V.; BRUNI, G.; LAVAZZA, A.; BUONAVOGLIA, C. Coronavirus associated with an enteric syndrome on a quail farm. **Avian Pathology**, v. 36, n. 3, p. 251-258, 2007.

CHU, V. C.; McELROY L. J; CHU, V.; BAUMAN, B. E; WHITTAKER, G. The avian Coronavirus Infectious Bronchitis Virus undergoes direct low-ph depend fusion activation during entry into host cells. **Journal of Virology**, v. 80, n. 7, p.3108-3188, 2006.

COOK, J. K. A.; CHESHER, J.; ORTHEL, F.; WOODS, M. A.; ORBELL, S. J.; BAXENDALE, W.; HUGGINS, M. B. Avian pneumovirus infection of laying hens: experimental studies. **Avian Pathology**, v. 29, n. 6, p. 545-556, 2000.

COOK, J. K. A. Coronaviridae. In: PATTISON, M.; MCMULLIN, P.; BRADBURY, J. M.; ALEXANDER, D. **Poultry Diseases**. 6th ed. Elsevier Inc, 2008. p. 340-349.

COOK, J. K. A.; CAVANAGH, D. Detection and differentiation of avian pneumoviruses (metapneumoviruses). **Avian Pathology**, v. 31, n. 2, p. 117-132, 2002.

COUSINOU, M. S.; REDONDO, L. S. Manual de secuenciación. Córdoba: Unidad de genómica del Servicio Central de Apoyo a la Investigación de la Universidad de Córdoba- España, 2007. 14 p. Apostila. Disponível em: <<http://www.uco.es/servicios/scai/impresos/GEN/genomica.html>>. Acesso em: 10 ago. 2011.

D'ARCE, R. C. F.; COSWIG, L. T.; ALMEIDA, R. S.; TREVISOL, I. M.; MONTEIRO, M.; ROSSINI, L. I.; DI FÁBIO, J.; HAFEZ, M. H.; ARNS, C. W. Subtyping of new Brazilian avian metapneumovirus isolates from chickens and turkeys by reverse transcriptase-nested-polymerase chain reaction. **Avian Pathology**, v. 34, n. 2, p. 133-136, 2005.

DA SILVA SANTOS, S. **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.

DE LEEUW, O. S.; KOCH, G.; HARTOG, L.; RAVENSHORST, N.; PEETERS, P. H. B. Virulence of Newcastle disease virus is determined by the cleavage site of the fusion protein and by both the stem region and globular head of the haemagglutinin-neuraminidase protein. **The Journal of General Virology**, v. 86, p. 1759-1769, 2005. Disponível em: <http://vir.sgmjournals.org/cgi/content/abstract/86/6/1759>. Acesso em: 18 dez. 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, 1997.

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

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

DI 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, n. 3, 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.

EASTON, A. J.; DOMACHOWSKIE, J. B.; ROSENBERG, H. F. Animal pneumoviruses: molecular genetics and pathogenesis. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 17, p. 390-412, 2004.

ESCUTENAIRE, S.; MOHAMED, N.; ISAKSSON, M.; THORÉN, P.; KLINGEBORN, B.; BELÁK, S.; BERG, M.; BLOMBERG, J. SYBR Green real-time reverse transcription-polymerase chain reaction assay for the generic detection of coronaviruses. **Archives of Virology**, v. 152, n. 1, p. 41-58, 2007.

FELIPPE, P. A. N.; DA SILVA, L. H. A.; SANTOS, M. M. A. B.; SPILKI, F.R.; ARNS, C.W. Genetic Diversity of Avian Infectious Bronchitis Virus Isolated from Domestic Chicken Flocks and Coronaviruses from Feral Pigeons in Brazil Between 2003 and 2009. **Avian Diseases**, v. 54, n. 4, p. 1191-1196, 2010.

FELIPPE, P. A. N.; DA SILVA, L. H. A.; DOS SANTOS, M. B.; SAKATA, S.T.; ARNS, C. W. Detection of and phylogenetic studies with avian metapneumovirus recovered from feral pigeons and wild birds in Brazil. **Avian Pathology**, v. 40, n. 5, p. 37-44, 2011.

GODEKE, G. J.; DE HAAN, C. A.; ROSSEN, J. W.; VENNEMA, H.; ROTTIER, P. J. Assembly of spikes into coronavirus particles is mediated by the carboxy-terminal domain of the spike protein. **Journal of Virology**, n. 74, p. 1566–1571, 2000.

GONÇALVES, M. F. Programa Nacional de Sanidade avícola. **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA)**, p. 85. 2002. Manual. Disponível em: http://www.grogbrasil.com.br/arquivos/manual_tecnico_saude_avicola.pdf?file=BEPA_Julho_2004_Ano1_Numero7.doc. Acesso em: 28 out. 2011.

HOLMES, E. C.; RAMBAUT, A. Viral evolution and the emergence of SARS coronavirus. **Biological Sciences**, v. 359, p. 1059-1065, 2004. Disponível em: <http://rstb.royalsocietypublishing.org/content/359/1447/1059.short>. Acesso em: 6 jan. 2012.

