

MÁRIO SÉRGIO ASSAYAG JÚNIOR

**CARACTERÍSTICAS PATOGÊNICAS E MOLECULARES
DE VARIANTES BRASILEIRAS DO VÍRUS DE BRONquite
INFECCIOSA INOCULADOS EM AVES COMERCIAIS E SPF**

Tese apresentada ao Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Doutor em Ciências (Microbiologia).

Área de concentração: Microbiologia

Orientador:

Prof. Dr. Antonio José Piantino Ferreira

São Paulo

2009

RESUMO

ASSAYAG JUNIOR, M. S. **Características Patogênicas e Moleculares de Variantes Brasileiras do Vírus de Bronquite Infecciosa Inoculados em Aves Comerciais e SPF.** Doutorado (Microbiologia) - Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

A bronquite Infecciosa das galinhas (BIG) é uma doença respiratória aguda e altamente contagiosa que acomete galinhas de diferentes idades. O vírus pertence à família *Coronaviridae*, gênero *Coronavirus* e grupo 3. Este estudo experimental e a caracterização molecular foi realizada com dois isolados do vírus da bronquite infecciosa (VBIG), sendo que uma amostra foi isolada de frangos de corte com enterite e sinais respiratórios leves (amostra USP-22) e a outra amostra de frangos de corte com problemas respiratórios intensos (amostra USP-78). Posteriormente, esses isolados foram classificados como variantes do VBIG através da técnica de RT-PCR *multiplex* e pelo sequenciamento parcial do gene S1. Os isolados foram inoculados experimentalmente em frangos de corte e aves SPF, livres de anticorpos maternos contra o VBIG para se determinar a virulência e a patogenia dos isolados em aves. As aves apresentaram sinais respiratórios 36 horas após inoculação independente da origem viral, entérica ou respiratória. Os frangos e aves SPF apresentaram sinais predominantemente respiratórios, sendo mais discretos nos SPF. As alterações macroscópicas mais evidentes foram congestão da mucosa traqueal, pulmão e rins. A análise histopatológica mostrou lesões significativas na traquéia e menos evidentes nos pulmões, rins, intestinos e glândula de Harder. Foi demonstrada a presença de anticorpos contra o VBIG em frangos de corte e aves SPF 21 dias após o desafio com os isolados virais USP 22 e USP 78 através da técnica de ELISA e também foi demonstrada a presença do vírus nos tecidos através da técnica de RT-PCR. A análise filogenética, a partir do sequenciamento parcial do gene S1, mostrou que os dois isolados são similares, apresentando 98,2% entre eles e 90,9 a 100% com outras amostras isoladas no Brasil, respectivamente. Além disso, a análise de nucleotídeos e de aminoácidos mostrou que esses isolados apresentaram baixa similaridade com as amostras vacinais utilizadas no Brasil (Ma5 e H120). Os resultados mostraram ainda que os dois isolados variantes do VBIG, utilizadas nesse estudo, são altamente similares e que são capazes de provocar sinais respiratórios em frangos de corte e aves SPF quando inoculados pelas vias oral ou ocular. Esses resultados sugerem que os isolados classificados como variantes apresentam potencial patogênico para aves.

Palavras-chave: Vírus da bronquite das galinhas. Coronavírus. Galinhas. Avicultura.

ABSTRACT

ASSAYAG JUNIOR, M. S. **Pathogenic and molecular characteristics of Brazilian variant infectious bronchitis isolates inoculated in commercial and SPF birds.** Doctoral degree (Microbiology) - Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

