

CLAITON GONÇALVES PEREIRA

**CARACTERIZAÇÃO BIOLÓGICA E MOLECULAR DE ESTIRPES VACINAIS
E ISOLADOS DE CAMPO DE *Infectious bronchitis virus***

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

**VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2015**

**Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa**

T

P436c
2015
Pereira, Claiton Gonçalves, 1971-
Caracterização biológica e molecular de estirpes vacinais e
isolados de campo de *Infectious bronchitis virus* : x / Claiton
Gonçalves Pereira. – Viçosa, MG, 2015.
ix, 87f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Inclui anexos.

Orientador: Abelardo Silva Júnior.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f.70-83.

1. Medicina veterinária. 2. Galinhas - Doenças. 3. Vacinas.
4. *Infectiuos bronchitis virus*. 5. Variação genética.
I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Medicina
Veterinária. Programa de Pós-graduação em Medicina
Veterinária. II. Título.

CDD 22. ed. 636.5089

CLAITON GONÇALVES PEREIRA


**CARACTERIZAÇÃO BIOLÓGICA E MOLECULAR DE ESTIRPES VACINAIS
E ISOLADOS DE CAMPO DE *Infectious bronchitis virus***

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

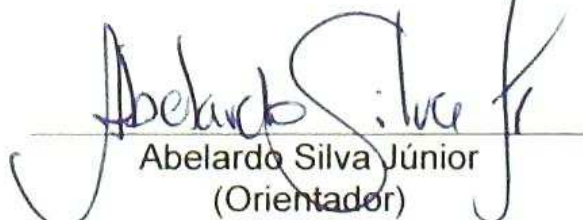
APROVADA: 24 de agosto de 2015.


Maurício Resende


Mary Hellen Fabres Klein


Nelson Rodrigo da Silva Martins
(Coorientador)


Márcia Rogéria de Almeida Lamêgo
(Coorientadora)


Abelardo Silva Júnior
(Orientador)

À minha saudosa mãezinha,
minha eterna “flô”,

A meus irmãos e sobrinhos,

Dedico.

AGRADECIMENTOS

A Deus pela presença constante, amparo e fortalecimento nos momentos difíceis.

À minha saudosa mãezinha, pelos princípios e valores transmitidos e por ter sido meu maior estímulo na busca dos meus objetivos, de maneira honesta e sensata.

À minha família, pela compreensão, incentivo e pelo amparo no momento mais difícil da minha vida. Em especial às minhas irmãs, por sonharem meus sonhos e permitir que eu trilhasse o caminho escolhido.

A Universidade Federal de Viçosa, por meio do Departamento de Veterinária e do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária por proporcionarem a realização deste objetivo.

A CAPES, pela concessão da bolsa durante o curso de doutorado, e a FAPEMIG, pelo apoio institucional e financiamento do projeto de pesquisa.

Agradeço em especial ao meu orientador, professor Abelardo Junior pelo aceite, a confiança depositada, os ensinamentos transmitidos e pela amizade.

Ao professor Nelson Martins pelas orientações deste longa data, valiosos ensinamentos e, acima de tudo, pela sua amizade.

Aos professores da banca de qualificação e pelos co-orientadores: Cidinha, Denise Bazzolli, Gustavo Bressan, Márcia Rogéria e Maurício Resende pelas valiosas contribuições para o enriquecimento dessa pesquisa.

Aos demais professores pelas contribuições para minha formação durante as disciplinas e outras orientações.

Ao professor Eduardo pela amizade irreverente, inquieta e estimulante.

À médica veterinária e amiga Aline, que contribuiu grandemente para a realização desta pesquisa.

Meu sincero agradecimento a minha amiga, Hanna Campos, pelo ombro fraterno e a paciência em dias e muitos momentos vividos paralelamente a essa jornada.

Aos colegas e amigos dos laboratórios de virologia, bacteriologia, biologia molecular, LIMA, NUBIOMOL: Marcus Rebouças, Otávio, Janine, Giuliana, Matheus, Pedro Vidigal, Gláucia, Juliana, Keila, Mary Hellen, Carol, Luiz Fernando, Magna, Mirian, Thalita, Alex e Roberta.

Aos funcionários dos laboratórios pelos auxílios e atenção prestados, e em nome das secretárias Rose “vida” e Bete pela ajuda nos trâmites burocráticos cotidianos.

Aos muitos amigos conquistados durante os anos de academia e que se tornaram exemplos de dedicação à arte do saber e de compartilhar conhecimentos.

Muitíssimo obrigado, a todos aqueles que, embora não nominalmente citados, foram peças fundamentais nesse caminhar.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	vi
LISTA DE QUADROS	vii
RESUMO	viii
ABSTRACT	ix
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1 <i>Infectious bronchitis virus</i>	3
2.2 Glicoproteína S1	3
2.3 Aspectos patogênicos	4
2.4 Imunoprofilaxia.....	7
2.5 Mecanismos de evolução.....	8
2.6 Persistência viral e transmissão vertical.....	11
2.7 Epidemiologia molecular de <i>Infectious bronchitis virus</i> no Brasil.....	12
Objetivo geral.....	14
Objetivos específicos	14
CAPÍTULO I – VACINAS COMERCIAIS DAS ESTIRPES H120 E MA5 DE <i>Infectious bronchitis virus</i> APRESENTAM AMPLA DIVERSIDADE GENÉTICA: IMPLICAÇÕES NA RESPOSTA IMUNE	15
RESUMO	15
ABSTRACT	16
1. INTRODUÇÃO.....	17
2. MATERIAL E MÉTODOS	18
2.1 Vacinas.....	18
2.2 Replicação das vacinas	18
2.2.1 Vacinas H120 (A, B, C e D).....	18
2.2.2 Vacina Ma5.....	18
2.3 Extração de RNA	19
2.4 Síntese de cDNA	19
2.5 RT-PCR convencional.....	20
2.6 Sequenciamento e análise da sequência do gene S1	20
2.7 Clonagem	21
PCR em tempo real e análise da curva de Desnaturação de Alta	
2.8 Resolução.....	22
3. RESULTADOS	24
3.1 Vacinas H120.....	24
3.1.1 Análise das sequências de S1 das vacinas H120 originais	24
3.1.2 Análise das sequências de S1 das vacinas H120 após o re-isolamento	27
3.2. Vacina Ma5.....	28
3.2.1 Análise das sequências de S1 da vacina Ma5 original e após a passagem em ovos embrionados.....	28
3.2.2. Clonagem e análise das sequências.....	29
4. DISCUSSÃO.....	33
5. CONCLUSÕES.....	38

	CAPÍTULO II – DISTRIBUIÇÃO DE SUBPOPULAÇÕES DE IBV EM DIFERENTES ÓRGÃOS DE GALINHAS NATURALMENTE ACOMETIDAS PELA DOENÇA	39
	RESUMO	39
	ABSTRACT	40
1.	INTRODUÇÃO.....	41
2.	MATERIAL E MÉTODOS	42
2.1	Amostras de campo	42
2.2	Isolamento de IBV de amostras clínicas de rins.....	42
2.3	Extração de RNA	43
2.4	Síntese de cDNA	44
2.5	Nested RT-PCR.....	44
2.6	Sequenciamento e análise da sequência do gene S1	45
3.	RESULTADOS	46
3.1	Análises macro e microscópica.....	46
3.2	Isolamento de IBV em ovos embrionados de galinha SPF.....	47
3.3	Análise da sequência parcial de nucleotídeos de S1 de IBV identificados diretamente de amostras clínicas.....	47
3.4	Análise da sequência parcial de aminoácidos de S1 de IBV identificados diretamente de amostras clínicas.....	48
3.5	Análise da sequência parcial de S1 de IBV identificado após o isolamento de amostras clínicas de rins.....	49
4.	DISCUSSÃO.....	51
5.	CONCLUSÕES.....	56
	 CAPÍTULO III – ESTABELECIMENTO DE INFECÇÃO PERSISTENTE E EVIDÊNCIA DE TRANSMISSÃO VERTICAL DE ESTIRPE VACINAL Ma5 DE <i>Infectious bronchitis virus</i>.....	 57
	RESUMO	57
	ABSTRACT	58
1.	INTRODUÇÃO.....	59
2.	MATERIAL E MÉTODOS	60
2.1	Amostras de campo	60
2.2	Extração de RNA	60
2.3	Síntese de cDNA	60
2.4	Nested RT-PCR.....	61
2.5	Sequenciamento e análise da sequência do gene S1	61
3.	RESULTADOS	63
3.1	Análise da sequência parcial de S1 de IBV.....	63
3.2	Construção e análise da árvore filogenética.....	63
4.	DISCUSSÃO.....	65
5.	CONCLUSÕES.....	69
	 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	 70
	 ANEXO 1- Sequências de S1 de IBV obtidas no presente estudo	 84
	ANEXO 2- Certificado da Comissão de Ética no Uso de Animais	87