ICTV. International Committee on taxonomy of viroses. **Virus taxonomy 2009**. Disponível em: < <http://ictvonline.org/virusTaxonomy.asp?version=2009&bhcp=1> >. Acesso em: 28 nov. 2011.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Censo Agropecuário 2010**. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/ppm/2010/ppm2010.pdf>> Acesso em: 11 fev. 2012.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Censo Agropecuário 2011**. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/producaoagropecuaria/abate-leite-couro-ovos_201103_publicacao_completa.pdf> Acesso em: 12 dez. 2011.

JACKWOOD, M. W.; BOYNTON, T. O.; HILT, D. A.; MCKINLEY, E. T.; KISSINGER, J. C.; PATERSON, A. H.; ROBERTSON, J.; LEMKE, C.; MCCALL, A. W.; WILLIAMS, S. M.; JACKWOOD, J. W.; BYRD, L. A. Emergence of a group 3 coronavirus through recombination. **Virology**, v. 398, n. 1, p. 98-108, 2010.

JONASSEN, C. M.; KOFSTAD, T.; LARSEN, I.; LØVLAND, A.; HANDELAND, K.; FOLLESTAD, A.; LILLEHAUG, A. Molecular identification and characterization of novel coronaviruses infecting graylag geese (*Anser anser*), feral pigeons (*Columbia livia*) and mallards (*Anas platyrhynchos*). **Journal of General Virology**, v. 86, p. 1597-1607, 2005.

JONES, R. Avian pneumovirus infection: questions still unanswered. **Avian Pathology**, v. 25, p. 639–648, 1996.

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

LIMA, F. S.; SANTIN, E.; PAULILLO, A. C.; DORETTO JUNIOR, L.; BARBOSA DE MORAES, V. M.; GAMA, N. M. Q.; SCHOCKEN- ITURRINO, R. B. Evaluation of

different programs of Newcastle disease vaccination in Japanese quail (*Coturnix coturnix japonica*). **International Journal of Poultry Science**, v. 3, n. 5, p. 354-356, 2004. Disponível em: <http://scialert.net/qredirect.php?doi=ijps.2004.354.356&linkid=pdf>>. Acesso em 20 dez. 2011.

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

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

MATTHIJS, M. G. R.; ARIAANS, M. P.; DWARS, R. M.; H H VAN ECK, J.; BOUMA, A. STEGEMAN, A. VERVELDE, L. Course of infection and immune responses in the respiratory tract of IBV infected broilers after superinfection with *E. coli*. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 127, n. 1-2, p. 77-84. 2009.

MCKINLEY, E. T.; HILT, D; JACKWOOD, M. W. Avian coronavirus infectious bronchitis attenuated live vaccines undergo selection of subpopulations and mutations following vaccination. **Vaccine**, v. 26, p. 1274-1284, 2008.

MENDONÇA PITANGUI, J. F.; DA SILVA MARTINS, N. R.; BRABIÉRI DE CARVALHO, L.; PINHEIRO DE SÁ, M. E.; BARROS DE MELO, C. Bronquite infecciosa das galinhas: conhecimentos atuais, cepas e vacinas no Brasil. **Ciência Rural**, v. 39, n. 8, p. 2559-2566, 2009.

MILLER, P. J.; DECANINI, L. E.; AFONSO, C. L. Newcastle disease: Evolution of genotypes and the related diagnostic challenges. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 10, p. 26-35, 2010.

MINVIELLE, F. The future of Japanese quail for research and production. **World's Poultry Science Journal**, v. 60, n. 4, p 500-507, 2004. Disponível em: http://journals.cambridge.org/abstract_S004393390400039X>. Acesso em: 20 dez. 2011.

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.

MONTASSIER, M. F. S. Molecular Epidemiology and evolution of avian infectious bronchitis virus. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, v. 12, n. 2, p. 87-96, 2010.

NAGAI, Y.; KLENK, H. D.; ROTT, R. Proteolytic cleavage of the viral glycoproteins and its significance for the virulence of Newcastle disease virus. **Virology**, v. 72, n. 2, p. 494-508, 1976

OIE. Organização mundial da saúde animal. **Event summary: Newcastle disease Brazil - 2006**. Disponível em: http://web.oie.int/wahis/public.php?page=event_summary&reportid=5103. Acesso em: 12 dez. 2011.

———. **Código sanitario para los animales terrestres**. Capítulo 1.10.9. 2011. Disponível em: http://www.oie.int/fileadmin/Home/esp/Health_standards/tahc/2010/es_chapitre_1.10.9.pdf. Acesso em: 21 dez. 2011

OLIVEIRA, D. D. Sanidade de codornas. In BERTECHINI, A. G. **SIMPÓSIO INTERNACIONAL., 2; CONGRESSO BRASILEIRO DE COTURNICULTURA., 1**. Lavras, 2004 p. 1-237.

OLIVEIRA, D. D.; FOLGUERAS-FLATSCHART, V.; FLATSCHART, R. B.; RESENDE, J. S.; ABREU, J. T.; MARTINS, N. R. S. 2007. Indirect ELISA for the detection of IgG specific to Newcastle disease virus in quail serum. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 59, n. 5, p. 1344-1347. 2007. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-09352007000500040>. Acesso em: 24 dez. 2011.

