MARIA DE FÁTIMA SILVA MONTASSIER

**DIVERSIDADE GENÉTICA DE AMOSTRAS BRASILEIRAS DO
VÍRUS DA BRONQUITE INFECCIOSA DETERMINADA PELO
SEQÜENCIAMENTO DE NUCLEOTÍDEOS DOS GENES N E S₁.**

Tese apresentada ao Instituto de Ciências
Biomédicas da Universidade de São Paulo, para a
obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Microbiologia

Orientador: Prof. Dr. Leonardo José Richtzenhain

São Paulo
2008

RESUMO

MONTASSIER, M.F.S. **Diversidade genética de amostras brasileiras do vírus da bronquite infecciosa determinada pelo sequenciamento de nucleotídeos dos genes N e S₁**. 2008. 105 f. Tese (Doutorado em Microbiologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

Foram submetidos à análise molecular, 15 isolados do vírus da bronquite infecciosa (VBI) obtidos durante o período de 1988 a 2000, de surtos à campo da Bronquite Infecciosa (BI), em aves de corte ou de postura das regiões Sul e Sudeste do Brasil. Os resultados obtidos da análise filogenética das sequências parciais dos genes da glicoproteína de espícula (S1) e da nucleoproteína (N) evidenciaram que a maior parte dos isolados estão distribuídos em dois grandes grupos; o primeiro deles mais estreitamente relacionado às estirpes do genótipo Massachusetts e o segundo constituído apenas por isolados brasileiros autóctones com uma grande diversidade em relação às estirpes ou isolados do grupo Massachusetts e de outros países ou continentes. Os sítios polimórficos mais importantes formaram-se em locais específicos e de maneira agrupada nas sequências dos genes S1 ou N e predominam em regiões codificadoras das cadeias polipeptídicas S1 e N que configuram sítios estruturais e antigênicos importantes envolvidos, na expressão de propriedades biológicas relevantes.

Palavras-chave: Vírus da bronquite infecciosa das galinhas, Variantes, Glicoproteína de espícula (S1), Nucleoproteína (N), Brasil.

ABSTRACT

MONTASSIER, M.F.S. Genetic diversity of Brazilian isolates of infectious bronchitis virus by the sequencing of N and S1 genes. 2008. 105 f. Tese (Doutorado em Microbiologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

Fifteen Brazilian field isolates of infectious bronchitis virus (IBV); were recovered, between 1988 and 2000, from commercial broiler or layer flocks located in South and Southeast Brazilian regions. Molecular and phylogenetic analysis of partial sequences of 5'-proximal of S1 gene and 3'-terminus of N gene from these IBV isolates, identified two main groups; the Massachusetts group and a Brazilian indigenous group, which presenting a high diversity regarding the first group or other IBV strains from different countries and continents. The major polymorphic sites are arranged in clusters and predominate in the regions of S1 and N genes which code for relevant structural and antigenic sites responsible for the expression of important biological properties.

Key-words: Infectious bronchitis virus, Variants, Spike glycoprotein (S1), Nucleoprotein (N), Brazil.

1 INTRODUÇÃO

O vírus da bronquite infecciosa (VBI) é, por definição, um coronavírus de aves domésticas (espécie *Gallus gallus*), e se notabiliza por ser o agente etiológico da bronquite infecciosa (BI), mais comumente conhecida como da bronquite infecciosa das aves (CAVANAGH, 2007). A BI se caracteriza por ser uma enfermidade aguda e altamente infecciosa, acompanhada, não raro, por lesões significativas dos tratos respiratório e uro-genital. Tal situação compromete de diferentes maneiras o estado sanitário das aves acometidas e facilita o desenvolvimento de infecções bacterianas secundárias, principalmente por *Escherichia coli* e *Mycoplasma gallisepticum*, resultando, conseqüentemente, em perdas consideráveis da produtividade de criações comerciais de frangos de corte, galinhas de postura ou de aves reprodutoras.

Esta enfermidade está distribuída mundialmente e destaca-se como um dos mais importantes problemas sanitários para o plantel avícola, em virtude de acarretar acentuadas reduções na capacidade produtiva das aves afetadas com conseqüentes perdas econômicas consideráveis para a indústria avícola.

A despeito de existirem vacinas vivas e inativadas contra a BI, persistem grandes entraves para se estabelecer uma condição de controle mais efetivo da infecção pelo VBI nos plantéis avícolas, os quais estão mais diretamente relacionadas ao aparecimento, entre essas mesmas aves, de novos sorotipos ou variantes do agente etiológico, as quais são distintas das estirpes selvagens e vacinais. Em decorrência disso, no mundo todo, tem sido crescente a identificação de variantes genéticas e antigênicas do VBI, tornando muito difícil o controle dessa enfermidade.

Portanto, um programa específico de vacinação ou o desenvolvimento de vacinas específicas para uma imunoprofilaxia bem sucedida da BI, requer uma avaliação mais acurada ou do VBI, ou do organismo hospedeiro, ou, idealmente, da relação hospedeiro (aves) – parasita (VBI), no sentido de se entender melhor a própria pressão seletiva exercida pelas respostas imunes das aves sobre esse patógeno viral e que permeia o processo de variação pelo qual esse agente passa em sua evolução.

A subunidade 1 da glicoproteína de espícula (S1) e a proteína de nucleocapsídeo (N) revelaram-se as duas proteínas estruturais mais importantes do VBI, tanto sob o ponto de vista da variabilidade dos seus genes codificadores, como de suas propriedades fenotípicas, notadamente aquelas relacionadas aos processos de patogenia e imunidade

desencadeados pela interação desse agente infeccioso com o organismo hospedeiro das aves.

A glicoproteína S1 contém os sítios envolvidos na adsorção das partículas virais com receptores específicos presentes na superfície das células a serem infectadas, bem como nela estão presentes os principais epítomos alvo para a combinação com anticorpos neutralizantes da infectividade viral.

Já a proteína N está intimamente associada com o RNA genômico viral e participa diretamente dos processos de replicação e montagem de novas partículas virais e, apresenta epítomos para interação com as células T citotóxicas, contribuindo, dessa maneira, para o estabelecimento de um mecanismo relevante de imunidade contra esse patógeno viral.

Em diferentes regiões do Brasil, houve registros mais recentes da presença, em lotes de criações comerciais avícolas, de quadros clínico-patológicos suspeitos de BI e dos quais foram obtidos alguns isolados do VBI, que se revelaram, nas análises filogenéticas iniciais dos genes codificadores das proteínas estruturais (S1 ou N) ou não estruturais (RNA-polimerase), bastante distintos daqueles já caracterizados para as estirpes de referência da América, Europa, Austrália ou da Ásia.

Entretanto, análises antigênica, genética, patológica e epidemiológica dos isolados do VBI no Brasil, não têm sido sistematicamente realizadas. A relação entre isolados brasileiros e estirpes estrangeiras do VBI, também precisam ser melhor investigadas. Para tanto, há um particular interesse em saber se os isolados do VBI no Brasil foram introduzidos a partir de outros países ou se eles surgiram de mutações ou recombinações de estirpes do VBI de circulação local, incluindo-se as estirpes vacinais desse vírus que são rotineiramente usadas em nosso país (estirpes H120 e H52).

Dentro deste contexto, julgou-se oportuno realizar a presente investigação com o fito principal de analisar as regiões 5'-terminal do gene da glicoproteína de espícula 1 (S1) e 3'-terminal do gene da nucleoproteína (N), que se constituem em dois dos mais importantes genes codificadores de proteínas estruturais do VBI e, ainda, são tomados como base para a classificação de variantes genotípicas ou fenotípicas desse mesmo vírus, com ênfase especial para a elaboração de uma análise genealógica entre tais vírus, a fim de que se consiga alcançar uma compreensão mais abrangente e aprofundada do fenômeno da variabilidade que está ocorrendo em amostras desse vírus isoladas a campo, entre os anos de 1988 a 2000, nas regiões sul e sudeste de nosso país.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Etiologia da bronquite infecciosa das galinhas

Schalk; Hawn, em 1931, no estado de Dakota do Norte, Estados Unidos descreveram uma doença respiratória grave em aves jovens, com elevada mortalidade, a qual identificaram como “Infectious Bronchitis of baby chicks” e, depois de outras investigações realizadas através de modelos de infecção experimental, foi denominada “Infectious Bronchitis”. Contudo, a etiologia viral da bronquite infecciosa só foi comprovada em 1937 por Beaudette; Hudson, após cultivar o agente em ovos embrionados (BROOKS et al., 2004).

A maior parte do que se conhece a respeito dos coronavírus em aves baseia-se no VBI (CAVANAGH; NAQI, 2003; CAVANAGH, 2005), que é o agente etiológico de doenças respiratórias e de outras manifestações patológicas que atingem, em aves domésticas, órgãos do trato uro-genital, como rins, gônadas e anexos como os ovidutos. Embora não seja comum o desenvolvimento de lesões no trato digestório, o VBI é capaz de se replicar muito bem em tecidos do trato gastro-intestinal, como esôfago, proventrículo, duodeno, jejuno, tonsilas cecais, bursa de Fabricius, reto e cloaca, tendo sido inclusive atribuído a algumas estirpes específicas deste vírus a indução de processos de proventriculite. Deve ser, ainda, ressaltado, nesse contexto, que o VBI foi o primeiro coronavírus a ser isolado na década de 30, tal como foi descrito acima.

A despeito da estreita associação do VBI com aves da espécie *Gallus gallus*, tem sido cada vez maior o número de notificações sobre o isolamento de Coronavírus geneticamente similares ao VBI, em outras espécies de aves, galiformes ou não. Dessa forma, além da identificação do VBI como agente da BI, foram relatadas, no início dos anos 2000, a identificação e a caracterização de novos coronavírus aviários, isolados, nesse caso, de perus acometidos por enterite, enfermidades debilitantes, ou mortalidade relativamente elevada (Turkey Coronavirus - TCoV) (GUY, 2000; CAVANAGH et al., 2001) e também de faisões apresentando enfermidade respiratória ou renal (Pheasant Coronavirus - PhCoV) (CAVANAGH et al., 2002).

Ainda, dentro do contexto acima retratado, deve-se considerar a descrição feita por Ito et al. (1991) a respeito do isolamento de um coronavírus com características antigênicas muito similares às do VBI, obtido a partir de amostras colhidas de galinhas

de angola criadas no Brasil, que estavam apresentando enterite, menor consumo de ração e alta mortalidade.

Em acréscimo a essas informações é interessante mencionar que mais recentemente, pesquisadores chineses seqüenciaram os genomas completos de coronavírus isolados de pavões, de perdizes, de galinhas de angola e de uma espécie de pato silvestre. Os resultados mais significativos desse estudo revelaram a presença de várias características genéticas comuns e ratificadoras da classificação desses coronavírus no grupo 3 da Família *Coronaviridae*, bem como evidenciou a grande similaridade de tais vírus com o VBI (LIU et al., 2005).