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Representação esquemática do genoma do IBV	3
Figura 2- Representação esquemática das ampliações de S1 do IBV.....	23
Figura 3- Sessões de cromatogramas exemplificando posições de picos secundários detectados na sequência de S1 em todas as vacinas H120	25
Figura 4- Exemplo de predominância alternada de subpopulação da vacina B nas sequências de S1 obtidas de reações distintas na mesma corrida	26
Figura 5- Sessões de cromatogramas de S1 exemplificando o comportamento das subpopulações das vacinas H120 após o re-isolamento	28
Figura 6- Sessões de cromatogramas da sequência de S1 da vacina Ma5.....	29
Figura 7- Gráfico da análise da curva HRM.....	30
Figura 8- Fluxograma de inoculação e coleta de materiais dos embriões infectados	43
Figura 9- Lesões macroscópicas em galinhas.....	46
Figura 10- Lesões microscópicas de amostra clínica de rim.....	46
Figura 11- Isolamento de IBV em ovos embrionados de galinha SPF	47
Figura 12- Relação filogenética.....	64
Figura 13- Diagrama esquemático das possíveis vias evolutivas e emergência de novas estirpes de IBV	69

LISTA DE QUADROS

Quadro 1- Fontes de extração de RNA de estirpes vacinais	19
Quadro 2- Sequências dos oligonucleotídeos utilizados nas reações de RT-PCR e sequenciamento.....	23
Quadro 3- Comparação dos aminoácidos entre as vacinas H120 de diferentes fabricantes	27
Quadro 4- Valores das temperaturas de desnaturação (T _m) obtidas para a vacina Ma5 original e dos clones selecionados para sequenciamento	31
Quadro 5- Polimorfismos verificados nas sequências do fragmento S1 dos clones em relação ao mesmo fragmento obtido do produto da qPCR da vacina Ma5 original	32
Quadro 6- Fontes de extração de RNA do IBV de amostras clínicas e após o isolamento	44
Quadro 7- Alinhamento das sequências parciais de S1 detectadas em amostras clínicas mostrando as posições dos nucleotídeos exibindo polimorfismos em relação a vacina Ma5.....	48
Quadro 8- Alinhamento das sequências parciais de aminoácidos de S1 obtidas de amostras clínicas mostrando as posições dos aminoácidos exibindo polimorfismos em relação a vacina Ma5 e a estirpe Mass 41.....	49
Quadro 9- Alinhamento das sequências parciais de S1 obtidas de amostras clínicas de rins e após passagem em ovos embrionados.....	50
Quadro 10- Alinhamento da sequência parcial de aminoácidos do gene S1 de IBV identificados em órgãos de galinhas em final do ciclo de produção	63

RESUMO

PEREIRA, Claiton Gonçalves, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, agosto de 2015. **Caracterização biológica e molecular de estirpes vacinais e isolados de campo de *Infectious bronchitis virus***. Orientador: Abelardo Silva Junior. Coorientadores: Juliana L.R. Fietto, Márcia R.A. Lamêgo, Maria A.S. Moreira e Nelson R.S. Martins.

Infectious bronchitis virus (IBV) é uma das principais causas de perdas econômicas na indústria avícola, afetando galinhas de todas as idades, apesar das tentativas de controle por vacinação. Os objetivos deste estudo de três capítulos propôs-se: 1) analisar a composição genética das vacinas vivas H120 e Ma5 de IBV disponíveis comercialmente no Brasil, 2) promover a caracterização molecular de IBV acometendo um plantel de matrizes e, 3) investigar persistência viral nesse lote ao final do ciclo de produção e verificar a ocorrência de transmissão vertical. No capítulo 1 foi obtida a sequência completa do gene S1 das vacinas produzidas por diferentes laboratórios, sendo verificada que as vacinas H120 possuem subpopulações de IBV distintas, refletindo em até 14 diferenças na sequência de aminoácidos entre as vacinas. Na análise do cromatograma de S1 obtida da vacina Ma5 também foi detectado pico secundário, sugerindo a presença de subpopulação do vírus. Para abordar essa questão foi desenvolvido um sistema para identificar a população de espécies de RNA dessa vacina. Apesar de ser clonada foram identificadas pelo menos cinco subpopulações do vírus intra-vacina. Portanto, essa grande diversidade genética entre as vacinas poderia justificar os diferentes resultados da vacinação. No capítulo 2, a sequência parcial de S1 de IBV foi obtida diretamente de amostras clínicas. A vacina Ma5, previamente utilizada nesse lote, foi detectada na traqueia e no intestino delgado; enquanto subpopulação de IBV variante foi identificada em órgão específico das aves. Esse achado tem grande importância sob o ponto de vista aplicado porque ele ilustra o potencial repertório patogênico que a infecção por IBV de campo pode imputar sobre um lote de galinhas acometidas pela doença. Finalmente, no capítulo 3, diferentes órgãos dessas galinhas em final de produção e líquido cório-alantoide (LCA) de embriões vivos com 18 dias de incubação oriundos desse lote foram utilizados para a detecção e identificação de IBV. A vacina Ma5 foi detectada no intestino delgado, rins e oviduto das galinhas e no LCA de embriões. No entanto, nas tonsilas cecais foi detectado IBV com significativa diferença genética na comparação com a vacina Ma5 previamente utilizada e aqueles identificados nos diferentes órgãos das aves na época da doença. Esses achados sugerem que além da vacina, outras subpopulações de IBV podem persistir por longos períodos no hospedeiro e, pelo menos em galinhas em final de produção a vacina Ma5 pode ser transmitida verticalmente.

ABSTRACT

PEREIRA, Claiton Gonçalves, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, August of 2015. **Biological and molecular characterization of vaccine strains and isolates field of *Infectious bronchitis virus***. Advisor: Abelardo Silva Junior. Co-advisors: Juliana L.R. Fietto, Márcia R.A. Lamêgo, Maria A.S. Moreira and Nelson R.S. Martins.

Infectious bronchitis virus (IBV) is a major cause of economic losses in the poultry industry, affecting chickens of all ages, despite attempts to control by vaccination. The objectives of this three-chapter study were: 1) analyze the genetic makeup of the 120 and Ma5 IBV vaccines strains available commercially in Brazil, 2) promote the molecular characterization of IBV affecting one broiler breeding flock and, 3) to investigate IBV persistence in this flock at the end of the production cycle and to verify the occurrence of vertical transmission. In chapter 1, the complete sequence of the S1 gene of vaccines produced by different laboratories was obtained and verified that the vaccines of the strain H120 have different subpopulations, resulting in up to 14 amino acid sequence substitutions among the vaccines. On the other hand, the analysis of Ma5 strain S1 gene an additional peak was detected suggesting the presence of subpopulation of the virus. To address this issue a system to identify the population of RNA species of the vaccine was developed. Despite being cloned, at least five subpopulations of genotypes were detected with in a Ma5 batch. Therefore, this great genetic diversity among the vaccines could justify the different vaccination reactions/results. In chapter 2, partial sequence of S1 of the IBV was obtained directly from clinical specimens. In alignment with the Ma5, which was previously used therein, the same was detected in the trachea and small intestine; while subpopulation of IBV variant was identified in specific organ of birds. This finding has great importance from the applied point of view because illustrates the potential pathogenic repertoire that infection by field IBV can charge on the same lot of chickens affected by the disease. Finally, in chapter 3, different organs of breeders at the end of production and allantoic fluid of embryos with 18 days of incubation deriving this flock were used for the detection and identification of IBV. The Ma5 vaccine was detected in small intestine, kidneys and oviduct of the chickens, and also in the allantoic fluid embryos. However, in the cecal tonsils, IBV was detected in significant genetic difference in comparison with the previously used Ma5 vaccine and those detected in different organs of the birds at the time of disease. These results suggest that in addition to vaccine, other (s) subpopulation (s) of IBV can persist for long periods in the lost least chickens at the end of production Ma5 vaccine can be transmitted vertically.

1. INTRODUÇÃO

Os coronavírus, incluindo o *Infectious bronchitis virus* (IBV), existem como uma mistura de mutantes genéticos dentro de um isolado. Isso resulta numa população heterogênea de vírus transcritos a partir de um único genoma progenitor, que é gerado através de eventos de mutação e/ou recombinação (Jackwood *et al.*, 2003). A instabilidade genética do IBV tem sido evidenciada no surgimento de variantes genéticas e antigênicas no curso de sua evolução, e as alterações genéticas estão associadas principalmente à glicoproteína S1, detentora de importantes propriedades biológicas, estando diretamente envolvida na adsorção à célula hospedeira, tropismo celular, além de possuir determinantes antigênicos sorotipo específico que são responsáveis pela indução de anticorpos vírus neutralizantes (Toro *et al.*, 2012).