Infectious bronchitis (IB) is an acute respiratory disease, highly contagious which affects chickens of different ages. The agent is member of the *Coronariviridae* family, *coronavirus* genus and group 3. This experimental study and molecular characterization were performed with two isolates of infectious bronchitis virus (IBV), from which one was isolated from broilers with enteritis and mild respiratory signs (isolate USP-22) and the other one was isolated from birds with severe respiratory problems (isolate USP-78). Subsequently, these isolates were classified as IBV variants by the *multiplex* RT-PCR technique and by partial sequencing of S1 gene. Isolates were experimentally inoculated in broilers and SPF birds, without maternal antibody against IBV to determine their virulence and pathogeny in birds. The inoculated birds showed respiratory signs 36 hours post inoculation, independently of the enteric or respiratory viral source. The broilers and SPF birds showed in general respiratory signs, which were less evident on SPF birds. The most evident macroscopic changes were congestion of tracheal mucosae, lung and kidney. The histopathology analysis showed significant lesions on the trachea and less evident on the lungs, kidneys, intestines and Harder's gland. The presence of antibodies against IBV in broilers and SPF birds, 21 days after challenge with the isolates USP 22 and USP 78, was showed by ELISA analysis and also, the viral presence in the tissues was showed by RT-PCR analyses. The phylogenetic analysis, from S1 gene partial sequencing, showed that both isolates were similar, presenting 98.2% in between them and 90.9 to 100% with other samples isolated in Brazil, respectively. Furthermore, the nucleotides and aminoacids analysis showed that these isolates presented low similarity with vaccine viruses used in Brazil (Ma5 and H120). The results also showed that both IBV variant isolates, used in this study are highly similar and are able to cause respiratory signs in broilers and SPF birds when inoculated by oral or ocular via. These results suggest that the isolates classified as variant have pathogenic potential for birds.

Keywords: Infectious bronchitis virus. Coronavirus. Chicken. Aviculture.

INTRODUÇÃO

A bronquite infecciosa das galinhas (BIG) é uma doença viral, causada pelo vírus da bronquite infecciosa das galinhas (VBIG), que acomete aves da espécie *Gallus gallus*. A primeira descrição da doença foi em 1931, nos Estados Unidos. Atualmente a doença é endêmica em praticamente todos os países que criam aves.

A BIG tem grande importância econômica porque causa queda no ganho de peso e aumento na conversão alimentar em frangos de corte, além de aumento na condenação no abatedouro. Em galinhas reprodutoras e galinhas de postura comercial, ocorre redução na produção de ovos e piora na qualidade da casca dos ovos.

Atualmente a BIG é a principal doença avícola do Brasil, afetando granjas de frangos de corte, reprodutoras e poedeiras comerciais. Está distribuída em todas as regiões com produção comercial¹. Aparentemente, em aves de corte os sinais clínicos e as perdas produtivas são mais evidentes que em aves poedeiras comerciais.

Em aves reprodutoras, existem relatos de problemas cíclicos, com surtos da doença a cada 12 a 18 meses, caracterizados por queda de produção que ocorre normalmente após o pico de produção e/ou entre 45 e 55 semanas de idade. Nos lotes com desafio, a mortalidade é ligeiramente superior e constante durante todo o período de produção. As quedas de produção são de 3 a 15% e retornam em algumas semanas, mas aparentemente, não recuperam o potencial de produção anterior ao desafio. Assim, é freqüente observar seqüências de lotes com sinais clínicos e queda de produção, sinais respiratórios e algumas vezes lesões renais leves a moderadas. Os sinais clínicos mais freqüentes são sinais respiratórios leves e transitórios, com cabeça um pouco inchada, lacrimejamento e narinas sujas, hipertermia e pequeno aumento de mortalidade, passando de 0,1 a 0,2% por semana, para 0,3 a 0,5% por semana. A mortalidade, normalmente é causada por infecções secundárias. Nos achados necroscópicos, são observadas traqueítes leves, regressão folicular, peritonite e hipertemia.

¹ Dados observados na experiência de campo do pesquisador: 9 anos como Médico Veterinário de campo em grande empresa avícola e de 6 anos com Médico Veterinário em grande indústria farmacêutica, atuando em diversas regiões do país.