Além de todas essas investigações com relação a novos isolados de coronavírus aviários, foram levantados dados muito interessantes sobre a existência de novos membros do gênero coronavírus isolados de espécies de aves silvestres e não galiformes, ainda mais recentemente, por Jonassen et al. (2005). Tais autores utilizaram uma abordagem fundamentada na técnica de RT-PCR realizada com oligonucleotídeos iniciadores desenhados para hibridização em regiões gênicas altamente conservadas desses vírus e de forma a serem capazes, por conseguinte, de fazerem a detecção dos membros de todos os grupos da família *Coronaviridae* (RT-PCR - pan-coronavírus). Dessa maneira, esses autores detectaram a presença de coronavírus em amostras fecais ou “swabs” cloacais de gansos, marrecos e pombos silvestres, sendo que o seqüenciamento parcial de nucleotídeos das regiões gênicas amplificadas revelaram características únicas que, além de distinguirem entre si os coronavírus detectados nessas espécies de aves, demonstram que eles também são diferentes dos demais coronavírus classificados no grupo 3 dessa família, isto é, o VBI, o TCoV e o PhCoV.

2.2 Classificação/ taxonomia do VBI

O VBI, que é o agente etiológico da BI, pertence à ordem *Nidovirales*, família *Coronaviridae* e ao gênero *Coronavirus* e é o protótipo dessa família. Dentro do gênero *Coronavirus*, faz parte do grupo 3, conforme estabeleceu a classificação do ICTV (International Committee for the Taxonomy of Vírus), em 1993, a qual tomou como base as propriedades antigênicas e sorológicas, utilizando anticorpos poli e monoclonais, sendo que tais resultados foram posteriormente confirmados pelo seqüenciamento genômico dos sorotipos mais relevantes desse vírus (CAVANAGH, 2005). Deve-se esclarecer, ainda, que os grupos 1, 2, e 4 incluem coronavírus de

mamíferos, enquanto que o grupo 3 reúne coronavírus isolados de aves, como o VBI e outros geneticamente assemelhados a este mesmo vírus, ficando assim constituída: Coronavirus da bronquite infecciosa (VBI), Coronavirus dos perus (TCoV), Coronavirus de faisões (PhCoV), Coronavirus de gansos, Coronavirus de marrecos, Coronavirus de pombos e outros que ainda estão sendo estudados (CAVANAGH, et al., 1994, 1995; CAVANAGH, 2005, 2007).

2.3 Características estruturais

As partículas do VBI são pleomórficas, com aproximadamente 120 nm de diâmetro e apresentam um envelope lipoprotéico provido de projeções bem demarcadas (espículas - glicoproteína de S) e distribuídas por toda a superfície do vírion. Tais espículas possuem cerca de 20 nm de comprimento e são responsáveis pela aparência de coroa do virion á microscopia eletrônica (BOURSNEILL et al., 1987).

O VBI apresenta, ainda, quatro proteínas estruturais, que foram identificadas como a glicoproteína de espícula (S), a glicoproteína integral de membrana (M), a proteína pequena de membrana (E) e proteína fosforilada de nucleocapsídeo (N) (CAVANAGH, 2007).

A glicoproteína peplomérica S tem cerca de 1160 aminoácidos (174 KDa) e é clivada pós-traducionalmente em duas subunidades: amino-terminal S1(92 kDa) e carboxi-terminal S2 (84kDa), com cerca de 500 e 600 aminoácidos cada uma delas, respectivamente. A proteína S pode ser dimérica ou trimérica e é ancorada através da porção carboxi-terminal da subunidade S2, no envelope viral através de um pequeno segmento transmembrana hidrofóbico, formando o suporte da espícula, enquanto a subunidade S1 é globular e forma a parte do bulbo presente no ectodomínio dessa proteína (KANT et al., 1992; CAVANAGH, 2007).

Além das propriedades bioquímicas e estruturais acima explanadas, a subunidade S1 está envolvida com a infectividade viral e contém epítomos vírus-neutralizantes, os quais são constituídos por determinadas seqüências de aminoácidos que conferem a especificidade de sorotipo a cada estirpe do VBI e, ainda, apresenta sítios responsáveis pela atividade hemaglutinante do VBI (LAI; CAVANAGH, 1997; CAVANAGH, 1995). A glicoproteína S1 se caracteriza ainda por apresentar uma variabilidade acentuada em determinadas seqüências de aminoácidos de sua estrutura, fenômeno este que foi identificado quando se fez a comparação dessas proteínas

provenientes de diferentes estirpes européias e também de algumas delas pertencentes ao sorotipo Massachusetts (Mass) do VBI. Tais seqüências são denominadas de regiões hipervariáveis (HVR), tendo sido mapeadas 3 dessas regiões para a glicoproteína S1: a região HVR I, que é delimitada pelos resíduos 56-69 de aminoácidos, a região HVR II, compreendida entre os resíduos 117-131 de aminoácidos e a região HVR III, que se estende do resíduo 250 ao 386 de aminoácidos. Vários estudos têm demonstrado que todas essas três regiões estão diretamente associadas na interação com anticorpos vírus-neutralizantes e, por conseguinte constituem os determinantes sorotipo-específicos apresentados pelas diversas estirpes do VBI (CAVANAGH, et al., 1988; MOORE et al., 1998).

Em adição as propriedades acima relatadas, a glicoproteína S tem duas outras funções conhecidas, isto é, atua na fixação e na fusão da membrana do vírus com a membrana das células do hospedeiro, o que contribui para a liberação do genoma viral para o interior da célula infectada. Sabe-se que, nesse processo a subunidade S1 é responsável pela fixação do vírus à célula, enquanto que a S2 media a fusão do envelope viral à membrana citoplasmática. No tocante a este importante mecanismo que ocorre logo no início da infecção celular, ainda não se conseguiu definir qual a localização e a composição de aminoácidos presentes no domínio de ligação ao receptor para S1 do VBI, nem a identidade exata do receptor celular, nesse caso, envolvido (CAVANAGH; NAQI, 2003; LAI; CAVANAGH, 1997). No entanto, especula-se, atualmente, que a habilidade de o VBI se replicar predominantemente em células epiteliais de diferentes superfícies mucosas, pode ser em parte relacionada ao fato de que a adsorção do vírus nessas células do organismo hospedeiro, seja dependente do ácido N-acetil neuramínico (ácido siálico). Ademais, essa substância é relativamente abundante na membrana dessas mesmas células e, ainda, foi verificado que a adsorção do VBI se processa preferencialmente quando a ligação covalente da molécula de ácido neuramínico com o restante da molécula de oligossacarídeo da membrana citoplasmática é do tipo $\alpha 2,3$ (SCHULTZE et al., 1992).

A proteína de nucleocapsídeo (N) é constituída por aproximadamente 420 aminoácidos e se localiza na parte mais interna do vírion, encontrando-se diretamente associado com o RNA genômico viral (ribonucleoproteína RNP). Além disso, foi relatado que tal proteína exerce, durante o ciclo de infecção intra-celular, um papel importante nos processos de replicação e montagem de novas partículas do VBI (COLLISON et al., 1992; SAPATS et al., 1996). Está também envolvida na indução de

respostas imunes cito-mediadas de proteção, uma vez que contém em sua estrutura epítomos para a interação com células T citotóxicas específicas, as quais contribuem decisivamente para a restrição da disseminação da infecção pelo VBI dentro do organismo hospedeiro (SEO et al., 1997). Nesse sentido, os resíduos de aminoácidos presentes na porção carbóxi-terminal da proteína N se revelaram críticos para a indução de células T citotóxicas efetoras contra esse patógeno viral e, em adição a isso, foram reconhecidos outros importantes epítomos dessa mesma proteína para a interação com o MHC de classe II e com os linfócitos T auxiliares (BOOTS et al., 1991).

Duas outras proteínas estruturais foram também descritas e caracterizadas, como é o caso da glicoproteína de membrana (M) e da proteína não glicosilada de membrana (E). Assim, foi constatado que todos os coronavírus possuem um grande número de cópias de uma pequena glicoproteína integrada à membrana, a proteína M, com aproximadamente 230 aminoácidos. Além dela, foi detectada, de forma associada ao envelope viral, uma baixa quantidade de uma outra proteína de pequeno peso molecular, com cerca de 100 aminoácidos e não glicosilada; a proteína de membrana E. Essas duas proteínas adicionais de envelope (M e E) revelaram ser importantes para formação da partícula viral, tendo sido demonstrado que a proteína S interage, durante a montagem de novos vírions, com a região transmembrana da proteína M (LAI; CAVANAGH, 1997).

As proteínas M e N contêm, via de regra, epítomos mais conservados, os quais constituem os antígenos grupo-específicos do VBI. Embora tenha sido evidenciado que a proteína N apresente composição de aminoácidos bastante conservada dentro de um dado sorogrupo desse vírus, ela pode apresentar variabilidade relativamente elevada entre estirpes ou isolados pertencentes a diferentes soro-grupos de coronavírus. Nesse sentido, foram encontradas modificações significativas, tanto no que concerne ao tamanho como à composição de aminoácidos dessa proteína quando se comparou o gene codificador da proteína N dos principais sorogrupos desse mesmo vírus (WILLIAMS et al., 1992).

É correto então, afirmar que os *Coronavírus* aviários guardam grande similaridade entre si do ponto de vista estrutural, morfológico e genético, tornando-os distintos (Grupo 3) dos demais grupos da Família *Coronaviridae* (1, 2 e 4), principalmente em razão das seqüências de nucleotídeos de determinados genes, da composição protéica, da disposição dos diferentes epítomos e dos pontos de clivagem dos aminoácidos que compõem estes epítomos.

2.4 Organização do genoma

O VBI foi o primeiro coronavírus a ser completamente sequenciado. O seu genoma é um dos maiores entre os RNA-vírus e tem cerca de 27,6 Kb de comprimento sendo constituído por uma molécula de RNA, não segmentado, de fita simples e sentido positivo (RNA genômico tem a função de RNA mensageiro, é infectante). É organizado em 6 regiões principais, cada uma delas contendo uma ou mais janelas de leitura (“open reading frames” - ORF’s), as quais são separadas por sequências intergênicas (IG) que possuem sinais para a transcrição de RNAs mensageiros subgenômicos específicos (LAI; CAVANAGH, 1997).

Os principais genes se distribuem no genoma do VBI, sendo que estão organizados da extremidade 5’ para a 3’, da seguinte maneira: (1-) gene codificador da RNA Polimerase, ocupando quase 2/3 de todo o genoma viral e com duas ORF’s (“open reading frame” – janela aberta de leitura, ORF1a e ORF1b) sobrepostas; (2-) gene codificador da glicoproteína S (gene 2), (3-) gene codificador da proteína E (gene 3), que é constituído por três ORF’s, as quais codificam as proteínas 3a, 3b e 3c, onde 3c, sendo que esta última é a proteína E; (4-) gene codificador da glicoproteína M (gene 4); (5-) gene 5, que é a região codificadora de duas proteínas não estruturais; a 5a e a 5b e, finalmente, (6-) gene codificador da nucleoproteína N (gene 6). Ainda, junto a cada uma das extremidades 5’ e 3’ encontram-se duas sequências não traduzidas (“Untranslated region” – UTR) com cerca de 500 nucleotídeos cada uma delas (LAI; CAVANAGH, 1997; CAVANAGH, 2007).