Pesquisas recentes têm demonstrado que as vacinas vivas contra o IBV pertencentes ao sorotipo Arkansas oriundas da mesma estirpe semente, mas produzidas por companhias diferentes, são constituídas por subpopulações distintas, sendo também verificado que subpopulações diferindo daquelas contidas nas vacinas originais emergiram durante uma simples passagem em galinhas (Gallardo *et al.*, 2010; Mckinley *et al.*, 2008; van Santen e Toro, 2008). No entanto, pouco foi investigado sobre a composição genética das vacinas de IBV do sorotipo Massachusetts, único permitido pelo Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA) para uso em vacinas vivas no Brasil. Para esta proposta de estudo, primeiramente, foi obtida a sequência completa do gene da glicoproteína S1 do IBV diretamente das vacinas H120 e Ma5 disponíveis comercialmente no país, e a dinâmica molecular e biológica da vacina Ma5 foi investigada utilizando como modelo *in vivo* ovos embrionados de galinha SPF.

A dificuldade do controle da bronquite infecciosa das galinhas (BIG) assenta na multiplicidade de variantes de IBV que surgem ou são introduzidos em planteis avícolas de forma imprevisível. Apesar do uso rotineiro e difundido de vacinas contra o IBV e, em decorrência da contínua emergência de novos genótipos, patótipos e sorótipos, a BIG ainda não foi controlada satisfatoriamente e destaca-se como um dos mais importantes problemas sanitários, em virtude de acarretar acentuada redução na capacidade produtiva das aves com consequentes perdas econômicas para a indústria avícola. No Brasil, alguns trabalhos publicados isoladamente têm demonstrado a magnitude das variações genéticas do IBV acometendo nossos plantéis avícolas, e essa investigação é imprescindível, visto que pode haver baixa ou nenhuma proteção cruzada entre as estirpes vacinais com os isolados de campo (Fraga *et al.*, 2013; Chacón *et al.*, 2011; Villarreal *et al.*, 2010). Portanto, diferentes amostras clínicas de pintinhos de matrizes pesadas, previamente vacinados aos dois dias de vida e

apresentando sinais clínicos compatíveis com a BIG na fase inicial da vida, foram utilizadas como fonte de RNA genômico de IBV para a identificação molecular.

O estabelecimento de estado de portador pela infecção por IBV e a potencial capacidade do vírus persistente sofrer mutação e/ou recombinação em galinhas têm consequências importantes para o controle da BIG. Muitos trabalhos têm especulado esses fenômenos a nível de campo, enquanto outros verificaram a persistência e eliminação da vacina contra o IBV a longo prazo em galinhas infectadas experimentalmente (Ndegwa *et al.*, 2014, Toro *et al.*, 2012; Naqi *et al.*, 2003), bem como existem fortes evidências sugerindo recombinação natural entre estirpe vacinal com amostra de campo (Liu *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 1993). Embora não seja possível determinar persistência de IBV em nível de campo, em função das inúmeras fontes possíveis de introdução do vírus, parece razoável investigar essa possibilidade para se obter informações adicionais da relação vírus/hospedeiro e a tendência evolutiva desse vírus. A possibilidade da transmissão vertical do IBV também foi investigada. Para essa pesquisa, a investigação foi realizada no mesmo lote de matrizes pesadas, que foi previamente vacinado e acometido pela BIG na fase inicial da vida. Para tanto, diferentes órgãos dessas galinhas quando atingiram o final do ciclo de produção, bem como o líquido corio-alantoide (LCA) de embriões oriundos desse lote de galinhas foram utilizados como fonte de RNA genômico de IBV para a identificação molecular.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Infectious bronchitis virus

Infectious bronchitis virus (IBV), um membro do gênero *Coronavirus*, pertence a família *Coronaviridae* e da ordem *Nidovirales*. Os coronavírus são divididos em quatro subfamílias principais: *Alphacoronavirus*, *Betacoronavirus*, *Gammacoronavirus* e *Deltacoronavirus*, baseados na organização dos seus genomas e em suas características genótípicas e fenotípicas. Os coronavírus aviários, incluindo o IBV, pertencem a subfamília *Gammacoronavirus* (ICTV, 2015).

Os coronavírus possuem um dos maiores genomas entre os vírus de RNA, sendo que o IBV possui um genoma de cerca de 27,6 Kb, constituído por uma molécula de RNA de fita simples não segmentada. O RNA genômico é senso positivo, possuindo nas suas extremidades opostas uma metil-guanina (5' CAP) e na 3' uma cauda poli A. Essa organização do RNA genômico viral permite funcionar como um RNA mensageiro e, portanto, quando purificado é infeccioso (Ammayappan *et al.*, 2008; Mardani *et al.*, 2008).

O genoma é organizado em seis regiões principais, cada uma delas contendo uma ou mais janelas abertas de leitura (ORF- *open reading frames*), as quais são separadas por sequências intergênicas que possuem sinais para a transcrição de RNA mensageiros subgenômicos específicos. A partir da extremidade 5' (**Figura 1**), ocupando aproximadamente 2/3 do genoma viral, existem duas ORFs sobrepostas (ORF1a e ORF1b). Essas ORFs são traduzidas pela polimerase do hospedeiro em uma poliproteína, que é precursora de proteínas do complexo transcrição-replicação, incluindo a RNA polimerase dependente de RNA viral. O terço restante do genoma codifica para as proteínas de espícula (S- *spike*), 3a e 3b, envelope (E), membrana (M), 5a e 5b e, finalmente, a nucleoproteína (N) (Mo *et al.*, 2012).

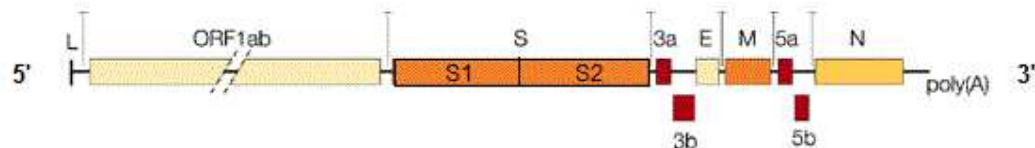


Figura 1- Representação esquemática do genoma do IBV.

2.2. Glicoproteína S1

O gene que codifica para a proteína S consiste de aproximadamente 3400 a 3500 nucleotídeos e codifica uma proteína de 1145 a 1157 resíduos de aminoácidos. Essa proteína é clivada após tradução em duas subunidades: 1) na porção amino-terminal em S1, com cerca de 520 a 532 resíduos de aminoácidos e, 2) na porção

carboxi-terminal em S2, com aproximadamente 625 resíduos de aminoácidos (Cavanagh, 1984). 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 (Cavanagh, 2007; Kant *et al.*, 1992). Outra característica comum da proteína S é o elevado grau de glicosilação (Cavanagh, 1995).

A glicoproteína S atua, através da subunidade S1, na adsorção do IBV com os receptores presentes na membrana das células alvo e, em seguida, através da subunidade S2 desencadeia o processo de fusão do envelope viral com a membrana da célula do hospedeiro (Koch *et al.*, 1990a e b; Cavanagh e Davis, 1986; Mockett *et al.*, 1984; Cavanagh 1984, 1983, 1981). Por essa razão, a subunidade S1 está envolvida na infectividade viral sendo, portanto, alvo primário para resposta imune protetora através de anticorpos neutralizantes e desempenha um papel fundamental na determinação das espécies e tropismo celular dos coronavírus, incluindo o IBV (Fang *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2005; Phillips *et al.*, 2002).

Além disso, a subunidade S1 é constituída por determinadas sequências de aminoácidos que conferem a especificidade de sorotipo do vírus e apresenta epitopos para a interação com linfócitos T citotóxicos (Luo e Weiss, 1998, Koch *et al.*, 1990a). Tais sequências são denominadas de regiões hipervariáveis (HVR), devido a frequente variação genética verificada nessas regiões, caracterizadas por mutações, inserções e/ou deleções e, portanto, podem ser constituídas por número diferente de nucleotídeos entre os distintos isolados/estirpes do vírus. No entanto, foram mapeadas 3 dessas regiões, que no caso da estirpe Beaudette do sorotipo Massachusetts, a região HVR 1 é delimitada pelos resíduos de aminoácidos 56-69, a região HVR 2 compreende os aminoácidos 117-131, enquanto região HVR 3 se estende do resíduo de aminoácidos 250 ao 386 (Kant *et al.*, 1992; Cavanagh, 1983). Apesar da grande variabilidade genética exibida pela S1 entre estirpes/isolados do IBV, algumas regiões com sequência conservada foram identificadas dentro desse gene, permitindo inclusive desenhar oligonucleotídeos universais capazes de amplificar diferentes sorotipos do vírus (Keeler *et al.* 1998, Adzhar *et al.*, 1996).