Normalmente, os lotes comerciais podem sofrer desafios concomitantes de pneumovírus aviário e BI, o que pode confundir o diagnóstico (CAVANAGH, ELUS, COOK, 1999). Isso é muito freqüente, principalmente em algumas regiões do país, como na região sul, na serra gaúcha, oeste de Santa Catarina, sudoeste do Paraná e em Minas Gerais, no triângulo mineiro.

O controle da doença em aves reprodutoras é realizado com o uso de um programa de vacinação com grande número de doses de vacinas vivas na recria e uma vacina oleosa monovalente e/ou bivalente antes da produção. Em muitos casos são evidentes os resultados positivos quanto ao uso de vacinas oleosas bivalentes frente às monovalentes, mas em outros casos, menos freqüentes, aparentemente as diferenças não existem. Quando foram utilizados programas experimentais com duas vacinas inativadas, mono e/ou bivalentes, em condições de alto desafio, os programas com duas vacinas inativadas induziram a produção de altos títulos de anticorpos e foram melhores do que os programas com apenas uma dose de vacina inativada. O uso de vacina viva durante a produção também é uma prática disseminada no Brasil e algumas vezes apresentam resultados positivos principalmente na qualidade dos ovos. O controle da doença em aves poedeiras é realizado com programas de vacinação contra BIG semelhante ao utilizado em reprodutoras, mas com menos doses de vacina viva no crescimento e uso restrito durante a produção, além de uma dose de vacina inativada antes da produção.

Em frangos de corte são descritos sinais respiratórios e algumas vezes entéricos, principalmente após 28 dias de idade. Os relatos de redução no ganho de peso após 21 dias também são freqüentes, mas lesões macroscópicas, no campo, após 28 dias de idade são pouco evidentes, mesmo com o diagnóstico do agente por meio de RT-PCR e a presença de altos títulos de anticorpos demonstrado pela técnica de ELISA, aos 42 dias de idade. Para os frangos, se utilizam vacinas vivas do tipo Massachusetts, podendo ser empregada a amostra H120 ou a Ma5. A prática de vacinação contra BIG nos incubatórios é necessária, devido à circulação viral que ocorre nas diferentes regiões do Brasil. Em frangos abatidos entre 28 e 34 dias de idade se utiliza vacina do tipo H120. Em frangos abatidos entre 40 e 45 dias de idade, algumas vezes o uso da vacina do tipo Ma5 possibilita melhor desempenho zootécnico com menor condenação de carcaças no abatedouro devido aos problemas respiratórios.

Quando existe desafio viral por VBIG variante (diagnóstico realizado com RT-PCR, isolamento viral, seqüenciamento parcial da região S1 do VBIG e sorologia por ELISA) estas

vacinas Mass não conferem proteção adequada. Provas para essa conclusão foram realizadas após o isolamento viral e desafio controlado em isoladores em aves vacinadas com as cepas Mass no primeiro dia de idade (dados não publicados). Nos lotes com desafio por VBIG variante, normalmente apresentam redução no ganho de peso e conversão alimentar e muitas vezes um aumento de condenação no abatedouro.

Assim, tanto em aves de ciclo longo, com diferentes programas vacinais ou em frangos vacinados com vacinas do tipo Massachusetts, há a ocorrência da doença, mesmo as aves apresentando títulos significativos de anticorpos contra o vírus da BIG. Frequentemente o diagnóstico molecular demonstra a presença de amostras variantes, o que pode sugerir que as vacinas do tipo Mass disponíveis no Brasil podem não ser suficientes para proteger efetivamente contra todos os desafios pelo VBIG e garantir o máximo desempenho zootécnico dos plantéis, diminuindo o impacto econômico causado pela doença.