Ainda dentro de propriedades relacionadas ao genoma dos coronavírus, verifica-se que o fenômeno de recombinação é de ocorrência bastante comum entre esses vírus, o qual é precipitado quando uma mesma célula é co-infectada por duas estirpes diferentes de uma dada espécie desses vírus de tal sorte que a progênie gerada pode ter o seu genoma constituído por sequências de nucleotídeos derivadas de cada uma das estirpes parentais (CAVANAGH, 2007). A recombinação entre regiões do genoma de estirpes do VBI foi experimentalmente demonstrado (JIA et al., 1995; KOTTIER; CAVANAGH, 1995) e, além disso, dados advindos do sequenciamento de nucleotídeos de determinados genes de várias estirpes de campo desse mesmo vírus têm fornecido evidências claras que a grande maioria das estirpes do VBI, em seu processo natural de evolução e, em presença ou não, de mecanismos de pressão seletiva, sofrem

recombinações e são, por conseguinte, recombinantes (CAVANAGH; COOK, 1992, JIA et al., 1995; WANG, 1993; WANG et al., 1994).

2.5 Replicação

A replicação do VBI ocorre inicialmente nas células ciliadas da mucosa das vias aéreas superiores e em células secretoras de muco, embora na continuidade do processo infeccioso células epiteliais de outros órgãos poderão ser infectadas (DHINAKAR RAJ; JONES, 1997). O vírus adere e funde-se através da proteína S1 aos receptores específicos da membrana citoplasmática das células alvo. O ciclo de replicação ocorre inteiramente no citoplasma das células hospedeiras infectadas. Nesse processo, o RNA genômico se liga aos ribossomos para sintetizar a enzima RNA polimerase-RNA dependente, sendo que o RNA genômico é transcrito por esta enzima para formar uma fita negativa de RNA complementar. A fita negativa de RNA serve como molde para a síntese de um novo RNA genômico e dos RNAs mensageiros subgenômicos (RNArng). Os RNArng são produzidos por um dos mecanismos de transcrição descontínuo (leader-priming), os quais passam a funcionar como replicons e podem gerar genomas recombinantes. A produção de tais RNAs se constitui em uma das características marcantes da família *Coronaviridae* (LAI; CAVANAGH, 1997).

A tradução de cada RNAm vírus específico produz apenas um peptídeo que é codificado no final 5' do RNAm. A proteína de nucleocapsídeo (N) e as proteínas não estruturais são sintetizadas em polissomos na matriz citoplasmática. A síntese das glicoproteínas S e M ocorre em polissomos ligados ao retículo endoplasmático rugoso (RER). A glicoproteína S é inserida co-traducionalmente para o interior das membranas do RER e aí ocorre a glicosilação na cadeia crescente de polipeptídeo. A proteína S é então transportada do complexo de Golgi para a membrana citoplasmática e cerca de dois a três glico-peptídeos S constituem a espícula. A glico-proteína M também é sintetizada em polissomos ligados à membrana do RER, sendo depois transportada para o Complexo de Golgi, onde se acumula e não para a membrana plasmática (TOMLEY et al., 1987).

O nucleocapsídeo helicoidal do VBI é formado no citoplasma das células infectadas através da interação dos RNAs genômicos recém-formados e a proteína de nucleocapsídeo N. O nucleocapsídeo tem uma certa flexibilidade e é fracamente espiralado e suas dimensões são provavelmente determinadas pelas propriedades da

ligação de N (SIDEELL, 1983). O brotamento das partículas virais ocorre nas membranas do Complexo de Golgi e do RER. No sítio de brotamento, as fitas de nucleocapsídeos se alinham em arranjos ordenados junto à superfície citoplasmática dessas membranas, em áreas que possuem as glicoproteínas virais M e S e é principalmente mediada pelas interações entre as proteínas N e M (STURMAN; HOLMES, 1983). As partículas virais com nucleocapsídeo são liberadas no lúmen do RER e do Complexo de Golgi e, neste último caso, depois da passagem por esta organela os vírions são transportados em vesículas que migram para a periferia da célula. Essas vesículas se fundem com membrana citoplasmática na periferia da célula liberam numerosas partículas virais (LAI; CAVANAGH, 1997).

Decorridas três a quatro horas do início da infecção começam a ser liberados quantidades apreciáveis de partículas virais das células infectadas, sendo que muitos vírions adsorvem-se à membrana citoplasmática e, deste local, podem interagir e estimular os diversos mediadores celulares do sistema imune. Essa característica dos coronavírus de serem liberados das células infectadas sem que ocorra a lise dessas mesmas células, parece ser um dos fatores responsáveis pela infecção persistente que este vírus pode estabelecer nos organismos hospedeiros (OSHIRO, 1973). No entanto, este fenômeno só foi cabalmente demonstrado para alguns isolados nefrotrópicos (CHONG; APOSTOLOV, 1982) e enterotrópicos do VBI (DHINAKAR RAJ; JONES, 1997). Ainda, foi verificado que o nível máximo de geração de novas partículas virais durante o ciclo de replicação dos coronavírus ocorre geralmente após 12 horas do início da infecção (CAVANAGH; NAQI, 2003).

2.6 Patogenia do VBI

O VBI infecta inicialmente o trato respiratório superior e, preferencialmente as células ciliadas e secretoras de muco desse sistema (DHINAKAR RAJ; JONES, 1997). O título infectante viral atinge valores máximos nas mucosas do nariz e traquéia, aos três dias após o início da infecção; permanecendo nesses patamares por mais dois a cinco dias (HOFSTAD; YODER, 1996). Com relação à capacidade de o VBI infectar outros órgãos do trato respiratório, estudos revelaram a presença de títulos virais similarmente elevados, nos pulmões e nos sacos aéreos (CAVANAGH, 2007).

Apesar de a nomenclatura do VBI sugerir que se trata de um patógeno apenas do trato respiratório, este vírus, além de se replicar em tecidos e órgãos desse sistema

(nariz, traquéia, pulmão e sacos aéreos), e causar lesões proeminentes nesses tecidos ou órgãos; os quais funcionam também, como porta de entrada para esse agente, apresenta também tropismo e patogenicidade para muitos outros tipos de células epiteliais, incluindo as que estão presentes na constituição dos rins, das células do oviduto ou dos testículos e muitos outros tipos celulares do trato gastro-intestinal, que constituem, por exemplo, o esôfago, o proventrículo, o duodeno, o jejuno, a bursa de Fabrício, as tonsilas cecais, o reto e a cloaca (CAVANAGH, 2005). Infecções de tecidos entéricos geralmente não se manifestam clinicamente e patologicamente, não obstante quadros de proventriculite ou enterite podem ser desencadeados por determinadas estirpes do VBI (YU et al., 2001; CAVANAGH, 2005, 2007). Por outro lado, algumas estirpes do VBI são predominantemente nefropatogênicas, isto é, quando inoculadas em pintinhos de um dia de idade, reproduzem experimentalmente um quadro franco de nefrite, que culmina em elevada mortalidade. Alternativamente a esses patótipos do VBI, foram descritas algumas outras estirpes com uma predileção mais acentuada para replicação em tecidos gonadais, onde desencadeiam lesões e comprometimento do funcionamento normal desses órgãos, especialmente de ovários, ovidutos e de testículos (COOK et al., 2001; LI; YANG, 2001; PENSART et al., 1994).

Dessa forma, ficou claramente demonstrado que as consequências mais deletérias da bronquite infecciosa são de elevada relevância, pelo fato de que, no curso dessa enfermidade, são geradas lesões significantes nos sistemas respiratórios, urinário e reprodutor de aves de todas as idades, as quais podem causar severas perdas econômicas à indústria avícola. (CAVANAGH; NAQI, 2003; CAVANAGH, 2007).

2.7 Variabilidade genética e fenotípica entre estirpes do VBI

De maneira semelhante à maioria dos vírus RNA, os *Coronavírus* têm uma alta frequência de mutação a qual decorre principalmente dos mecanismos de falhas de correção (“proof-reading”) da enzima RNA-polimerase, bem como pelo fato de a transcrição do RNA genômico ser descontínua nos coronavírus e se processar em “saltos” (LAI, 1992). A evolução do VBI é um fenômeno relativamente freqüente, em virtude da alta capacidade de variabilidade genética desse vírus, o que se traduz pelo aparecimento de alterações genéticas marcantes especialmente nos genes codificadores das proteínas estruturais S e N e, em menor escala, das proteínas não estruturais ou até mesmo em regiões não codificadoras (UTRs). Essas alterações genéticas acarretam

mudanças relevantes nas características fenotípicas, como por exemplo, nas propriedades antigênicas e naquelas associadas à virulência e/ou à patogenicidade desse mesmo agente infeccioso. Para ilustrar melhor as consequências da grande variabilidade que ocorre entre as estirpes do VBI, já foram descritos, em diversas partes do mundo, mais do que 20 sorotipos desse vírus (CAVANAGH; NAQI, 2003; CAVANAGH et al., 1992; GELB et al., 1991; KUSTERS et al., 1989).

Um aspecto interessante a ser considerado com relação à variabilidade que atinge os coronavírus é o modelo proposto para explicar os mecanismos de evolução por que passam esses vírus. Assim, considera-se que o modelo que melhor se ajusta nesse caso é o de evolução episódica, o qual pressupõe que o relógio molecular é acelerado durante determinados períodos de alterações ambientais negativas que atuam sobre as gerações parentais desses vírus, fazendo com que as populações das progênes evoluam em pequenos passos durante um reduzido intervalo de tempo (BARIC et al., 1997). A consequência mais imediata disso é a geração de uma população, que genética e fenotipicamente difere da inicial. Um outro ponto a se considerar aqui, refere-se ao fato de que os coronavírus apresentam um tempo de geração muito rápido juntamente com taxas de mutação ao redor de 10^{-4} e de recombinação de 20% e, ainda, caracterizam-se pela geração de uma progênie viral de grande dimensão, o que favorece a ocorrência de enorme variabilidade genética nessa geração filha. Esta, por sua vez, sofre um processo seletivo no qual o resultado não é a seleção de um genótipo único, mas sim de uma população heterogênea de variantes geradas por erros na replicação de uma variante mais freqüente. Todo este processo culmina então na formação, ou em uma amostra clínica, ou em uma suspensão viral propagada em laboratório, de um conjunto de genomas, sendo que um deles é o predominante, e para esse tipo de situação se aplica a denominação de *quasiespécies* (BARIC et al., 1997; ROTTIER, 1999; MOYA et al., 2000).