2.3. Aspectos patogênicos

O IBV é o agente causador da bronquite infecciosa das galinhas (BIG), sendo a galinha doméstica considerada a única espécie hospedeira natural do vírus, reportada ser naturalmente afetada, embora poucos experimentos com outras espécies de aves foram realizados (Cavanagh e Gelb, 2008).

Apesar da estreita associação do IBV com galinhas (*Gallus gallus domesticus*), coronavírus aviários têm sido detectados em várias espécies de aves. Enquanto alguns desses vírus mostram alta identidade na sequência de nucleotídeos em S1 com isolados de IBV ou estirpes vacinais (Sun *et al.*, 2007; Liu *et al.*, 2005), outros mais divergentes podem representar espécies de vírus diferentes (Cavanagh, 2005). Por exemplo, coronavírus de peru (TCoV) é mais divergente no seu gene S1, e causa em contraste à doença respiratória observada pelo IBV, doença gastrintestinal em perus (*Meleagris gallopavo*) (Maurel *et al.*, 2011; Cavanagh, 2001; Guy, 2000). Coronavírus de codorna, que têm uma alta identidade na sequência de S1 com TCoV, causa enterite com subsequente diarreia e crescimento reduzido em codorna jovem (*Coturnix coturnix*) (Torres *et al.*, 2013). Em galinha de angola (*Numida meleagris*), a infecção por coronavírus resulta em enterite e pancreatite aguda (Liais *et al.*, 2014). Outros coronavírus similares geneticamente ao IBV causa doença respiratória e renal em faisões (*Phasianus colchicus*) (Britton e Cavanagh, 2007; Cavanagh, 2005), e doença respiratória e pancreatite em pombos (*Columba livia*; Qian *et al.*, 2006). Em aves selvagens, *Gammacoronavirus* foram detectados, mas sem sinais clínicos nos respectivos hospedeiros (Chu *et al.*, 2011; Hughes *et al.*; 2009; Muradrasoli *et al.*, 2009; Woo *et al.*, 2009; Cavanagh, 2005; Jonassen *et al.*, 2005; Liu *et al.*, 2005).

A infecção de galinhas por IBV é conhecida por ser iniciada pela replicação do vírus no trato respiratório superior, que é usualmente restrita às células ciliadas e secretoras de muco, independentemente do tropismo da estirpe, e após uma curta viremia, o vírus invade outros órgãos do hospedeiro (Raj e Jones, 1997; Toro *et al.*, 1996). Em geral, a maioria dos IBV mostra virulência relativamente moderada (em comparação com outros vírus aviários, por exemplo, vírus da doença de Newcastle velogênico ou o vírus influenza aviária de alta patogenicidade), o que resulta em baixa letalidade e sinais clínicos transitórios para a população hospedeira. No entanto, galinhas jovens infectadas por IBV, especialmente na presença de patógenos respiratórios, podem interagir sinergicamente aumentando a severidade e duração da doença (Matthijs *et al.*, 2009).

Apesar de a nomenclatura fazer uma alusão que se trata de um patógeno apenas do trato respiratório, o IBV além de replicar em tecidos e órgãos desse sistema e causar lesões proeminentes; os quais funcionam também como porta de entrada para esse agente, a variabilidade genética evidenciada nos IBV pode ter favorecido diferenças no tropismo e patogenicidade para muitos outros tipos de células epiteliais. A par disso, foram descritas estirpes que apresentam tropismo e patogenicidade para as células que estão presentes na constituição dos rins (Feng *et al.*, 2012; Meir, 2004), do oviduto e dos testículos (Mork *et al.*, 2014; Cavanagh e Gelb, 2008), do trato

gastro-intestinal (Cavanagh, 2005) e associadas à lesão de musculatura peitoral profunda (Almeida *et al.*, 2012; Hong *et al.*, 2012). Portanto, a importância da BIG reside nas perdas econômicas, visto que a infecção frequentemente causa em frangos de corte doença respiratória, diminuição da eficiência alimentar e do ganho de peso, aumento da mortalidade e da condenação de carcaças ao abate (Cavanagh e Gelb, 2008), além de aumentar a susceptibilidade das aves a infecções bacterianas oportunistas (Matthijs *et al.*, 2003), aumentando assim o custo de produção pelo uso de medicamentos. Em matrizes e poedeiras a infecção tem sido associada com diminuição da produção e qualidade interna e externa dos ovos e redução da eclodibilidade (Raj e Jones, 1997).

A proteína S foi originalmente considerada a única determinante de patogenicidade. Enquanto isto permanece verdadeiro para alguns coronavírus, não é o caso com IBV. A substituição do gene S da estirpe Beaudette apatogênica com o gene correspondente da estirpe M41 patogênica, alterou o tropismo do vírus quimérico resultante, mas não resultou na alteração da virulência. Está implícito que, embora o gene S do IBV pode desempenhar um papel na virulência, relacionado com o tropismo, a expressão do gene S de uma estirpe virulenta por si só não foi suficiente para alterar o fenótipo avirulento associada com a estirpe Beaudette (Hodgson *et al.*, 2004).

Existem evidências de que a virulência de IBV é influenciada pelas proteínas não estruturais (NSP) codificadas dentro da região do genoma NSP 2-16 (Phillips *et al.*, 2011; Ammayappan *et al.*, 2009; Armesto *et al.*, 2009). Especificamente, quando as proteínas estruturais do IBV da estirpe M41 patogênica foram combinados com o gene que codifica para NSP 2-16 da estirpe Beaudette apatogênica, o vírus resultante foi apatogênico, indicando que o fenótipo atenuado da estirpe Beaudette reside nos genes codificando para as NSP (Armesto *et al.*, 2009). Além disso, a comparação das sequências do genoma completo de IBV virulento e atenuado mostrou alterações na região NSP do genoma, particularmente em NSP 3, sugerindo que esse gene é importante para a patogenicidade (Phillips *et al.*, 2011; Ammayappan *et al.*, 2009). Em outro estudo, as sequências do gene da replicase dos IBV recuperados de galinhas infectadas foram idênticos aos do vírus da vacina, independentemente do sorotipo, sugerindo que, ou houve uma troca de material genético entre a vacina e isolados de campo ou que existe uma evolução convergente para um genótipo específico da replicase. Entretanto, não houve correlação entre o genótipo de qualquer região desse gene e patótipo, sugerindo que a replicase não é o único determinante de patogenicidade em IBV (Mondal e Cardona, 2004).

2.4. Imunoprofilaxia

Bijlenga diagnosticou a BIG pela primeira vez na Holanda em 1956, e o vírus isolado foi utilizado para preparar uma vacina, nomeada estirpe H52, onde a letra H vem do nome (Huyben) do proprietário da fazenda de frangos de corte na província de Brabant, na parte sul da Holanda, a partir do qual o vírus foi isolado. Ao passo que o número 52 refere-se ao número de passagens seriadas do vírus em ovos embrionados de galinha a fim de promover sua atenuação. Nessa mesma época foi verificado que a estirpe vacinal H52 era muito virulenta para pintos. Portanto, passagens adicionais em ovos embrionados foram necessárias para reduzir a patogenicidade do vírus para ser utilizado como vacina em galinhas jovens. Decidiu-se então obter a passagem ao nível 120, o que provou reduzir a sua virulência, que é atualmente conhecida como a vacina H120 (Bijlenga *et al.*, 2004).

A utilização de vacinas vivas para o controle de doenças virais é bem conhecido por ser eficaz. No entanto, há questões relativas à capacidade de algumas vacinas virais reverter à virulência (Nix *et al.*, 2000; Hopkins e Yoder, 1986). Dentro dessa perspectiva, no início dos anos 90 foi introduzida no comércio brasileiro uma vacina do sorotipo Massachusetts, amostra Ma5, obtida após a purificação e clonagem biológica em cultura de células de embriões de galinhas livres de patógenos específicos (SPF- do inglês Specific Pathogen Free). Embora as vacinas atuais têm reduzido a taxa de prevalência da BIG, novos casos de doenças associadas ao IBV em lotes de galinhas previamente vacinados continuam a ser relatados.

As medidas que têm sido mais amplamente adotadas para o controle da BIG fundamentam-se em medidas de biossegurança combinadas com programas imunoprolifáticos elaborados em conformidade com as condições específicas de cada região ou país. No Brasil, a vacinação contra o IBV tem sido feita desde o início da década de 80, sendo que as estirpes que têm o seu uso permitido pelo Ministério da Agricultura, Pecuária 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 as estirpes B48, H120, H90 e H52, as quais são atenuadas por passagens seriadas em ovos embrionados de galinha SPF, ou, alternativamente, a estirpe naturalmente apatogênica e clonada Ma5, todas pertencentes ao sorotipo Massachusetts. No entanto, as estirpes H90 e H52 foram retiradas do mercado pelo maior resíduo de patogenicidade devido ao baixo número de passagens em ovos embrionados.