CONCLUSÃO

- 1) Vírus de campo considerados como causadores de problemas respiratórios e entéricos foram caracterizados molecularmente dentro de um mesmo grupo molecular variante brasileiro.
- 2) Existe um grupo molecular brasileiro distinto de outros grupos moleculares de vírus de referência ou de variantes de outros países.
- 3) Esse grupo molecular, em desafio controlado, em isoladores, apresenta sintomatologia clínica, lesões macroscópicas e microscópicas, tropismo tecidual semelhantes ao vírus de referência Massachusetts, ou seja, predominantemente respiratório.
- 4) Aves SPF leghorn brancas apresentaram sinais clínicos e lesões hitopatológicas de menor intensidade quando comparadas com frangos de corte.

REFERÊNCIAS

- ABDEL-MONEIM, 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. **Viol. Journal.**, v. 3, n. 78, p. 1-9, 2006.
- AMBALI, A. G, JONES, R. C. Early pathogenesis in chicks of infection with na enterotropic strain of infectious bronchitis vírus. **Avian Dis.**, v. 34, p. 809-817. 1990.
- ALEXANDER, D. J.; GOUGH, R. E. Isolation of avian infectious bronchitis virus from experimentally infected chickens. **Res. Vet. Sci. Nov.**, v.23, n. 3, p. 344-347, 1977.
- ALVARADO, I. R. **Infectious bronchitis vírus: in vivo and in vitro methods of attenuation, and molecular characterization of fields strains.** 171 f. Tese (Doutorado em filosofia) – Universidade da Georgia, Athens, 2004.
- BILGILIE, S. F.; HESS, J. Miopatia peitoral profunda. **Aviagen™ Brasil Tecnologia.** Junho, 2008.
- BOLTZ, D.A.; ZIMMERMAN, C.R.; NAKAI, M.; BUNICK, D.; SCHERBA, G.; BAHR, J.M. Epididymal stone formation and decreased sperm production in roosters vaccinated with a killed strain of avian infectious bronchitis virus. **Avian Dis.**, v. 50, n. 4, p. 594-598, 2006.
- CAVANAGH, D. Severe acute respiratory syndrome vaccine development: Experiences of vaccination against avian bronchitis coronavirus. **Avian Pathol.**, v. 32, p. 567-582, 2003.
- CAVANAGH, D. Coronaviruses in poultry and other birds. Review. **Avian Pathol.**, v. 34, n. 6, p. 439-448, 2005.
- CAVANAGH, D.; BROWN, T.D. Aspects of coronavirus evolution. **Adv Exp Med Biol.**, v. 8, p. 276-367, 1990.
- CAVANAGH, D.; NAQI, S. A. Infectious Bronchitis. In: SAIF, Y.M.; BARBES, H.J.; GLISSON, J.R.; FADLY, A.M.; MCDUGALD, L.R.; SWAYNE, D.E. **Dis. of poultry.** 11th ed. Ames: Iowa State Press, 2003. p. 101-119.
- CAVANAGH, D.; MAWDITT, K.; WELCHMANN, D. B.; BRITTON, P.; GOUGH, R. E. Coronaviruses from pheasants (*Phasianus colchicus*) are genetically closely related to Coronaviruses of domestic fowl (Infectious Bronquitis Virus) and turkeys. **Avian Pathol.**, v. 31, n.1, p. 81 – 93, 2002.
- CAVANAGH, D.; 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 Pathol.**, v. 25, p. 593-605, 1999.
- CAVANAGH, D; ELUS, M. M.; COOK, J.K. Relationship between sequence variation in the S1 spike protein of infectious bronchitis virus and the extent of cross-protection in vivo. **Avian Pathol.**, v. 26, n. 1, p. 63-74, 1999.