No contexto das consequências da grande variabilidade dos coronavírus aviários, deve ser ressaltado que as perdas econômicas mais significantes infringidas por este vírus à produção avícola mundial, estão mais diretamente relacionadas ao aparecimento de novos sorotipos ou variantes desse mesmo vírus, que antigênica e geneticamente são distintas das estirpes selvagens e vacinais. A propósito disso, tem sido demonstrado que o uso de vacinas contra a BI não tem impedido o aparecimento freqüente de novos sorotipos e de estirpes variantes do VBI (GELB, 1991). Portanto, diferentes sorotipos e variantes antigênicas são gerados no curso da evolução do VBI e as principais

alterações presentes nesses vírus, estão associadas principalmente à glicoproteína S1, a qual possui importantes epítomos os quais são alvos da vírus-neutralização. Tal mecanismo imune se constitui em uma das principais pressões seletivas exercidas pelo hospedeiro e se refletirá em uma maior variação genética e/ou antigênica sobre esse marcador genotípico e fenotípico (glicoproteína S1), de forma que nesse processo evolutivo, ocorrem diferenças progressivamente maior, sendo que os genótipos/sorotipos variantes afastam-se cada vez mais do genótipo/sorotipo parental original.

Em face de toda a explanação acima, é fácil constatar que a eficácia do monitoramento da diversidade genética de estirpes do VBI é, a priori, dependente da análise molecular do gene codificador da glicoproteína S1 (BAYRY et al., 2005; BAYRY et al., 1986; KANT et al., 1992; WANG et al., 1994).

No entanto, é necessário considerar que, em adição ao relevante papel biológico e à proeminente variabilidade que atinge o gene S1, é reconhecido também que a proteína de nucleocapsídeo do VBI e, especialmente a sua porção carbóxi-terminal, estão envolvidos em atividades biológicas importantes durante o desenvolvimento da patogenia e dos mecanismos efetores de imunidade mediados por esse vírus. Nesse sentido, vários estudos interessantes puseram em evidência a participação da proteína N ou da sua porção C-terminal na indução de respostas mediadas por células T citotóxicas, uma vez que há epítomos específicos para o reconhecimento dependente de moléculas do complexo principal de classe I (MHC-I) por linfócitos T citotóxicos. Tais células atuam de forma a promover uma redução significativa da carga viral, em aves infectadas experimentalmente, conferindo, conseqüentemente, imunidade específica protetora em aves convalescentes ou vacinadas (SEO; COLLISON, 1997; SEO et al., 1997).

Embora o gene N tenha a composição de suas seqüências de nucleotídeos bem mais conservadas do que o gene S1, quando se comparam diferentes estirpes / sorotipos do VBI (WILLIAM et al., 1992), resultados de estudos mais recentes mostraram que podem ser encontradas múltiplas diferenças em algumas regiões desse mesmo gene proveniente de isolados do Brasil, da Coréia e da Itália (ABREU et al., 2006; BOCHKOV et al., 2006; PARK et al., 2005).

Pode-se concluir, então, que tanto o gene S1 como o gene N do VBI e seus respectivos produtos peptídicos são detentores de importância biológica e epidemiológica na BI; notadamente no que concerne à realização estudos mais acurados e efetivos para procurar estabelecer relações entre a variação genética e a variação

antigênica ou da capacidade de indução de respostas imunes de proteção cruzada para esse mesmo vírus.

2.8 Princípios usados na classificação das estirpes do VBI

O VBI foi o primeiro coronavírus a ser descrito (SCHALK; HAWN, 1931) e muitas estirpes variantes com mais ou menos virulência, sorotipos e patotipos têm sido identificados (CAVANAGH, 2005, 2007). A tipagem do VBI é importante para a implementação de medidas mais efetivas de controle; em especial no que diz respeito à imunoprofilaxia, ou então com o propósito de pesquisa e para um melhor entendimento da epidemiologia e evolução dos VBI (De WIT, 2000).

Assim sendo, o sistema de classificação das estirpes do VBI pode ser dividido, com base na abordagem de procedimentos / análises, em dois grupos principais: (1-) os testes funcionais, os quais procuram avaliar importantes propriedades ou funções biológicas de uma estirpe ou isolado desse vírus e (2-) os testes não funcionais, que buscam investigar e caracterizar o genoma viral. A classificação feita através de testes funcionais, resulta na identificação de diferentes patotipos, protectotipos e tipos antigênicos do VBI. Por outro lado, a classificação das estirpes do VBI baseada na caracterização do genoma, resulta em genotipos virais. (De WIT, 2000; CAVANAGH, 2005).

O patotipo é definido, essencialmente, por dois principais parâmetros, ou seja, o tropismo de uma estirpe do VBI por um tipo particular de células ou de tecidos, ou ainda de órgãos e pelas lesões predominantes que são induzidas por esse mesmo vírus no organismo hospedeiro natural. Ainda, deve ser considerado nesse último caso que, algumas vezes, a replicação desse vírus em um dado tipo celular ou tecidual, não desencadeia alterações patológicas significantes (CAVANAGH; NAQI, 2003; CAVANAGH, 2005).

Quando as estirpes do VBI são agrupadas em protectotipos são obtidos dados a respeito da eficiência de uma determinada formulação vacinal desse mesmo vírus e também se consegue determinar qual é a estirpe com maior capacidade de induzir efetiva proteção cruzada contra cada uma nova estirpe ou isolado de campo, caracterizando, assim, o protectotipo desse novo vírus. A tipagem antigênica faz a caracterização do sorotipo ou do “epitotipo” de uma dada estirpe viral, usando

respectivamente anticorpos vírus-específicos policlonais ou monoclonais, respectivamente (De WIT, 2000).

Os principais métodos de genotipagem usados para o VBI, incluem a detecção de genótipo-específico de parte do genoma viral, através da reação de RT-PCR, o seqüenciamento de nucleotídeos ou a determinação da posição de sítios de clivagem de enzimas de restrição em um gene relevante desse vírus, o que é feito através da técnica de polimorfismo dos tamanhos de fragmentos de restrição (“restriction fragment length polymorphism - RFLP) (De WIT, 2000).

2.9 Diagnóstico laboratorial do VBI

No que concerne ao diagnóstico laboratorial da BI, verifica-se que o mesmo depende principalmente da adoção de técnicas de isolamento e de identificação genômica ou fenotípica (sorotipos, epito-tipos, protectotipos e patotipos) do vírus, e/ou da detecção de anticorpos específicos para esse vírus, que são produzidos pelos organismos hospedeiros infectados¹. Nesse sentido, deve ser salientado que várias técnicas laboratoriais têm sido propostas e usadas para monitorar os fenômenos de variação que ocorrem com elevada frequência no curso da evolução entre as estirpes do VBI.

Assim, os ensaios de proteção ao desafio e de inibição de hemaglutinação (HI), historicamente importantes, podem ser usados para monitorar esse tipo de variabilidade, possibilitando a classificação das estirpes em diferentes sorotipos. A primeira técnica empregada foi a vírus neutralização (VN) em ovos embrionados. Essa metodologia tem como desvantagens: a necessidade de adaptação do vírus ao sistema de cultivo, a infectividade do vírus é baseada no encontro de lesões no embrião e é necessário uma grande quantidade de ovos para a realização dos testes (COWEN; HITCHNER, 1975). Ademais, deve-se considerar que passagens sucessivas do vírus necessárias para a adaptação do vírus à propagação em ovos embrionados, podem provocar alterações em suas características genéticas e antigênicas (OTSUKI et al., 1982). O método de cultivo do VBI em anéis de traquéia de embriões de galinha não requer adaptação prévia desse vírus, porém a dificuldade reside no processo de preparação dos anéis (CHERRY; TAYLOR-ROBINSON, 1970). Outro método interessante para avaliação da infectividade *in vivo* é a determinação de ciliostase em anéis de traquéia de pintinhos inoculados experimentalmente, seguido da avaliação histopatológica (DARBYSHIRE,

et al., 1980). O teste de HI também pode ser usado com esse propósito porque consegue fazer a diferenciação antigênica das amostras do VBI. Contudo, essa técnica necessita de antissoros monoespecíficos, produzidos, via de regra com uma ou no máximo duas imunizações, sendo que é difícil conciliar bons títulos e especificidade dos anticorpos HI, pois imunizações seguidas induzem a produção de anticorpos que reagem cruzadamente com maior intensidade (BROWN; BRACEWELL, 1985).

Outros métodos utilizados para o diagnóstico da BI, através da detecção direta do vírus ou de seus componentes antigênicos, incluem a Microscopia Eletrônica, as reações de Imunofluorescência, Imunodifusão em Gel de Ágar, Imunoperoxidase e ensaios imunoenzimáticos (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay-ELISA) (De WIT, 2000; CAVANAGH; NAQI, 2003).

Contudo, todos esses procedimentos acima descritos são onerosos e demorados, havendo a necessidade de que novos métodos sejam desenvolvidos e aplicados para fazer de maneira mais precisa e rápida a identificação das variantes epidemiologicamente mais relevantes do VBI (CAVANAGH; NAQI, 1997).

Para fazer frente a essas dificuldades, os métodos de biologia molecular têm sido desenvolvidos, servindo, em síntese, para fazer o diagnóstico direto e/ou a genotipagem do VBI. Dentre esses métodos destacam-se a Transcrição Reversa e a Reação em Cadeia da Polimerase (RT-PCR) (ANDREASEN et al., 1991; JACKWOOD et al., 1992) a análise de fragmentos genômicos gerados por enzimas de restrição (RFLP) (KWON, et al., 1993; LIN, et al., 1991) e também o seqüenciamento de nucleotídeos dos genes mais importantes desse patógeno viral. Ainda, com relação ao VBI, a aplicação da técnica de RT-PCR, seguida do seqüenciamento de nucleotídeos do genoma viral demonstraram a ocorrência freqüente de mutações em certas regiões do gene S e, em menor extensão do gene N e ainda o aparecimento de estirpes com genomas recombinantes (ANDREASEN et al., 1991; JACKWOOD et al., 1992; YU et al., 2001).

A confirmação presença do VBI em amostras clínicas através de métodos baseados no ácido nucléico pelas

Quanto ao diagnóstico laboratorial do VBI, constata-se que as técnicas RT-PCR têm sido aplicadas diretamente de material infectado ou após a amplificação preliminar do vírus em ovos embrionados. Handberg (1989) usou 40 ciclos por PCR para detectar o gene da proteína N do VBI, extraído de tecido traqueal após infecção experimental em

galinhas. Jackwood (1997) usou swab traqueal em outro experimento no qual as aves foram infectadas com as estirpes M41 ou Arkansas do VBI. A RT-PCR foi usada para amplificar um produto de 1.7Kb, contendo parte do gene da proteína S, mais especificamente S1, através da análise de RFLP. A estirpe M41 não foi detectada, porém a estirpe Arkansas foi detectada em 3, 4 e 5 dias após a inoculação, porém, não antes ou após esse tempo. Nested –PCR, na qual alguns dos DNA produzidos na primeira PCR são usados na segunda PCR usando dois oligos nucleotídeos adicionais, são consideravelmente mais sensíveis do que uma simples reação de PCR. O genótipo do VBI pode ser determinado também através do uso de oligonucleotídeos genótipo-específico ou através do seqüenciamento do produto de PCR. PCR (CAVANAGH; NAQI, 2003). Yu et al. (2001), desenhou oligonucleotídeos de duas regiões conservadas que flanquearam as regiões de HVR 1 e HVR 2 do gene S1 e pelos métodos de RT-PCR e seqüenciamento direto, foram usados para genotipar isolados do VBI coletados da China e Ásia.