A prevenção da BIG em matrizes e poedeiras comerciais é frequentemente realizada pela primovacinação com vacina viva seguida por uma ou mais doses de

reforço com vacina inativa antes das aves entrarem em postura. Enquanto em frangos de corte, somente a vacina viva é utilizada em alguns planteis.

2.5. Mecanismos de evolução

Uma característica inerente de vírus RNA é a sua capacidade de se adaptar rapidamente ao hospedeiro através de alterações genéticas durante a replicação. Assim, os coronavírus, incluindo o IBV, têm mostrado existirem como uma mistura de mutantes genéticos dentro de um isolado (Jackwood *et al.*, 2012). Isso resulta numa população heterogênea de vírus transcritos a partir de um único genoma progenitor, que é gerado através de eventos de mutação, a qual decorre principalmente da capacidade limitada de correção da RNA polimerase dependente de RNA viral que replica o genoma do vírus, além do genoma dos coronavírus serem os maiores entre os vírus de RNA conhecidos (Woo *et al.*, 2009), dando-lhes plasticidade adicional.

Outro mecanismo responsável pela geração de variantes é a recombinação de RNA por escolha de cópia (Lai, 1992; Keck *et al.*, 1988). A evidência experimental para esse fenômeno sugere que a recombinação de vírus de RNA ocorre com mais frequência durante a síntese da cadeia negativa (Cascone *et al.* 1993; Li e Ball, 1993; Jarvis e Kirkegaard, 1992). De acordo com esse modelo, vírus variantes podem ser gerados quando um RNA nascente dissocia-se do molde de cadeia positiva e reassocia-se a sítios alternativos. A religação do RNA nascente pode ocorrer em regiões de homologia no sítio de dissociação (recombinação homóloga), em regiões alternativas de homologia (recombinação aberrante-homóloga) ou em sítios não homólogos distintos (recombinação não homóloga).

O fato de a evolução do IBV ser um fenômeno relativamente frequente se traduz no aparecimento de alterações genéticas marcantes nos genes codificadores das proteínas estruturais N e S e, em menor escala, nas proteínas não estruturais ou até mesmo em regiões não traduzidas (Abreu *et al.*, 2006; Phillips *et al.*, 2012; Mardani *et al.*, 2006). A evolução do IBV foi seguida durante a atenuação através de 101 passagens seriadas em ovos embrionados de galinha, e a comparação das sequências do genoma dos IBV da estirpe ArkDPI virulenta e atenuada revelou substituição em 21 nucleotídeos, resultando em 17 alterações de aminoácidos, com a maioria das substituições localizada nos genes da replicase 1a e da glicoproteína S (Ammayappan *et al.*, 2009).

A estratégia utilizada pelo IBV para uma adaptação bem sucedida no ambiente do hospedeiro foi revelada pela primeira vez em 1956, quando foi demonstrado diferenças antigênicas entre vírus isolados nos Estados de Massachusetts e Connecticut. Desde então, vários estudos epidemiológicos convencionais e

moleculares confirmaram a capacidade do IBV evoluir rapidamente e burlar com sucesso os programas de vacinação implementados desde o início de 1950 (Toro *et al.*, 2012). Para ilustrar a consequência da grande variabilidade genética que ocorre entre IBV, associada principalmente à glicoproteína S1, é a descrição de dezenas de sorotipos do vírus em diversas partes do mundo, inclusive no Brasil (Fraga *et al.*, 2013; Cavanagh e Gelb, 2008; Di Fábio *et al.*, 2000; Gelb *et al.*, 1991). A propósito disso, tem sido demonstrado que o uso de vacinas contra o IBV pode apresentar baixa proteção cruzada com isolados de campo (Cavanagh e Gelb, 2008), bem como não tem impedido o aparecimento frequente de novos sorotipos e de estirpes variantes (Fraga *et al.*, 2013; Gelb *et al.*, 1991).

A primeira avaliação do grau de variação exibido dentro do gene da proteína S do IBV do sorotipo Massachusetts, foi com oito isolados coletados durante um período de três décadas (Cavanagh *et al.*, 1988), sendo a diferença máxima entre eles de 4% de nucleotídeos e de 6% de aminoácidos na glicoproteína S1. No entanto, foi demonstrado que o uso de vacina atenuada pode resultar em taxas mais rápidas de evolução do IBV. Na ausência de uma vacina específica e, presumivelmente, pouca ou nenhuma pressão imune, a taxa de mutação para a região hipervariável no gene S1 do IBV estirpe 793/B foi reportada ser de 3×10^{-3} substituição/local/ano (Cavanagh *et al.*, 1998), enquanto a taxa de mutação do vírus GA98, que surgiu em face da vacinação com um tipo estreitamente relacionado (DE072), foi reportada ser de $1,5 \times 10^{-2}$ substituição/local/ano na região hipervariável de S1 (Lee *et al.*, 2001). A avaliação do genoma completo de 11 isolados do IBV dos sorotipos Massachusetts (Mass) e Connecticut (Conn) ao longo de um período de 41 e de 25 anos, respectivamente, indicaram que a taxa de mutação variou de 10^{-4} a 10^{-6} substituição/local/ano para os tipos de Mass e Conn, onde vacinas contra estes tipos são rotineiramente usadas para controlar a doença (McKinley *et al.*, 2011), mas, na ausência de imunidade induzida por vacina, os IBV evoluem em uma taxa muito menor (0,3%) (Lee e Jackwood, 2001).

Um esforço para entender melhor o papel da seleção imune sobre o IBV, galinhas experimentalmente vacinadas com vacina derivada da estirpe ArkDPI foram desafiadas com a estirpe virulenta. Em galinhas não vacinadas e desafiadas, a sequência de S1 da população de vírus detectada não diferiu da população predominante do vírus desafio. Em contraste, em algumas aves vacinadas a população de vírus detectada exibiu várias alterações não sinônimas, ou seja, alterações genéticas que alteraram o aminoácido codificado em S1 em comparação com a estirpe desafio (Toro *et al.*, 2012). Como hipótese discutida por Grenfell *et al.* (2004), uma pressão imunológica moderada fornecida por níveis intermediários de

imunidade resulta numa maior taxa de emergência de vírus variantes antigênicos, ao passo que uma imunidade sólida severamente limita a replicação do vírus e, por conseguinte, a geração de variantes antigênicas para a seleção. Os resultados supracitados fornecem mais evidências científicas para essa suposição. A maioria das galinhas do grupo vacinado, exibindo uma resposta imune mais forte, foi capaz de impedir com sucesso a replicação do vírus desafio, e apenas a população de vírus da estirpe desafio foi detectada em algumas aves positivas para o IBV. Em contraste, no grupo mostrando resposta imune específica sub-ótima, o IBV foi detectado na maioria das galinhas, e populações diferentes da população predominante da estirpe desafio foram selecionadas e tornaram-se predominante. Coletivamente, esses resultados indicam que a imunidade específica é uma força relevante na condução da evolução do IBV (Toro *et al.*, 2012).

A taxa evolutiva do IBV pode ser tão rápida que populações virais diferindo geneticamente da população predominante da vacina emergiram após uma única passagem em galinhas, proporcionando um notável modelo para entender os mecanismos que conduzem a evolução do IBV (McKinley *et al.*, 2008). No entanto, os mecanismos que regulam a evolução do IBV incluem não somente a geração de diversidade genética, caracterizada por mutação e recombinação, mas também pelo processo de seleção (McKinley *et al.*, 2008; van Santen e Toro, 2008). A relevância do processo de seleção foi melhor entendida mais recentemente através da identificação de diferenças genéticas e fenotípicas entre as populações de IBV antes e durante a replicação no hospedeiro natural (van Santen e Toro, 2008). Evidências sugerem que as várias pressões seletivas relacionadas ao hospedeiro, incluindo as respostas imunes ou a falta dela e afinidade para os receptores celulares, bem como as condições físicas e bioquímicas são responsáveis pelo processo de seleção (Toro *et al.*, 2012).

A imunodepressão em aves comerciais é comum devido a inúmeros fatores ambientais, incluindo vírus endêmicos que possuem tropismo para as células B e T, por exemplo, o vírus da anemia infecciosa das galinhas, o vírus da doença infecciosa bursal, e vírus da doença de Marek (Hoerr, 2010). Infecção por IBV concomitante com depleção linfocitária da bolsa cloacal e timo é comum em galinhas comerciais (Toro *et al.*, 2006). A evolução de vários vírus RNA foi observada na ausência de uma resposta imune eficaz, indicando que a seleção imune do hospedeiro não é a única força conduzindo a evolução viral (Gavrillin *et al.*, 2000; McMinn *et al.*, 1999; Pessoa *et al.*, 1999).

Evidências epidemiológicas indicam que um aumento no isolamento de IBV do sorotipo Arkansas nos EUA está associado com lotes de galinhas imunodeficientes.