- CAVANAGH, D.; DAVIS, P.J.; COOK, J. K. A. Infectious bronchitis virus evidence for recombination within the Massachusetts serotype. **Avian Pathol.**, v. 21, p. 401-408, 1992.
- CAVANAGH, D.; DAVIS, P.J.; COOK, J. K. A.; LI, D.; KANT, A.; KOCH, G. Location of the amino acid differences in the S1 spike glycoprotein subunit of closely related serotypes of infectious bronchitis virus. **Avian Pathol.**, v. 21, p. 33-43, 1992.
- CAVANAGH, D.; MAWDITT, K.; SHARMA, M.; DRURY, S. E.; AINSWORTH, H. L.; BRITTON, P.; GOUGH, R. E. Detection of a coronavirus from turkey poults in Europe genetically related to infectious bronchitis virus of chickens. **Avian Pathol.**, v. 30, p. 355-368, 2001.
- CHEN, B. Y.; HOSI, S.; NUNOYA, T.; ITAKURA, C. Histopathology and immunohistochemistry of renal lesions due to infectious bronchitis virus in chicks. **Avian Pathol.**, v. 25, n. 2, p. 269-83, 1996.
- CHONG, K. T.; APOSTOLOV, K. The pathogenesis of nephritis in chickens induced by infectious bronchitis virus. **J. Comp. Pathol.**, v. 92, p. 199-211, 2003.
- CHOUSALKAR, K. K.; ROBERTS, J. R.; REECE, R. Comparative histopathology of two serotypes of infectious bronchitis virus (T and N1/88) in laying hens and cockerels. **Poultry Sc.**, v. 86, p. 50-58, 2007.
- CHOUSALKAR, K. K.; ROBERTS, J. R.; REECE, R. Histopathology of two serotypes of infectious bronchitis virus in laying hens vaccinated in the rearing phase. **Poultry Sc.**, v. 86, p. 50-58, 2007.
- COLLINS, A. R.; KNOBLER, R. L.; POWELL, H.; BUCHMEIER, M. J. Monoclonal antibodies to murine hepatitis virus-4 (strain JHM) define the viral glycoprotein responsible for cell attachment and cell-cell fusion. **Virology**, v. 119, n. 2, p. 358-371, 1982.
- COOK, J. K. A. Epidemiology of Infectious Bronchitis Virus. **The Coronaviridae**, S.G. Siddell, Editor. Plenum Press: New York. P, 317-335, 1995.
- COOK, J. K. A.; ORBELL, S. J.; WOODS, M. A.; HUGGINS, M. B. A survey of the presence of a new infectious bronchitis virus designated 4/91 (793B). **The Veterinary Record.**, v. 138, p. 178-180, 1996.
- 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 viruses of heterologous serotypes. **Avian Pathol.**, v. 28, p. 477 – 485, 1999.
- DI FABIO, J.; BUITRAGO, L. Y. V. Bronquite infecciosa das galinhas. Em: BERCHIERI JUNIOR, A.; SILVA, E. N.; DI FABIO, J.; SESTI, L.; ZUANAZE, M. A. F. Doenças das Aves. 2ª edição. Fundação APINCO de Ciência e Tecnologia Avícolas, 2009, p. 631 a 648.
- 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.**, v. 44, p. 582-589, 2000.