Vários outros trabalhos, abordando a amplificação pelo método de RT-PCR ou de nested-RT-PCR para diferentes regiões gênicas alvo, seguidas ou não pelas técnicas de RFLP e de sequenciamento de nucleotídeos, têm sido reportados como eficientes e mais vantajosos de serem usados em comparação com os métodos convencionais de isolamento viral ou de detecção/identificação de antígenos específicos, que, via de regra, são mais onerosos ou requerem mais tempo para a sua execução.

2.10 Controle da bronquite infecciosa

As medidas que têm sido mais amplamente adotadas para o controle da BI fundamentam-se na combinação de abordagens básicas de biossegurança (isolamento, lotes próximos com idade uniforme, limpeza, desinfecção e vazio sanitário) juntamente com programas imunoproláticos elaborados em conformidade com as condições específicas de cada região ou país.

As vacinas vivas empregadas têm na sua composição estirpes atenuadas de VBI, sendo que a atenuação é feita por meio de múltiplas e seriadas passagens em ovos embrionados de galinha, podendo ser ou não clonadas em cultivo primário de células de embrião de galinha. Já, as vacinas inativadas podem conter as mesmas estirpes de VBI usadas nas vacinas atenuadas, exceto que as suspensões virais são nesse caso tratadas

com agentes químicos inativantes e são acrescidas de adjuvantes (emulsões oleosas), ou alternativamente, podem ser formuladas com estirpes patogênicas desde que submetidas ao mesmo tratamento inativante. Essas últimas preparações são mais recomendadas para uso regional ou autóctone. Ainda as vacinas vivas se destinam mais ao uso em jovens ou período de crescimento (frangos de corte, poedeiras e reprodutoras em fase de recria) em uma ou duas administrações intervaladas de 20-30 dias, devendo ser aplicadas preferencialmente por meio de aerossol a um grande número de aves. As vacinas inativadas oleosas se destinam mais ao uso em aves de ciclo longo de vida, como galinhas de postura e reprodutoras e devem ser aplicadas de um a dois meses antes da puberdade e se recomenda que sejam administradas após a aplicação prévia de vacinas atenuadas (CAVANAGH; NAQI, 2003).

No Brasil, a vacinação contra a BI tem sido feita desde o início da década de 80, sendo que as estirpes que têm o seu uso liberado pelo Ministério da Agricultura e Abastecimento (Portaria Ministerial nº 24/80, de 17 de janeiro de 1980 – Aprova as normas para o controle e o emprego de vacinas na composição de vacinas contra a bronquite infecciosa das aves) para entrarem na composição de vacinas, são a H120, H90 e H52 (o “H” vem de “Holland” e os números representam a quantidade de passagens no sistema indicado de propagação), as quais são atenuadas por passagens seriadas em ovos embrionados de galinha, ou, alternativamente, estirpes naturalmente apatogênicas e clonadas (por ex. Ma5). Convém ressaltar que todas pertencem ao sorotipo Massachusetts (ABREU, 2000; VILLA, 1998). No caso das estirpes “Holland”, quanto maior o número de passagens, maior o grau de atenuação das mesmas, mas independentemente do grau de atenuação, foi verificado que essas estirpes podem provocar lesões nos rins de variadas intensidades (WINTERFIELD; ALBASSAM, 1984).

Um aspecto curioso no que se refere à definição das estirpes com uso liberado para a produção de vacinas em nosso país é que a opção por parte do Ministério da Agricultura e Abastecimento foi feita com base na literatura científica internacional daquela época (1980) que destacava que as estirpes do sorotipo Massachusetts, eram capazes de conferir uma resposta imune maior e mais ampla, inclusive com relação a algumas estirpes pertencentes a outros sorotipos (RESENDE, 1983; SILVA, 1989).

É importante salientar que vários países fazem uso, além das estirpes do sorotipo Massachusetts, de outras pertencentes a sorotipos diferentes, tais como Connecticut, Arkansas, 7/91 (793/B), dentre outros, o que configura uma situação de maior risco para

a emergência de variantes que escapam da cobertura imune conferida por esses tipos de vacinas. Dessa forma, quando as vacinas formuladas com essas estirpes de diferentes sorotipos do VBI são aplicadas concomitantemente em um mesmo plantel avícola ou região de criação mais intensiva, esses vírus sofrem recombinação de seus genomas entre si, ou até mesmo de seus genomas com aqueles pertencentes às estirpes que estão circulando no campo, contribuindo assim, para o surgimento de surtos da doença causados por estirpes variantes naqueles lotes que haviam sido vacinados (CAVANAGH; NAQI, 2003; De WIT et al., 1998; JIA et al., 1995; WANG; TSAI 1996; WU et al., 1998).

2.11 Dados epidemiológicos, imunológicos e moleculares sobre o VBI no Brasil

Desde a descrição do primeiro isolamento do VBI no Brasil por Hipólito (1957), o qual foi realizado a partir de amostras colhidas de aves acometidas de problemas respiratórios, verifica-se que este vírus tem sido continuamente isolado de casos suspeitos de BI, em várias regiões do país e tem sido associado com diversos tipos de manifestações patológicas, além daquela tipicamente respiratória, tais como, síndrome nefrite-nefroze, produção de ovos defeituosos, queda de postura, problemas de fertilidade de machos e miopatia peitoral (HIPÓLITO et al., 1979; Di FABIO et al., 2000; ITO, 2006; VILLARREAL, 2007).

Estudos sistemáticos e abrangentes sobre a detecção e a caracterização de isolados do VBI no Brasil não têm sido conduzidos. Entretanto, no período entre 1985 e 1986, foi realizado uma das primeiras investigações mais amplas abrangendo 78 granjas de frangos de corte localizadas no estado de Minas Gerais. Nesse estudo se fez um levantamento sorológico de vários agentes infecciosos virais e bacterianos, incluindo o VBI, tendo sido evidenciada a presença de aves soro-positivas a esse vírus no teste de imunodifusão em 30 granjas, sendo que apenas 12 delas faziam uso de vacinas contra BI. Em decorrência destes resultados foi feita uma nova pesquisa com o objetivo de fazer o isolamento do VBI das granjas onde foram identificadas aves soro-positivas (JORGE et al., 1992).

Alguns dos VBI isolados na investigação acima foram de início submetidos a estudos para a caracterização antigênica e da patogenicidade, tendo sido demonstrado que tais vírus eram capazes de provocar lesões respiratórias, mas não renais em pintinhos neonatos (RESENDE et al., 1989) e, ainda, foi verificado que, na técnica de

soro-neutralização em anéis traqueais, esses mesmos vírus apresentavam relações antigênicas maiores com o sorotipo Massachusetts (EPIPHANIO, 1998). Em período mais recente uma parte desses mesmos isolados de VBI tiveram os seus genes S1, S2 e N analisados por técnicas de RT-PCR, RFLP e, em alguns casos foi feito inclusive o sequenciamento de nucleotídeos, tendo sido encontrados 6 deles com características diversas das apresentadas pelas estirpes de referência M41/H-52, Arkansas e Connecticut, enquanto que nove apresentaram-se indistintos do genótipo Massachusetts; no que se refere às estirpes M41, H52 ou H-120 desse genótipo (SANTIAGO et al., 2000; ABREU et al., 2006a,b).

Ainda, em meados da década de 80 foi reportado o isolamento, no Brasil, de VBI com características antigênicas similares ao sorotipo Arkansas (BRANDEN et al., 1986) e, no início da década de 90, Wentz (1992) demonstrou, por meio da técnica de soro-neutralização cruzada, que havia isolados brasileiros oriundos dos estados do Paraná e de Santa Catarina, com características sorológicas bem distintas daquelas das estirpes de referência e relacionadas a sorotipos como Massachusetts (M41), Arkansas e Connecticut.

Dentro da mesma linha de investigação acima explanada, Di Fabio et al. (2000) estudaram, através da técnica de vírus-neutralização cruzada em cultura de anéis traqueais, um grupo de 15 isolados do VBI obtidos a partir de amostras colhidas de aves apresentando diferentes quadros clínico-patológicos e que eram mantidas em um universo de 126 granjas de produção avícola comercial. A maior parte dessas granjas estava situada nos estados do Paraná, Santa Catarina e São Paulo e um número menor nos estados do Rio de Janeiro e da Bahia e, em adição a isso, a maioria delas estava voltada à produção de frangos de corte, embora houvesse algumas dedicadas à criação de aves de postura ou de matrizes. Os resultados da análise antigênica desses isolados revelaram que, apenas um desses quinze vírus, apresentava relações mais próximas com o sorotipo Massachusetts, ao passo que os quatorze vírus restantes tiveram que ser classificados em no mínimo 4 grupos antigênicos distintos daqueles já descritos em outros países e que constituíam os sorotipos de referência mais conhecidos do VBI e, inclusive, a maior parte deles era usada na formulação de vacinas contra a BI.

Um aspecto intrigante a respeito dos quatorze isolados acima, bem como de alguns isolados mais novos do VBI é que embora tenham sido relacionados a sorotipos desse vírus diferentes dos convencionais; quando eles foram submetidos à caracterização de protectotipo, foi constatado que as estirpes vacinais do sorotipo

Massachusetts (Ma5, H120) ou 4/91 (793/B) foram capazes de conferir graus medianos a elevados de proteção cruzada (50 a 100%) contra tais vírus (COOK et al., 1999; Di FABIO et al., 2000).

No Brasil, a presença de um número significativo de variantes genéticas do VBI, com características distintas das estirpes de referência de outros países da América, Europa, Ásia e Oceania, tem sido relatado com uma frequência bastante elevada desde o ano 2000.

Dentro desse contexto, deve-se destacar que Montassier et al. (2006), ao analisar as sequências de nucleotídeos da extremidade 5'-proximal da glicoproteína S1 de 12 amostras isoladas entre 1988 e 2000 de granjas comerciais, localizadas nas regiões sul e sudeste, de plantéis constituídos por frangos de corte ou aves de postura e apresentando sinais clínico-patológicos de acometimento do trato respiratório e/ou renal, encontrou perfis filogenéticos que permitiram a classificação desses vírus em cinco grupos diferentes. O primeiro desses grupos reuniu cinco dos isolados ao genótipo Massachusetts. Foram também identificados dois isolados com características do genótipo Arkansas / Jilin e um outro deles similar ao genótipo Connecticut. O mais interessante, entretanto, é que dos quatro vírus remanescentes, dois deles formaram um clado distinto sem relação com nenhum outro genótipo conhecido do VBI, enquanto que dois outros isolados não compartilhavam características gênicas com as estirpes de referência de outras partes do mundo, mas sim elas constituíram um grupo junto com amostras brasileiras do VBI que haviam sido isoladas de frangos de corte e aves de postura com quadros de enterite e que haviam tido essa mesma região do gene S1 sequenciada e depositada no "Gene Bank" (VILLARREAL, 2007), formando, assim, um conjunto de estirpes autóctones do Brasil.