Quando galinhas foram experimentalmente infectadas por vírus da anemia infecciosa das galinhas e vírus da doença de Gumboro, que são vírus imunodepressores, mostraram persistência prolongada do IBV (Toro *et al.*, 2006).

2.6. Persistência viral e transmissão vertical

A verdadeira latência, tal como observada em infecções por herpesvírus com integração genômica, acredita-se não ocorrer em infecções por IBV (Ignjatovic e Sapats, 2000). No entanto, em algumas circunstâncias o IBV é acreditado persistir por um período de tempo considerável em alguns sítios específicos de galinhas infectadas, tal como os rins e trato digestivo, particularmente nas tonsilas cecais (El-Houadfi *et al.*, 1986; Chong e Apostolov, 1982; Alexander e Gough, 1977). A persistência e excreção prolongada de IBV nas fezes por um pequeno número de galinhas entre 49 e 227 dias após a infecção foi demonstrada (Alexander e Gough, 1977; Cook, 1968). A re-excreção é suspeita de ser desencadeada por fatores ambientais adversos ou condições fisiológicas alteradas. Quando pintos foram experimentalmente infectados com 1 dia de vida com a estirpe G enterotrópica, o vírus foi isolado de suabes de traqueia e cloaca no início da postura, e as aves continuaram a excretar o vírus por um período de até 28 semanas (Jones e Ambali, 1987).

A persistência de aves infectadas é considerada como a fonte mais provável de re-infecção em poedeiras que ocorre em intervalos regulares (Cook, 1968), no entanto, a persistência pode ser característica de somente algumas estirpes do IBV (Alexander e Gough, 1977).

Um estudo monitorou a excreção e a persistência de IBV em tecidos de galinhas, com e sem anticorpos contra o vírus, que foram experimentalmente infectadas com uma estirpe vacinal e mantidas em estrito isolamento individualizado que impedia a re-infecção a partir de fontes exógenas. Em galinhas livres de anticorpos contra o IBV a eliminação intermitente do vírus foi verificada até 63 dias pós-infecção (PI), e o vírus foi recuperado de todos os seis órgãos analisados da maioria das galinhas entre 27 e 163 dias PI. Por outro lado, todas as galinhas expostas ao IBV na presença de anticorpos maternos eliminaram o vírus até 77 dias PI, no entanto, somente pulmões e rins de uma galinha foram positivos para o IBV aos 175 dias PI (Naqi *et al.*, 2003).

Em contrapartida, o papel da transmissão vertical na epidemiologia do IBV não está claramente estabelecido e, provavelmente, se deve a escassez de estudos nessa área. No entanto, em galinhas infectadas experimentalmente o vírus foi recuperado a partir de ovos postos entre uma e 6 semanas após a infecção, bem como o vírus foi isolado a partir de uma pequena quantidade de pintos de um dia dessas galinhas

(Cook, 1971). A transmissão vertical do IBV em galinhas foi suspeitada em um caso de campo (McFerran *et al.*, 1971) e coronavírus aviário em avestruz (Villarreal *et al.*, 2008).

O IBV também foi recuperado a partir do sêmen de galos por até duas semanas após a inoculação experimental (Gallardo *et al.*, 2011), indicando a possibilidade de que o oviduto de uma galinha susceptível, e também um ovo no oviduto, podem ser infectados com o sêmen.

2.7. Epidemiologia molecular do *Infectious bronchitis virus* no Brasil

Desde a descrição do primeiro isolamento do IBV no Brasil por Hipólito (1957), verifica-se que esse vírus tem sido continuamente isolado de casos suspeitos de BIG em várias regiões do país, e tem sido associado com diversos tipos de manifestações patológicas (Di Fábio *et al.*, 2000; Ito, 2006; Villarreal, 2007b).

A alta frequência de mutações genéticas e eventos de recombinação contribuem para o surgimento de novas estirpes e sorotipos do vírus. Algumas estirpes do IBV permanecem confinadas em uma região, enquanto outras têm uma distribuição mundial (de Witt *et al.*, 2011). Por exemplo, as estirpes dos sorotipos Mass, 4/91 e, mais recentemente QX, parecem ter difundido para diferentes regiões do mundo.

No Brasil, estirpes do sorotipo Massachusetts (Mass) têm sido detectadas em planteis avícolas comerciais desde 1957, e provavelmente, o uso intensivo de vacinas vivas com as estirpes Mass (o único sorotipo vacinal permitido no Brasil), seja responsável pela disseminação deste sorotipo específico para todas as regiões produtoras de galinhas no país. É possível que os isolados agrupados no genótipo Mass sejam de origem vacinal; no entanto, os estudos nem sempre informam se esses lotes específicos foram previamente vacinados, embora o uso de vacinas vivas atenuadas é um procedimento frequente na avicultura comercial e as estirpes do sorotipo Mass H120 e Ma5 são de fato amplamente utilizadas como vacinas no Brasil.

Em contrapartida, estudos anteriores mostraram a ocorrência rara de estirpes do IBV dos sorotipos Connecticut e 4/91 na região sudeste do Brasil (Felippe *et al.*, 2010; Villarreal *et al.*, 2010). Uma explicação para esse achado pode ser a utilização de vacinas vivas importadas com essas estirpes, como proposto anteriormente (Felippe *et al.*, 2010).

Apesar da ampla utilização de vacinas vivas com estirpes Mass, estudos epidemiológicos descrevem a predominância de um grupo específico de variantes do IBV no Brasil. Esses IBV variantes são significativamente diferentes das estirpes Mass, apresentando baixa identidade de nucleotídeos e similaridade de aminoácidos. Estudos epidemiológicos demonstraram que a maioria das estirpes de IBV de lotes

comerciais com sinais clínicos da BIG em diferentes estados do Brasil, em um período de 7 anos (2003 a 2009), são variantes com uma alta similaridade genética no gene da glicoproteína S1, sugerindo a prevalência de um sorotipo único, denominado Brazil (Villarreal *et al.*, 2010) ou BR-I (Chacón *et al.*, 2011).

Um estudo mais recente confirma a alta prevalência de um genótipo do IBV (BR-I) em granjas avícolas comerciais no Brasil nos últimos anos (2010 e 2011), no entanto foi também identificado um novo grupo variante do vírus (BR-II) na região centro-oeste do Brasil. Além disso, foi demonstrado que todos os variantes brasileiros do IBV (genótipos BR-I e BR-II) apresentaram inserções de nucleotídeos e de aminoácidos específicos na sequência do gene S1, em comparação com as estirpes de vacina do sorotipo Mass, que foram associadas com a ocorrência de doença clínica em lotes de galinhas vacinadas (Fraga *et al.*, 2013).

Foi demonstrado que existe uma forte correlação entre a sequência S1, principalmente na região hipervariável 1 e 2, e o índice de proteção obtido em testes de vírus neutralização (Ladman *et al.*, 2006). Como os IBV variantes brasileiros têm mais de 25% de divergência com as estirpes de vacinas Mass na sequência de aminoácidos em S1, conseqüentemente, possuem uma baixa relação antigênica por neutralização do vírus (Chacón *et al.*, 2011).

Ainda, deve-se ter em mente que um número considerável de estirpes brasileiras do IBV 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 vírus e oriundas das mais diversas partes do mundo. Os estudos epidemiológicos mais recentes mostram uma maior diversidade de IBV do que estudos prévios, demonstrando que os genótipos variantes brasileiros não são tão estáveis ao longo do tempo como anteriormente descrito (Chacón *et al.*, 2011).

Objetivo geral:

- Promover a caracterização molecular e biológica de estirpes vacinais e amostras de campo de *Infectious bronchitis virus*.

Objetivos específicos:

- Obter a sequência completa do gene S1 diretamente das vacinas H120 e Ma5 comercializadas no país e analisar a composição genética dessas vacinas.
- Estudar a estabilidade genética das vacinas H120 após uma única passagem adicional em ovos embrionados de galinhas SPF, comparando a sequência de S1 da vacina original com aquela obtida após o re-isolamento.
- Investigar a dinâmica biológica/molecular da vacina Ma5 pela inoculação da vacina em ovos embrionados de galinhas SPF e comparar a sequência de S1 da vacina original com aquela obtida de diferentes órgãos dos embriões.
- Obter a sequência parcial de S1 do IBV diretamente de diferentes amostras clínicas de galinhas naturalmente acometidas pela doença.
- Avaliar a estabilidade genética de IBV de campo isolado de amostra clínica de rins em ovos embrionados de galinhas SPF com aquele identificado diretamente de amostra clínica.
- Efetuar a identificação de IBV em diferentes órgãos de galinhas em final do ciclo de produção, que foram previamente vacinadas com a vacina Ma5 e acometidas pela BIG na fase inicial da vida.
- Investigar a possibilidade de transmissão vertical de IBV pelo líquido corio-alantoide de embriões vivos com 18 dias de incubação oriundos do lote de matrizes estudado.