- FABRICANT, J. The early history of infectious bronchitis. **Avian Dis.**, v. 42, p. 648-650, 1998.
- GELB JR, J.; WEISMAN, Y.; LADMAN, B. S.; MEIR, R. S1 gene characteristics and efficacy of vaccination against infectious bronchitis virus field isolates from the United States and Israel (1996 to 2000). **Avian Pathol.**, v. 34, n. 3, p. 194 – 203, 2005.
- GELB JR. J.; WOLFF, J. F.; MORAN, C. A. Variant serotypes of infectious bronchitis virus isolated from commercial layer and broiler chickens. **Avian Dis.**, v. 35, p. 82 – 87, 1991.
- GONZÁLES, J. M.; GOMEZ-PUERTAS, P.; CAVANAGH, D.; GORBALENYA, A. E.; ENJUANES, L. A comparative sequence analysis to revise the current taxonomy of the family *Coronaviridae*. **Archives of Virol.**, v. 148, p. 2207-2235, 2003.
- HALL, T. A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium Series**, v. 41, p. 95-98, 1999.
- HIGGINS, D.G.; SHARP, P.M. CLUSTAL: a package for performing multiple sequence alignment on a microcomputer. **Gene**, v. 73, p. 237-244, 1998.
- HOLMES, K. V.; LAI, M. M. C. *Coronaviridae*: the viruses and their replication. In: FIELDS, B. N.; KNIPE, D. M.; HOWLEY, P. M. **Virology**. 3er. Ed. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers, 1996. p. 1075-1093.
- IGNJATOVIC, J.; ASHTON, D.F.; REECE, R.; SCOTT, P.;HOOPER, P. Pathogenicity of Australian strains of avian infectious bronchitis virus. **Journal of Comparative Pathology**. v. 126, p. 115-123, 2002.
- IGNJATOVIC, J.; GALLI, L. The S1 glycoprotein but not the N or M proteins of avian infectious bronchitis virus induces protection in vaccinated chickens. **Archives of Virol.**, v. 138, p. 117 – 134, 1994.
- IGNJATOVIC, J.; GOULD, G.; SAPATS, S. Isolation of a variant infectious bronchitis virus in Australia that further illustrates diversity among emerging strains. **Archives of Virol.**, v. 151, n. 8, p. 1567-85, 2005.
- IGNJATOVIC, J.; SAPATS, S. Avian infectious virus. **Rev Sci Tech**, v. 19, n. 2, p. 493-508, 2000.
- IGNJATOVIC, J.; SAPATS, S. I.; ASHTON, F. A long-term study of Australian infectious bronchitis viruses indicates major antigenic change in recently isolates strains. **Avian Pathol.**, v. 26, n. 3, p. 535-552, 1997.
- JONES, R. C.; WORTHINGTON, K.W.; CAPUA, I.; NAYLOR, C.J. Efficacy of live infectious bronchitis vaccines against a novel European genotype, Italy 02. **The Veterinary Record**, v. 156, p. 646 – 647, 2005.
- KING, D.J. Identification of recent infectious bronchitis virus isolates that are serologically different from current vaccine strains. **Avian Dis.**, v. 32, p. 362-264, 1988.

KING, D. J., CAVANAGH, D. Infectious bronchitis. In: CALNEK, B. W., BARNES, H. J. BEARD, C. W., et al. **Diseases of poultry**. 9.ed. Ames: Iowa University Press, 1991. p.471-484.

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

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

KWON, H. M.; JACKWOOD, M. W. Molecular cloning and sequence comparison of the S1 glycoprotein of the Gray and JMK strains of avian infectious bronchitis virus. **Virus Genes**, v. 9, p. 219-229, 1995.

KOCH, G.; HARTOG, L.; KANT, A.; VAN ROOZELAAR, D. J. Antigenic domains on the peplomer protein of avian infectious bronchitis virus: correlation with biological functions. **J. of General Virol.**, v. 71, p.1929-1935, 1990.

KUMAR, S; TAMURA, K.; JAKOBSEN, I. B.; NEI, M. MEGA2: molecular evolutionary genetics analysis software. **Bioinformatics**, v. 17, n. 12, p.1244 – 1245, 2001.

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

LAI, M. M. RNA recombination in animal and plant viruses. **Microbiol Rev**, v. 56, p. 61-79, 1992.

LEE, C. W.; JACKWOOD, M. W. Evidence of genetic diversity generated by recombination among avian coronavirus IBV. **Archives of virol.**, v. 145, p. 2135 – 2148, 2000.

MARSOLAIS, G.; MAROIS, P. Types of avian infectious bronchitis strains isolated in Quebec. **Can. J. comp. Med.**, v. 46, p. 150-153, 1982.

Manual de manejo – Linhagem Ross

<<http://www.aviagen.com.br/servlet/navSrv?cmd=listPublicacaoFrango&id=47>>. Acesso em: 10 abr. 2009.