Em adição a isso, Abreu et al. (2006), após a análise de uma parte do gene S de 16 isolados do VBI de granjas comerciais do Estado de Minas Gerais, verificaram que sete desses vírus deveriam ser classificados em um grupo geneticamente distinto de todos os genótipos já descritos no mundo, incluindo aqueles das estirpes vacinais. Tais resultados, na concepção desses autores, revelam que esses vírus devem ser entendidos como isolados regionais do Brasil, merecendo destaque que essa ampla diversidade do VBI, em nosso país, começou a acontecer antes do uso oficial da vacinação contra a BI e tem persistido desde então.

Estirpes variantes do VBI foram também recentemente isoladas de surtos atípicos de BI acometendo plantéis avícolas brasileiros e se caracterizaram por

provocarem sinais clínico-patológicos de alterações renais e respiratórias severas e, em alguns casos foram encontradas lesões na musculatura superficial e profunda (VILLARREAL, 2007). Até pouco tempo atrás, suspeitou-se que a estirpe 4/91 estaria envolvida nesses casos, mas Brentano et al. (2006), após analisarem filogeneticamente o gene S de três amostras isoladas de aves apresentando quadro clínico similar, demonstraram que nenhum desses vírus se agrupava com o genótipo da estirpe 4/91.

Ainda, no que tange à caracterização genética de diferentes patótipos do VBI isolados no Brasil, devem ser destacados os resultados obtidos nos estudos de Villarreal et al (2006a/b), que descreveram a presença de genótipos distintos do Massachusetts, mas próximos dos genótipos D274, Cal99 ou Arkansas, em amostras provenientes de galos com problemas de fertilidade ou de frangos e poedeiras apresentando quadros de enterite.

Além dessa diversidade de tipos de VBI, é possível que outras espécies de coronavírus possam ser encontradas nas aves de nosso país. Assim, entre os anos de 2002 a 2006, foram encontradas mais de 25 casos, em pelo menos cinco estados brasileiros, de um vírus que, após os estudos genéticos-moleculares, revelou-se como produto de uma possível recombinação entre o VBI e um outro coronavírus pertencente ao grupo 2. Tal vírus foi denominado de CECoV (“Chicken Enteric Coronavirus”) e foi associado à etiologia de quadros clínicos de enterite e retardo no crescimento de pintinhos (VILLARREAL et al., 2006a, VILLARREAL, 2007).

Em vista de tudo que foi apresentado acima, pode-se conceber que as estirpes de VBI existentes atualmente em nosso país já estavam circulando no plantel avícola nacional há um longo tempo e antes mesmo da introdução dos procedimentos imunoproláticos com vacinas vivas constituídas principalmente pelas estirpes do genótipo / sorotipo Massachusetts (H120, H52, H90 e Ma5). Ainda, deve-se ter em mente que um número considerável de estirpes brasileiras do VBI pode ser classificado em um único grupo consistente com amostras autóctones, o qual difere de todos os demais grupos já descritos em estudos filogenéticos anteriormente realizados e que reúnem estirpes conhecidas desse mesmo vírus e oriundas das mais diversas partes do mundo. E, ademais, essas estirpes “nacionais” do VBI têm persistido, a despeito do uso das vacinas convencionais contra BI, as quais são formuladas como explanado acima, sugerindo que tal procedimento não tem sido efetivo e que é muito importante que os isolados desse vírus sejam caracterizados genética e fenotipicamente.

6 CONCLUSÕES

6.1 O conjunto dos resultados do presente estudo evidenciou que estavam circulando, entre 1988 e 2000, nas granjas de produção avícola industrial das regiões Sul e Sudeste do Brasil, isolados do VBI que apresentam diversidade relevante nos genes da glicoproteína de espícula (S1) e da nucleoproteína (N) desse vírus, a qual foi demonstrada tanto pelo mapa de restrição do gene S1, como pela análise das seqüências desse mesmo gene e também do gene N.

6.2 Os sítios polimórficos não ocorrem aleatoriamente nas seqüências dos genes S1 e N desses isolados de campo do VBI ora investigados, mas tendem a se formar em locais específicos e de maneira agrupada, sobretudo no que concerne às variações não sinônimas, as quais predominam em regiões codificadoras das cadeias polipeptídicas S1 e N que configuram sítios estruturais e antigênicos importantes envolvidos, na expressão de propriedades biológicas relevantes, como a neutralização viral ou na indução de imunidade mediada por células T citotóxicas.

6.3 A maior parte dos isolados de campo estão distribuídos, com base na análise filogenética das seqüências parciais dos genes S1 e N, em dois grandes grupos, o primeiro deles mais estreitamente relacionado às estirpes do genótipo Massachusetts (estirpe vacinal H120 e estirpe M41) e o segundo reúne apenas isolados brasileiros autóctones com uma grande diversidade em relação às estirpes ou isolados do grupo Massachusetts e de outros países ou continentes, mas, no que tange ao gene S1, com relações mais próximas a outros vírus isolados mais recentemente no Brasil e cujas seqüências foram depositadas no *GenBank*.

6.4 Os padrões genotípicos dos isolados mais relacionados às estirpes do grupo Massachusetts bem como do grupo de isolados com maior variabilidade, caracterizados por determinadas mutações em ponto, inserções ou deleções, parece terem-se fixado nas populações de cada um desses grupos de vírus pelos mecanismos de seleção positiva, para o gene S1, ou de seleção negativa, para o gene N.

6.5 Dois dos isolados de campo em razão de ausência de associação com os dois principais grupos de classificação para a maioria dos isolados brasileiros e em vista de suas estreitas relações filogenéticas, ou com a estirpe Connecticut, ou com estirpes do grupo Arkansas ou então oriundas da China e assemelhadas ao primeiro grupo, podem ter sido introduzidos em nosso país, ou por meio de vacinas compostas por estirpes vacinais atenuadas de uso não autorizado em nosso país, ou foram carregados por pintinhos importados para reposição de aves nas linhagens de avós de matrizes destinadas ao processo de produção de frangos ou de aves de postura.

6.6 A maioria das mutações não sinônimas que atingiram as seqüências parciais dos genes S1 e N, refletiram-se, via de regra, em alterações relevantes na estrutura secundária e nos sítios de glicosilação da glicoproteína S1, bem como em importantes sítios antigênicos, avaliado pelos perfis de hidrofiliçidade, tanto na proteína anterior como na proteína N.

REFERÊNCIAS*

ABDEL-MONEIN A.S.; EL-KADY M.F.; LADMAN B.S.; GELB Jr J. S1 gene sequence analysis of a nephropathogenic strain of avian infectious bronchitis virus in Egypt. **Virol. J.**, v. 3, n. 78, 2006.

ABREU, J. T. **Identificação de isolados brasileiros do vírus da bronquite infecciosa das galinhas com RT-PCR universal e análise por RFLP de parte do gene N. 51 f.** Dissertação – (Mestrado em Medicina Veterinária Preventiva e Epidemiologia) - Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2000.

ABREU, J. T.; RESENDE, J. S.; FLATSCHART, A. V. F.; MENDES, A. C. R.; MARTINS N. R. S.; SILVA, C. B. A.; FERREIRA, M. C.; MACHADO, A. L. C. Genotipificação de isolados do vírus da bronquite infecciosa das galinhas (VBIG) pelo sequenciamento direto de parte de S2 e do segmento S1. **Rev. Bras. Ciênc. Avíc.**, Campinas, supl.8, p. 210, 2006.

ANDREASEN, J. R.; JACKWOOD, M. W.; HILT, D. A. Polymerase Chain Reaction of the Genome of Infectious Bronchitis Virus. **Avian Dis.**, v. 35, p. 216-220, 1991.

BAYRY, J. D.; DAVIS, P.J.; PAPPIN, D.J.; BINNS, M.M.; BOURSNELL, M.E.; BROWN, T.D.K. Coronavirus IBV: partial amino terminal sequencing of spike polypeptide S2 identifies the sequence Arg-Arg-Phe-Arg-Arg at the cleavage site of the spike precursor polypeptide of IBV strains Beaudette and M41. **Virus Res.**, Amsterdam, v. 4, n. 3, p. 133 - 143, 1986.

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

BARIC, R. S.; YOUNT, B.; HENSLEY, L.; PEEL, S. A.; CHIEN, N. Episodic evolution mediates interspecies transfer of a murine coronavirus. **J. Virol.**, Washington, v. 71, n. 3, p. 1946 – 1955, 1997.

BEAUDETTE, F. R.; HUDSON, C. B. Cultivation of the virus of infectious bronchitis. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, v. 90, n.1, p. 51-60, 1937.

BOCHKOV, Y. A.; BATCHENKO, G. V.; SHCHERBAKOVA, L. O.; BORISOV, A. V.; DRYGIN, V. V. Molecular epizootiology of avian infectious bronchitis in Russia. **Avian Pathol.**, Huntingdon, v. 35, n. 5, p. 379-393, 2006.

*De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

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

BOOTS, A. M.; Van LIEROP, M. J.; KUSTERS, J. G.; Van KOOTEN, P. J.; Van Der ZEIJST, B. A.; HENSEN, E. J. **Immunology**, Oxford, v. 72, n.1, p. 10 -14, 1991.

BOURSNELL, M.E.G.; BROWN, T.D.K.; FOULDS, I.J.; GREEN, P.F.; TOMLEY, F.M.; BINNS, M. M. Completion of the sequence of the genome of coronavirus avian infectious bronchitis virus. **J. Gen. Virol.**, London, v. 68, p. 55-77, 1987.

BRANDEN, R. C.; SILVA, E. N. Ocorrência de novos serotipos de bronquite infecciosa em Brasil. In: SEMINÁRIO INTERNACIONAL DE PATOLOGIA AVIARIA, 6., [S.l.:S.l.p.]. **Proceedings...**1986.

BRENTANO, L.; ESTEVES, P. A.; TREVISOL, I. M.; HAYASHI, M. M.; LUCIANO, R. L.; CASTRO, A. G. M.; KLEIN, T. A. P.; MOLINARI, M. Sequenciamento do gene S1 de vírus da bronquite infecciosa de surtos da doença associada a lesões de miopatia peitoral. **Rev. Bras. Ciênc. Avíc.**, Campinas, supl. 8, p. 241, 2006.

BROOKS, J. E.; RAINER, A.C; PARR, R.L; WOOLCOCK, P; HOOERR,F; COLLISSON, E.W. Comparisons of envelope through 5B sequences of infectious bronchitis coronaviruses indicates recombination occurs in the envelope and membrane genes. **Virus Res.**, Amsterdam, v. 100, n. 2, p. 191-198, 2004.

BROWN, A. J.; BRACEWELL, C. D. Application of the haemagglutination inhibition test to typing of infectious bronchitis virus. **Vet. Rec.**, London, v. 116, n. 2, p. 47-48, 1985.

CAMPANELLA, J.J.; BITINCKA, L.; SMALEY, J. MatGAT: an application that generates similarity/identity matrices using protein or DNA sequences. **Bioinformatics.**, v. 4, n. 6, p. 29, 2003.