**CAPÍTULO I - VACINAS COMERCIAIS DAS ESTIRPES H120 e Ma5 DE *Infectious
bronchitis virus* APRESENTAM AMPLA DIVERSIDADE GENÉTICA:
IMPLICAÇÕES NA RESPOSTA IMUNE**

RESUMO

A variação genotípica e fenotípica entre 4 vacinas da estirpe H120 comercializadas no país foram investigadas, designadas aqui como A, B, C e D. Na análise do cromatograma da sequência de nucleotídeos de S1 foram visualizados picos secundários em quantidade e posições diferentes, sugerindo que as vacinas são constituídas por subpopulações do IBV distintas. A sequência de aminoácidos deduzidos revelou duas trocas de aminoácidos entre as vacinas produzidas pelos laboratórios AxB até 14 trocas entre as vacinas produzidas pelos laboratórios AxC. A significativa diferença na sequência de aminoácidos entre as vacinas H120 reflete na proporcional diferença antigênica entre elas, e devido às diferentes propriedades bioquímicas de alguns aminoácidos na glicoproteína S1, pode-se também prever que mudança fenotípica também ocorre durante o processo de invasão do hospedeiro. A dinâmica molecular das subpopulações dessas vacinas foi estudada comparando-se as sequências de S1 das vacinas originais com aquelas obtidas após uma única passagem em ovos embrionados, sendo verificado comportamento distinto entre as vacinas. Apesar de empregar o mesmo método utilizado pelos laboratórios para a produção da vacina, os resultados sugerem que a potencial alteração no protocolo poderia justificar a variação e diversidade genética verificada entre as vacinas H120 produzidas por diferentes laboratórios. Tomados juntos, estes resultados sugerem que as diferentes vacinas H120 podem produzir reações/resultados de vacinação distintos. Nesse estudo também foi obtida a sequência completa de S1 da estirpe vacinal Ma5 disponível comercialmente. Na análise do cromatograma da sequência de S1 foi visualizada uma única posição de pico secundário, também exibida por todas as vacinas H120, sugerindo subpopulação do IBV intra-vacina. Para abordar essa questão foi desenvolvido um sistema contemplando a amplificação do fragmento flanqueando essa região exibindo o pico secundário por RT-PCR, clonagem, análise por HRM e sequenciamento dos clones para identificação. Embora entre os clones analisados não foi possível obter a subpopulação inferior previamente visualizada no cromatograma de S1 da vacina original, outras quatro subpopulações foram detectadas, indicando que a vacina Ma5, apesar de ser clonada, é constituída por subpopulações do IBV. Adicionalmente, a dinâmica biológica/molecular da vacina Ma5 foi investigada após a inoculação em ovos embrionados de galinha SPF. As duas subpopulações do IBV, previamente visualizadas no cromatograma de S1 da vacina original, foram consistentemente detectadas em todos os órgãos analisados, mas somente a subpopulação predominante na vacina original foi detectada no líquido corio-alantoide.

**CHAPTER I - COMMERCIAL VACCINE STRAINS H120 and Ma5 OF *Infectious
bronchitis virus* EXHIBIT WIDE GENETIC DIVERSITY: IMPLICATIONS FOR
IMMUNE RESPONSE**

ABSTRACT

The genetic and antigenic variation among four H120 vaccines marketed in this country were investigated, designated herein as A, B, C and D. In the analysis of the chromatogram of the sequence of nucleotides of S1, secondary peaks were visualized in quantity and different positions, suggesting that the vaccines are composed of subpopulations of distinct IBV. In terms of amino acid sequence, differences were verified of 2 amino acid sequences between vaccines produced by laboratories AxB up to 14 differences between vaccines produced by AxC laboratories. The significant difference in amino acid composition among H120 vaccines reflects the proportional difference between them due to the different biochemical properties of some amino acids in the glycoprotein S1, it can also predict that the phenotypic change may have occurred during the process of invasion of the host cell. The molecular dynamics of subpopulations of these vaccines has been studied by comparing the sequences S1 of the original vaccines with those obtained after a single passage in embryonated eggs, being verified distinct behavior among vaccines. Despite employing the same method used by laboratories for the production of the vaccine, the results suggest that the potential change in the protocol could explain the observed variation and genetic diversity between H120 vaccines produced by different laboratories. Taken together, these results suggest that the different vaccines H120 may produce different reactions/results distinct of vaccination. In this study it was also obtained the complete sequence of the S1 of the vaccine Ma5 commercially available. In the chromatogram of the analysis of the S1 sequence, it has been viewed a single secondary peak position also shown by all the H120 vaccines, suggesting subpopulation of intra-IBV vaccine. To address this issue it was developed a system covering the amplification of the fragment flanking the region displaying the secondary peak by RT-PCR, cloning, HRM analysis and sequencing of clones for identification. Although among the clones analyzed it was not possible to obtain the minor subpopulation previously viewed chromatogram S1 of the original vaccine, another four subpopulations were detected, indicating that the Ma5, despite being cloned, it is composed of subpopulations of the IBV. Additionally, the biological/molecular dynamics of vaccine Ma5 was investigated after inoculation into embryonated chicken SPF eggs. The two subpopulations of IBV, previously displayed on the chromatogram of S1 of the original vaccine, were consistently detected in all analyzed organs, but only the major subpopulation in the original vaccine was detected in liquid corio-alantoide.

1. INTRODUÇÃO

As medidas que têm sido mais amplamente adotadas no país para o controle da BIG fundamentam-se na combinação de abordagens básicas de biossegurança juntamente com programas imunoproliféricos. No Brasil, a vacinação contra o IBV tem sido feita desde o início da década de 80, sendo que o sorotipo Massachusetts é o único que tem o seu uso permitido pelo MAPA para entrar na composição de vacinas.

No entanto, os coronavírus, incluindo o IBV, têm mostrado existirem como uma mistura de mutantes genéticos dentro de um isolado. Isso resulta numa população heterogênea de vírus transcritos a partir de um único genoma progenitor, que é gerado através de eventos de mutação e recombinação. Essa instabilidade genética do IBV tem sido evidenciada no surgimento de variantes genéticas e antigênicas no curso de sua evolução, e as principais alterações estão associadas principalmente à glicoproteína S1, que possui importantes epítomos indutores de anticorpos vírus neutralizantes e desempenha um papel chave na determinação da espécie e tropismo celular.

Diferentes laboratórios produzem a vacina contra o IBV estirpe H120 e, apesar delas serem oriundas da mesma estirpe semente e submetidas ao mesmo número de passagens em ovos embrionados de galinhas SPF para a atenuação do vírus, tem sido relatado que essas vacinas induzem resposta/resultado vacinal distinto. Na busca por uma vacina mais estável geneticamente foi introduzida no país no início dos anos 90 a vacina Ma5, obtida após a purificação e clonagem em cultura de células de embrião de galinha. No entanto, casos de doenças associadas ao IBV em lotes de galinhas previamente vacinados continuam a ser relatados. Também tem sido demonstrado que o uso dessas atuais vacinas pode apresentar baixa proteção cruzada com isolados de campo, bem como não tem impedido o aparecimento frequente de estirpes variantes e novos sorotipos do vírus.

Diante desse cenário, o presente trabalho teve como objetivos:

- Obter a sequência completa do gene S1 diretamente das vacinas H120 e Ma5 comercializadas no país e analisar a composição genética dessas vacinas.
- Estudar a estabilidade genética das vacinas H120 após uma única passagem adicional em ovos embrionados de galinhas SPF, comparando a sequência de S1 da vacina original com aquela obtida após o reisolamento.
- Investigar a dinâmica biológica/molecular da vacina Ma5 pela inoculação da vacina em ovos embrionados de galinhas SPF e comparar a sequência de S1 da vacina original com aquela obtida de diferentes órgãos dos embriões.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Vacinas

Para compor este estudo, foram adquiridas no comércio duas partidas consecutivas de vacinas vivas do IBV produzidas por laboratórios diferentes, sendo as estirpes H120 (n=8) designadas aqui como A, B, C e D e a vacina Ma5 (n=2). Adicionalmente, foram incluídas três vacinas vivas de vírus aviários não relacionados ao IBV, os quais foram utilizados como controles negativos na PCR, sendo o metapneumovírus aviário, o vírus da doença de Newcastle e o vírus da doença de Gumboro. Todas as vacinas foram reconstituídas em 3 mL de água ultrapura estéril, alíquotadas em microtubos e estocadas a -80°C até o momento do uso. O manuseio das vacinas foi realizado em salas distintas e dias alternados para evitar contaminação cruzada.