PINTO, R.; FERREIRA, A.S.; ALBINO, L. F. T.; GOMES, P.C.; de Vargas Júnior, J. G. Níveis de proteína e energia para codornas japonesas em postura. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 31, n. 4, 1761-1770, 2002.

SAIF, L. J. Animal coronaviruses: what can they teach us about the severe acute respiratory syndrome ?. **Review of the Office International des Epizooties.**, v.23, n.2, p. 643-660, 2004.

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. 2009. 79 f. Dissertação (Mestrado em ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

SAWICKI, S. G.; SAWICKI, D. L.; SIDDELL, S. G. A contemporary view of coronavirus transcription. **Journal of Virology**, v. 81, n. 1, p. 20-29, 2007. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1797243&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 27 dez. 2011.

STEPHENSON, C. B., CASEBOLT, D. B.; GANGOPADHYAY, N. N. Phylogenetic analysis of a highly conserved region of the polymerase gene from 11 coronaviruses and development of a consensus polymerase chain reaction assay. **Virus Research**, v. 60, p. 181-189, 1999.

SHIN, H. J.; NJENGA, M. K.; MCCOMB, B.; HALVORSON, D. A.; NAGARAJA, K. V.; Avian pneumovirus (APV) RNA from wild and sentinel birds in the United States has

genetic homology with RNA from APV isolates from domestic turkeys. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, n. 11 p. 4282-4284, 2000.

SUN, L.; ZHANG; JING-WEI JIANG; JIA-DONG FU; REN, T.; WEI-SHENG CAO; CHAO-AN XIN; MING LIAO; WEN-JUN LIU. A Massachusetts prototype like coronavirus isolated from wild peafowls is pathogenic to chickens. **Virus Research**, v. 130, n. 1-2, p. 121-128, 2007.

SWAYNE, D. E.; SUAREZ, D. L.; SPACKMAN, E.; TUMPEY, T.M.; BECK, J. R.; ERDMAN, D.; ROLLIN, P. E.; KSIAZEK, T. G.; Domestic poultry and SARS coronavirus, southern China. **Emerging Infectious Diseases**, v. 10, n. 5, p. 914-916, 2004.

TAMURA, K.; PETERSON, D.; PETERSON, N.; STECHER, G.; NEI, M.; KUMAR, S. "MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. **Molecular Biology and Evolution**, v 28, n. 10, p. 2731-2739, 2011.

TIWARI, A. K.; KATARIA, R, S.; NANTHAKUMAR, T.; DASH, B. B.; DESAI, G. Differential detection of Newcastle disease virus strains by degenerate primers based RT-PCR. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v. 27, n. 3, p. 163-169, 2004.

VERHEIJE, M. H.; HAGEMEIJER, M. C.; ULASLI, M.; REGGIORI, F.; ROTTIER, P. J. M.; MASTERS, P. S.; AM DE HAAN, C. The coronavirus nucleocapsid protein is dynamically associated with the replication-transcription complexes. **Journal of Virology**, v. 84, n. 21, p. 11575-11579, 2010.

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, v. 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.

VILLAREAL, 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, 2010a.

VILLARREAL, L. Y. B.; SANDRI, T. L.; SOUZA, S. P.; RICHTZENHAIN, L. J.; DE WIT, J. J.; BRANDAO, P. E. Molecular Epidemiology of Avian Infectious Bronchitis in Brazil from 2007 to 2008 in Breeders , Broilers , and Layers Molecular Epidemiology of Avian Infectious Bronchitis in Brazil from 2007 to 2008 in Breeders , Broilers , and Layers. **Avian Diseases**, v. 54, n. 2, p. 894-898, 2010b.

WEINGARTL, H. M.; COPPS, J.; DREBOT, M. A.; MARSZAL, P.; SMITH, G.; GREN, J.; ANDOVA, M.; PASICK, J.; KITCHING, P.; CZUB, M. Susceptibility of pigs and chickens to SARS coronavirus. **Emerging Infectious Diseases**, v. 10, n. 2, p.179-184, 2004. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15030680>>. Acesso em: 26 dez. 2011.

WEISS, R. S; NAVAS-MARTIN, S. Coronavirus pathogenesis and the emerging pathogen severe acute respiratory syndrome coronavirus. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 69, p. 635-644, 2005.

WOO, P. C.; LAU, S.; KWOK-YUNG, Y. Infectious diseases emerging from Chinese wet-markets: zoonotic origins of severe respiratory viral infections. **Current Opinion In Infectious Diseases**, v. 19, n. 5, p. 401-407, 2006.

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

YUSOFF, K.; SIANG TAN, W. Newcastle disease virus: macromolecules and opportunities. **Avian Pathology**, v. 30, n. 5, p. 419-455, 2001.

YU, Q.; DAVIS, P. J.; BROWN, T. D. K.; CAVANAGH, D. N Sequence and in vitro expression of the M2 gene of turkey rhinotracheitis pneumovirus. **Journal of General Virology**, v. 73, p.1355-1363, 1992.