CAVANAGH, D. Coronavirus Surface glycoprotein. In: CAVANAGH, D. (Ed.). **The Coronaviridae**. New York: Plenum, 1995. p. 73-133.

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

CAVANAGH, D. Coronavirus avian infectious bronchitis vírus. **Vet. Res.**, Les Ulis, v. 38, n. 22, p. 281-297, 2007.

CAVANAGH, D, NAQI S. Infectious Bronchitis. In: CALNEK, B. W.; BARNES, H. J.; BEARD, C. W. **Diseases of poultry**. 11 ed. Ames: Iowa State University Press, 2003. p. 101-119.

CAVANGH, D.; DAVIS, J.; MOCKETT, A. P. A. Amino acids within hypervariable region 1 of avian coronavirus IBV (Massachusetts serotype) spike glycoprotein are associated with neutralization epitopes. **Virus Res.**, Amsterdam, v.11, p.141-150, 1988.

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

CAVANAGH, D.; BRIAN, D. A.; BRINTON, M. A.; ENJUANES, L.; HOLMES, K. V.; HORZINEK, M. C.; LAI, M. M. C.; LAUDE, H.; PLGEMANN, P. G. W.; DDELL, S.; SPAAN, W. J. M.; TAGUCHI, F.; TALBOT, P. J. Revision of the taxonomy of the Coronavirus, Torovirus e Arterivirus genera. **Arch. Virol.**, New York, v. 135, n. 1-2, p. 227 - 237, 1994.

CAVANAGH, D.; MAWDITT, WELCHMAN, D. 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 Pathol.**, Huntingdon, v. 31, n. 1, p. 181-93, 2002.

CAVANAGH, D.; MAWDITT, K.; SHARMA, M.; DRURY, S. E.; AINSWORTH, H. L.; BRITTON, P.; GOUGH, R. E. Detection of a coronavirus from turkey pouts in Europe genetically related to infectious bronchitis virus of chickens. **Avian Pathol.**, Huntingdon, v. 30, n. 4, p. 365 - 378, 2001.

CHERRY, J. D.; TAYLOR-ROBISON, D. Large quantity production of chicken embryo tracheal organ cultures and use in virus and mycoplasma studies. **Applied Microbiol.**, Washington, v. 19, n. 4, p. 658-662, 1970.

COLLISSON, E. W.; PARR, R. L.; WANG, L.; WILLIAMS, A. K. An overview of molecular characteristics of avian infectious bronchitis virus. **Poultry Sci. Rev.**, v. 4, p. 41-55, 1992.

COOK, J. K. A. Coronaviridae. In: JORDAN, F.; PATTISON, M.; ALEXANDER, D.; FARAGHER, T. (Ed.). **Poultry diseases**. 5 ed. London: W.B. Saunders, 2001. p.298-306.

COOK, J. K. A.; ORBELL, S. J.; WOODS, M. A.; HUGGINS, M. B. Breadth of protection of the respiratory tract provided by different live-attenuated infectious bronchitis vaccines against challenge with infectious bronchitis virus of heterologous types. **Avian Pathol.**, Huntingdon, v. 28, n. 5, p. 471-479, 1999.

COOK, J. K. A. et al. The secretory antibody response of inbred lines of chickens to avian infectious bronchitis virus infection. **Avian Pathol.**, London, v. 21, n. 3, p. 681-692, 1992.

CHONG, K. T.; APOSTOLOV, K. The pathogenesis of nephritis in chickens induced by infectious bronchitis virus. **J. Comp. Pathol.**, v. 92, n. 1, p. 199-211, 1982.

DARBYSHIRE, J. H.; ROWEL, J. G.; COOK, J. K. A.; PETERS, R. W. Taxonomic studies on strains of avian infectious bronchitis virus using neutralization tests in tracheal organ cultures. **Arch. Virol.**, New York, v. 61, p. 227-228, 1980.

De WIT, J. J. Detection of infectious bronchitis virus. **Avian Pathol.**, Huntingdon, v. 29, n. 1, p. 71-93, 2000.

De WIT, J. J.; JONG, M. C. M.; PIJPERS, A. Transmission of infectious bronchitis virus within vaccinated and unvaccinated groups of chickens. **Avian Pathol.**, Huntingdon, v. 27, n. 2, p. 464 - 471, 1998.

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

Di FABIO, 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 Dis.**, Kennett Square, v. 44, n.3, p. 582-589, 2000.

EPIPHANIO, E. O. B. **Cultivos de anéis de traquéia para ensaios com vírus da bronquite infecciosa das galinhas**. 73 f. Dissertação (Mestrado) - Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 1998.

GELB, Jr. J.; WOLFF, J. B.; MORAN, C. A. Variant serotypes of infectious bronchitis virus isolated from commercial layer and broiler chickens. **Avian Dis.**, Kennett Square, v. 35, n. 1, p. 82-87, 1991.

GUPTA, R.; JUNG, E.; GOOLEY, A.A.; WILLIAMS, K.L.; BRESNAK, S.; HANSEN, J.E. Scanning of available Dictyostelium discoideum for O-linked Glic-NAC glycosilation sites using neural networks. **Glycobiology**, v.9, n. 10, p. 1009-1022, 1999.

GUY, J.S. Turkey coronavirus is more closely related to avian infectious bronchitis virus than to mammalian coronaviruses. **Avian Pathol.**, Huntingdon, v. 29, n.3, p. 206-212, 2000

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

HANDBERG, K. J. NIELSEN, O. L.; PEDERSEN, M. W.; JORGENSEN, P. H. Detection and strain differentiation of infectious bronchitis virus in tracheal tissues from experimentally infected chickens by reverse transcription-polymerase chain reaction. Comparison with an immunohistochemical technique. **Avian Pathol.**, Huntingdon, v. 28, n. 4, p. 327-335, 1999.

HIPÓLITO, O. Isolamento e identificação do vírus da bronquite infecciosa das galinhas no Brasil. **Arq. Esc. Super. Vet. Univ. Rur. Est. Minas Gerais**, Belo Horizonte, v. 10, n.1, p. 131-151, 1957.

HIPÓLITO, O.; SILVA, J. M. L.; HSIUNG, H. M. **Bronquite infecciosa das galinhas: a doença no Brasil**. São Paulo: Editora, 1979. p. 72.

HOFSTAD, M. S.; YODER, H. W. Avian infectious bronchitis virus distribution in tissues of chicks. **Avian Dis.**, v. 10, n. 2, p. 230-239, 1966.

HOPP, T. P.; WOODS, K. R. Prediction protein antigenic determinants from amino acid sequences. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, Washington, v. 78, n. 6, p. 3824-3828, 1981.

IGNJATOVIC, J.; GOULD, G.; SAPATS, S. Isolation of a variant infectious bronchitis virus in Australia that further illustrates diversity among emerging strains. **Arch. Virol.**, New York, v. 151, n.8, p. 1567-1585, 2006.

ITO, N. M. K.; MIYAJI, C. I. ; CAPELLARO, C. E. M. P. D. M. Studies on broiler's IBV and IB-like virus from guinea fowl. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON INFECTIOUS BRONCHITIS, 1991, Giessen. **Proceedings...** p. 302-307.

ITO, N. K.; MIYAJI, C.; OKABAYASHI, S. 2006. Controle de variantes do vírus da bronquite infecciosa das galinhas, In: CONFERÊNCIA APINCO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLAS, 2006, Santos. **Anais...** p.75-99.

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

JIA, W.; KARACA, K.; PARRISH, C. R.; NAQI, S. A. A novel variant of avian infectious bronchitis virus resulting from recombination among three different strains. **Virology**, New York, v. 140, n.2, p. 259-271, 1995.

JONASSEN, C. M.; HOFSTAD, T.; LARSEN, I. L.; LOVLAND, A.; HANDELAND, K.; FOLLESTAND, A.; LILLEHANG, A. Molecular identification and characterization of novel coronaviruses infecting greylag geese (*Anser anser*), feral pigeons (*Columba livia*) and mallards (*Anas platyrhynchos*). **J. Gen. Virol.**, London, v. 86, n.6, p. 1597 – 1607, 2005.

JORGE, M. A.; RESENDE, J. S.; OLIVEIRA, R. L. Levantamento sorológico em frangos de Minas Gerais: Doença de Gumboro, Bronquite Infecciosa e Doença de Newcastle. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, Belo Horizonte, v. 44, n. 3, p. 545- 547, 1992.

KOTTIER, S. A.; CAVANAGH, D.; BRITTON, P. Experimental evidence of recombination in coronavirus infectious bronchitis virus. **Virology**, New York, v. 213, n. 2, p. 569-580, 1995.

KUMAR, S.; TAMURA, K.; NEI, M. MEGA3: Integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment. **Brief. Bioinform.**, London, v. 5, n. 2, p. 150-163, 2004.

KANT, A.; KOCH, G.; Van ROOZELAAR, D. J.; KUSTER, J. G.; POELWIJK, F. A. J.; Van Der ZEIJST, B. A. M. Location of antigenic sites defined by neutralizing monoclonal antibodies on the S1 avian infectious bronchitis virus glycopolypeptide. **J.Gen.Virol.**, London, v. 73, n. 3, p. 591-519, 1992.

KUSTERS, J. G.; NIESTERS, H.; LENSTRA, J. A.; HORZINEK, M. C.; ZEIJST VAN DER, B. A. M. Phylogeny of antigenic variants of avian coronavirus IBV. **Virology**, New York, v. 169, n. 1, p. 217-221, 1989.

KWON, H. M.; JACKWOOD, M. W.; GELB, Jr. J. Differentiation of infectious bronchitis virus serotypes using polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism analysis. **Avian Dis.**, Kennett Square, v. 37, p. 194-202, 1993.

LAI, M. M. Genetic recombination in RNA viruses, **Curr. Top. Microbiol. Immunol.**, Berlin, v. 176, n. 1, p. 21 – 32, 1992.

LAI, M. M. C.; CAVANAGH, D. The molecular biology of coronaviruses. **Adv. Virus Res.**, Amsterdam, v. 48, p. 1-100, 1997.

LI, R.; YANG, H. C. Sequence analysis of nephropathogenic infectious bronchitis virus strains of the Massachusetts genotype in Beijing. **Avian Pathol.**, Huntingdon, v. 30, n. 5, p. 535-541, 2001.

LIN, Z.; KATO, A.; KUDOU, Y.; UEDA, S. A new typing method for the avian infection bronchitis virus using polymerase chain reaction and restriction enzyme fragment length polymorphism. **Arch. Virol.**, v.116, p.19-31, 1991.

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*). **J. Gen. Virol.**, London, v. 86, n. 3, p. 719 - 725, 2005.

LIU, S. W.; ZHANG, Q. X.; CHEN, J. D.; HAN, Z. X.; LIU, X.; FENG.; SHAO, Y. H.; RONG, J. G.; KONG, X. G.; TONG, G. Z. Genetics diversity of infectious bronchitis coronavirus strains isolated in China between 1995 and 2004. **Arch. Virol.**, New York, v. 151, n. 6, p. 1133-1148, 2006.