MEULEMANS, G; BOSCHMANS, M; DECAESSTECKER, M; BERG, T. P.; DENIS, P; CAVANAGH, D. Epidemiology of infectious bronchitis virus in Belgian broilers: a retrospective study, 1986 to 1995. **Avian Pathol.**, v. 30, n. 4, p. 411-21, 2001.

MEIR, R.; ROSENBLUT, E.; PERL, S.; KASS, N.; AYALI, G.; HEMSANI, E.; PERK, S. Identification of a novel nephropathogenic Infectious Bronchitis Virus in Israel. **Avian Dis.**, v.48, p.635-641, 2004.

MINISTÉRIO da Agricultura e Pecuária. Minuta sobre procedimentos técnicos para o diagnóstico das micoplasmoses aviárias. Portaria no 182, de 8/11/1994, 1994.

NAKAMURA, K.; COOK, J. K.; OTSUKI, K.; HUGGINS, M. B.; FRAZIER, J. A. Comparative study of respiratory lesions in two chicken lines of different susceptibility infected with infectious bronchitis virus: histology, ultrastructure and immunohistochemistry. **Avian Pathol.**, v. 20, n.2, p. 241-57, 1991.

REED, L. J.; MUENCH, H. A simple method for estimating fifty percent endpoints. **Am. J. Hyg.** v. 27, p. 493-497, 1938.

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

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

União Brasileira de Avicultura http://www.uba.org.br/site3/relatorios_anuais.php#. Acesso em: 05 out. 2009.

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

VILLARREAL, L. Y. B. **Detecção de um coronavírus entérico aviário em aves de corte, poedeiras comerciais e matrizes: distribuição, diversidade molecular e diagnóstico diferencial com outros vírus entéricos aviários**. 96 f. Tese (Doutorado em Patologia) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

VILLARREAL, L. Y. B.; BRANDÃO, P. E.; CHACÓN, J.L.V.; ASSAYAG, M. S.; MAIORKA, P.; RAFFI, A. P.; SAIDENBERG, A. B. S.; JONES, R. C.; FERREIRA, A. J. P. Orchitis in Roosters with Reduced Fertility Associated with Avian Infectious Bronchitis Virus and Avian Metapneumovirus Infections. **Avian Dis.** , v. 51, p. 900-904, 2007.

VILLARREAL, L. Y. B.; ASSAYAG JR, M.S.; BRANDÃO, P. E.; CHACÓN, J. L. V.; BUNGER, A. N. D.; ASTOLFI-FERREIRA, C. S.; GOMES, C. R.; JONES, R. C.; FERREIRA, A. J. P. Identification of turkey astrovirus and turkey coronavirus in an outbreak of poultry enteritis and mortality syndrome. **Brazilian Journal of Poultry Sc.**, v. 8,p. 131-135, 2006.

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

YU L.; LIANG, Y.; LOW. S.; WANG, Z.; NAM, S. J.; LIU, W.; KWANGAC, J. Characterization of three infectious bronchitis virus isolates from China associated with proventriculus in vaccinated chickens. **Avian Dis.**, v. 45, p. 416-424, 2001.

ZANELLA, A., LAVAZZA, A., MARCHI, R., MORENO, A.; PAGANELLI, F. Avian infectious bronchitis: Characterization of new isolates from Italy. **Avian Dis**, v. 47, p.180-185, 2003.

ZIEGLER, A. F.; LADMAN, B. S.; DUNN, P. A; SCHNEIDER, A.; DAVISON, S.; MILLER, P. G.; LU, H.; WEINSTOCK, D.; SALEM, M.; ECKROADE R. J.; GELB, J. JR. Nephropathogenic infectious bronchitis in Pennsylvania chickens 1997-2000. **Avian Dis.**, v. 46, n.4: p.847-858, 2002.