MONTASSIER, M. F. S.; BRENTANO, L.; RICHTZENHAIN, L. J.; MONTASSIER, H. J. Genetic diversity on s1 glycoprotein if avian infectious bronchitis virus strains isolated in Brazil between 1988-2000. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON AVIAN CORONAVIRUS, 5., 2006, Germany. **Proceedings...** p. 119-131.

MOORE, K. M.; BENNETT, J. D.; SEAL, B. S.; JACKWOOD, M. W. Sequence comparison of avian infectious bronchitis virus S1 glicoproteins of the Florida serotype and five variantisilates from Georgia and California. **Virus Genes**, Norwell, v. 17, n.1, p. 63 – 83, 1998.

MOYA, A.; ELENA, S. F.; BRACHO, A.; MIRALLES, R.;BARRIO, E. The evolution of RNA viruses: a population genetics view. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, Washington, v. 97, n. 13, p. 6967-6973, 2000.

OSHIRO, L. S. Coronaviruses. In: DALTON, A.; HAGUENAU, F. (Ed). **Ultrastructure of animal viruses and bacteriophages**: an atlas. New York: Academic, 1973, cap. 18, p. 331-341.

OTSUKI, K.; TAGAWA, Y.; TSUBOKURA, M. Antigenic variation of avian bronchitis virus during replication in BHK-21 cells. **Arch. Virol.**, New York, v. 73, n. 1, p. 75-78, 1982.

OWEN, R. L.; COWEN, B. S.; HATTEL, A. L.; NAQI, S. A.; WILSON, R. A. Detection of viral antigen following exposure of one-day-old chickens to the Holland-52 strain of IBV. **Avian Pathol.**, Huntingdon, v. 20, n. 4, p. 663-673, 1991.

PARK, J. Y.; PAK, S. I.; SUNG, H. W.; KIM, J. H.; SONG, C. S.; LEE, C. W.; KWON, H. M. Variation in the nucleocapsid protein gene infectious bronchitis viruses isolated in Korea. **Virus Genes**, Norwell, v. 31, n. 2, p. 153-162, 2005.

PENSAERT, M.; LAMBRECHTS, C. Vaccination of chickens against a Belgian nephropathogenic strain of infectious bronchitis virus B1648 using attenuated homologous and heterologous strains. **Avian Pathol.**, Huntingdon, v. 23, n. 4, p. 631-641, 1994.

PEREIRA N.A.; ALESSI A.C.; OKINO C.H.; MONTASSIER M.F.S.; SANTOS I.L.; MONTASSIER H. J.; RICHTZENHAIN L.J. Uma nova estirpe brasileira do vírus da bronquite infecciosa causadora de lesões gonadais e a proteção cruzada induzida pela vacina comercial atenuada. **Biológico**, São Paulo, v. 68, p.250-254, 2006.

RESENDE, J. S. **Patogenia comparada de duas amostras brasileiras do vírus da bronquite infecciosa das galinhas (BIG) em aves gnotobióticas (GN) e isentas de patógenos (SPF)**. 74 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária Preventiva e Epidemiologia) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 1983.

RESENDE, J. S.; VIEIRA, E. C.; RESENDE, M. Comparative pathogenesis of infection of gnotobiotic and specific-pathogen-free chickens with two strains of infectious virus. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, Belo Horizonte, v. 41, n. 1, p. 17-27, 1989.

ROTTIER, P. J. M. The molecular dynamics of feline coronaviruses. **Vet. Microbiol.**, Amsterdam, v. 69, n. 1-2, p. 117-125, 1999.

ROZAS, J.; DelBARRIO, J. C. S.; MESSEGUER, X.; ROZAS, R. DNAsp version 4.0: DnaSP, DNA polymorphism analysis by the coalescent and other methods. **Bioinformatics**, Oxford, v. 19, n. 18, p. 2496-2497, 2003.

SANTIAGO, S. L. T.; RESENDE, J. S.; ABREU, J. T. Vírus da bronquite infecciosa das galinhas – Caracterização molecular de isolados da avicultura industrial no Estado de São Paulo. **Rev Bras. Ciênc. Avíc.**, Campinas, v.1, supl. 2, p. 100, 2000.

SAPATS, S. I.; ASHTON, F.; WRIGHT, P. J.; IGNJATOVIC, J. Sequence analysis of the S1 glycoprotein of infectious bronchitis viruses: identification of a novel genotypic group in Australia. **J. Gen. Virol.**, London, v. 77, n. 3, p. 413-418. 1996.

SCHALK, A. F.; HAWN, M. C. An apparently new respiratory disease of baby chicks. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, Schaumburg, v. 78, p. 413-422, 1931.

SCHIKORA, B. M.; SHIH, L. M.; HIETALA, S. H. Genetic diversity of avian infectious bronchitis virus California variants isolates between 1988 and 2001 based on the S1 subunit of the spike glycoprotein. **Arch. Virol.**, New York, v. 148, p. 115-136, 2003. Disponível em: <<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetOGlyc/>; <http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>>. Acesso em: 20 jan.2007.

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

SEO, S. H.; WANG, H. L.; SMITH, R.; COLLISON, E. W. The carboxyl-terminal 120-residue polypeptide of infectious bronchitis virus nucleocapside induces cytotoxic T lymphocytes and protects chicken from acute infection. **J. Virol.**, Washington, v. 71, n. 10, p. 7889-7894, 1997.

SMATI, R.; SILIM, A.; GUERTIN, C.; HENRICHON, M.; MARANDI, M.; ARELLA, M.; MERZOUKI, A. Molecular characterization of three new avian infectious bronchitis virus (IBV) strains isolated in Quebec. **Virus Genes**, Norwell, v. 25, n.1, p. 85 – 93, 2002.

SHIEH, H. K.; SHIEN, J. H.; CHOU, H. Y.; SHIMIZU, Y.; CHEN, J. N.; CHANG, P. C. Complete nucleotide sequence of S1 and N genes of infectious bronchitis virus isolated in Japan and Taiwan. **J. Vet. Med. Sci.**, v. 66, n. 5, p. 555-558, 2004.

SIDELL, S. G.; WEGE, H.; MEULEN, V. The biology of coronaviruses. **J. Gen. Virol.**, London, v. 64, n. 4, p. 761-776, 1983.

SILVA, J. M. L. Bronquite infecciosa das galinhas: como e quando introduzir novas vacinas. In: CONFRÊNCIA APINCO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLAS, 1989, Campinas. **Anais...** San Diego: Academic Press, 1989. p. 75- 79.

STURMAN, L. S.; HOLMES, K. V. The molecular biology of coronaviruses. **Adv. Virus Res.**, San Diego, v. 28, n. 1, p. 35 – 112, 1983.

TAMURA, K.; DUDLEY, J.; NEI, M.; KUMAR, S. MEGA4: Integrated of Molecular evolutionary genetics analysis . Molecular Biology and Evolution , 2007. Disponível em < <http://megasoftware.net.1>>. Acesso em: 18 jan. 2007.

TOMLEY, F. M.; MOCKETT, A. P. A.; BOURSNEILL, M. E.; BINNS, M. M.; COOK, J. K. A.; BROWN, T. D. K.; SMITH, G. L. Expression of the infectious bronchitis virus spike protein by recombinant vaccinia virus and induction of neutralizing antibodies in vaccinated mice. **J. Gen. Virol.**, London, v. 68, n. 9, p. 2291 – 2298, 1987.

TORO, H.; SANTEN, V. L. Van.; LI, L.; LOCKABY, S. B.; SANTEN, E. Van.; HOERR, F. J. Epidemiological and experimental evidence for immunodeficiency effecting avian infectious bronchitis. **Avian Pathol.**, Huntingdon, v. 35, n. 6, p. 455-464, 2006.

VILLA, M. F. G. "Programa Nacional de Sanidade Avícola: de 1994 a 1998". In: CONFERÊNCIA APINCO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLAS, SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE SANIDADE AVÍCOLA, 1998, Campinas. **Anais...** San Diego: Academic Press, 1998. p. 33-55.

VILLAREAL, L. Y. B. Bronquite infecciosa das galinhas: Diagnóstico, tipos patogênicos e classificação no Brasil. In: CONFERÊNCIA APINCO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLAS, 2007, Santos. **Anais...** p. 237-250.

VILLARREAL, L. Y. B.; BRANDÃO, P. E.; ASSAAYAG, M. S.; SAINDBERG, A. B. S.; JEREZ, J. A.; FERREIRA, A. P. F. Propriedades moleculares e biológicas de um coronavírus aviário relacionado aos coronavírus do grupo II. **Rev. Bras. Ciênc. Avíc.**, Campinas, sup l.8, p. 211, 2006a.

VILLARREAL, L. Y. B.; BRANDÃO, P. E.; CHACÓN, J. L. V.; RAFFI, P.; SESTAK, L.; FERREIRA, A. P. F. 2006. Vírus da bronquite infecciosa das galinhas e Pneumovírus aviário associados com problemas de fertilidade em galos. **Rev. Bras. Ciênc. Avíc.**, Campinas, supl.8, p. 212, 2006b.

WANG, C. H.; TSAI, C. T. Genetic grouping for the isolates of avian infectious bronchitis virus in Taiwan. **Arch. Virol.**, New York, v. 141, n. 9, p. 1677-1688, 1996.

WANG, L.; JUNKER, D.; COLLISSON, E. W. Evidence of natural recombination within the S1 gene of infectious bronchitis virus. **Virology**, New York, v. 192, n. 2, p. 710-16. 1993.

WANG, L.; JUNKER, D.; HOCK, L.; EBIARY, E.; COLLISSON, E.W. Evolutionary implications of genetic variations in the S1 gene of infectious bronchitis virus. **Virus Res.**, Amsterdam, v. 34, n.3, p. 327-338, 1994.

WILLIAMS, A.K.; WANG, L.; SNEED, L. W.; COLLISON, E. W. Comparative analysis of the nucleocapsid genes of several strains of infectious bronchitis viruses and other coronaviruses. **Virus Res.**, Amsterdam, v. 25, n. 3, p. 213-222, 1992.

WENTZ, I. Bronquite infecciosa- Que cepa vicinal usar? In: CONFERÊNCIA APINCO DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA AVÍCOLAS, 1992, Santos. **Anais...** p. 165-168.

WINTERFIELD, R. W.; ALBASSAM, M. A. Nephropathogenicity of infectious bronchitis virus. **Poultry Sci.**, Champaign, v. 63, n. 6, p. 2358 -2363, 1984.

WU, Z. Q.; YANG, Q. W.; FU, C. Antigenic and immunogenic characterization of infectious bronchitis strains isolated in China between 1986 and 1995. **Avian Pathol.**, Huntingdon, v. 27, n. 6, p. 578 – 585, 1998.

YU, L.; WANG, Z.; JIANG, Y.; LOW, S.; KWANG, J. Molecular epidemiology of infectious bronchitis virus isolates from China and Southeast Asia. **Avian Dis.**, Kennet Square, v. 45, n. 1, p. 201-209, 2001.