2.2. Replicação das vacinas

2.2.1. Vacinas H120 (A, B, C e D)

Foram utilizados ovos embrionados de galinha livres de patógenos específicos (SPF- *Specific Pathogen Free*) adquiridos da empresa VALO BioMedia do Brasil. O plantel não é exposto e monitorado regularmente, portanto, determinado ser livre de vários patógenos, incluindo o IBV. Um volume de 100 µL de cada suspensão vacinal foi inoculado na cavidade cório-alantoide de três ovos com 9-11 dias de incubação e, decorridas 40 horas pós-infecção (PI), foram refrigerados a 4°C *overnight* (Gelb e Jackwood, 2008). Após a confirmação da morte dos embriões por ovoscopia, foram coletados aproximadamente 3 mL de líquido cório-alantoide (LCA) de cada embrião para formar um *pool*, que foram estocados a -80°C até o momento do uso. Os remanescentes dos embriões foram imersos em recipiente contendo solução de hipoclorito 5% para a inativação viral antes de serem descartados. Vale ressaltar que esse projeto está em acordo com os princípios da Comissão de Ética no Uso de Animais da UFV, protocolo nº74/2013.

2.2.2. Vacina Ma5

Para este ensaio foi utilizado o mesmo protocolo descrito no item 2.2.1. No entanto, além da coleta do LCA, procedeu-se a necropsia dos embriões, e fragmentos de traqueia, pulmões, rins, proventrículo, intestino delgado, baço e bolsa cloacal foram colhidos utilizando-se de vários conjuntos de instrumentos cirúrgicos estéreis para a coleta de cada *pool* de órgão para evitar contaminação cruzada, que foram estocados a -80° C até o momento do uso.

2.3. Extração de RNA

Para obter com fidelidade a sequência completa do gene da glicoproteína S1 das vacinas contra o IBV, o RNA viral foi primeiramente extraído direto das vacinas. Para investigar a dinâmica molecular das vacinas após uma única passagem em ovos embrionados de galinha SPF, o RNA viral foi obtido do LCA dos embriões inoculados (**Quadro 1**), que foi previamente clarificado (1000 x *g* por 15 minutos a 4°C). Para a obtenção do RNA viral dos órgãos dos embriões inoculados com a vacina Ma5 foi coletado um pequeno fragmento de cada tecido. A extração do RNA foi realizada com Trizol® Reagent (Invitrogen™) conforme as recomendações do fabricante. O RNA foi ressuspenso em 50 µL de UltraPure™ DEPC-treated Water (Invitrogen™), analisado e quantificado pelo método de fluorescência utilizando-se NanoDrop Lite Spectrophotometer (Thermo Scientific) e imediatamente utilizado na reação de transcrição reversa.

Quadro 1: Fontes de extração de RNA de estirpes vacinais.

Material	Extração de RNA
Vacinas H120	1. Direto da vacina
	2. Após uma passagem: LCA* de embriões SPF
Vacina Ma5	1. Direto da vacina
	2. Após uma passagem: LCA, traqueia, pulmão, intestino delgado, bolsa cloacal e rins de embriões SPF

(*) Líquido corio-alantoide

2.4. Síntese de cDNA

O RNA do IBV foi retrotranscrito para cDNA no termociclador Veriti® Thermal Cycler (Applied Biosystems). O volume final da mistura de reação foi de 20 µL, contendo 2 a 5 µL de RNA e a enzima SuperScript® III Reverse Transcriptase (Invitrogen™) conforme recomendações do fabricante. Para a síntese do cDNA a ser utilizado na PCR convencional foram usados 50 µM do oligonucleotídeo S1OLIGO3' (Kwon *et al.*, 1993) e para a PCR em tempo real (qPCR) foram empregados 10 µM do oligonucleotídeo C3L (Keeler *et al.*, 1998). (**Quadro 2**).

Os cDNA's foram quantificados pelo método de fluorescência utilizando-se NanoDrop Lite Spectrophotometer (Thermo Scientific) e imediatamente utilizados nas técnicas de PCR convencional e qPCR.

2.5. RT-PCR convencional

O ensaio foi conduzido no termociclador Veriti® Thermal Cycler (Applied Biosystems) utilizando os oligonucleotídeos S1OLIGO5' e S1OLIGO3' (Kwon *et al.*, 1993) (**Quadro 2**). O oligonucleotídeo S1OLIGO5' consiste de uma sequência idêntica a uma região próxima da terminação 5' do gene da glicoproteína S1; ao passo que S1OLIGO3' consiste de uma sequência complementar para uma região na terminação 5' do gene da glicoproteína S2. Esses oligonucleotídeos amplificam todo o gene da glicoproteína S1 do IBV de aproximadamente 1720 bases (**Figura 2**). A reação foi realizada em microtubos de 0,2 mL contendo 25 µL de Go Taq® Green Master Mix (Promega), 3-5 µL de cDNA, 50 µM de cada oligonucleotídeo e Nuclease-Free Water (Promega) para um volume final de 50 µL. As condições de amplificação foram constituídas por um ciclo de 94° C por um minuto, seguindo-se 35 ciclos (94°C/ 30 segundos, 50°C/ 45 segundos e 72°C/ 2 minutos) e uma extensão final de 72°C por 10 minutos.

Para a obtenção de quantidades adequadas de DNA da estirpe vacinal Ma5 a partir de órgãos de embriões infectados, os produtos da PCR foram adicionalmente amplificados (*nested*) utilizando os oligonucleotídeos CK2 e CK4 (Keeler *et al.*, 1998). Esses oligonucleotídeos amplificam um fragmento de aproximadamente 600 pb, que flanqueiam as regiões hipervariáveis I e II do gene S1 do IBV (**Figura 2**). A mistura da reação foi composta por 25 µL de Go Taq® Green Master Mix (Promega), 2 µL de DNA amplificado, 50 µM de cada oligonucleotídeo e Nuclease-Free Water (Promega) para um volume final de 50 µL. O ensaio foi executado por um ciclo de 94°C por um minuto, seguindo-se 40 ciclos (94°C/ 30 segundos, 50°C/ 45 segundos e 72°C/ 1 minuto) e uma extensão final de 72°C por 5 minutos.

Os produtos da PCR foram corados com GelRed™ (Biotium) por eletroforese em gel de agarose 1% (PCR convencional) ou 1,8% (*nested*) utilizando-se o padrão molecular de 1 Kb Plus DNA Ladder ou 100 pb DNA Ladder (Invitrogen™) respectivamente, e revelados com o auxílio de um transiluminador de incidência de luz ultravioleta. A amplificação do segmento genômico alvo do IBV foi realizada em triplicata para cada amostra na mesma corrida e os produtos foram sequenciados separadamente.

2.6. Sequenciamento e análise da sequência do gene S1

O sequenciamento foi realizado pela MacroGen (<http://www.macrogen.com/eng/>), e as sequências de nucleotídeos do gene S1 de ambas as fitas foram compiladas utilizando o *software* CLC Genomics Workbench 7.5 (<http://www.clcbio.com/blog/clc-genomics-workbench-7-5/>). O programa BlastX

(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) foi usado para pesquisa no Genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) para sequências homólogas de S1 do IBV.

2.7. Clonagem

Com base numa posição de heterogeneidade visualizada no cromatograma da sequência do gene S1 do IBV, estirpe Ma5 (nucleotídeo 125), um fragmento flanqueando essa posição foi clonado para confirmar a presença de subpopulação do vírus intra-vacina. O par de oligonucleotídeo C2U (nucleotídeos 114-133) e C3L (nucleotídeos 341-325) (Keeler *et al.*, 1998) foi utilizado para amplificar aproximadamente 230 pb (**Quadro 2**). Esses oligonucleotídeos amplificam a região amino-terminal do gene S1, os quais flanqueiam a região hipervariável 1 (nucleotídeos 142-320), e corresponde a região responsável pela indução de anticorpos contra o IBV, constituindo a base para definir os diferentes sorotipos do vírus (Kant *et al.*, 1992).

O ensaio foi conduzido no termociclador Veriti® Thermal Cycler (Applied Biosystems) utilizando microtubo de 0,2 mL contendo 25 µL de Go Taq® Green Master Mix (Promega), 2 µL de cDNA, 10 µM de cada oligonucleotídeo e Nuclease-Free Water (Promega) para um volume final de 50 µL. As condições de amplificação foram constituídas por um ciclo de 94°C por um minuto, seguindo por 35 ciclos (94°C/ 30 segundos, 50°C/ 40 segundos e 72°C/ 30 minutos).

O produto da PCR foi corado com GelRed™ (Biotium) por eletroforese em gel de agarose 1,8% utilizando-se o padrão molecular de 100 pb DNA Ladder (Invitrogen™) e revelado com o auxílio de um transiluminador de incidência de luz ultravioleta. Confirmada a banda de tamanho esperado, a mesma foi recortada do gel e purificada utilizando Wizard® SV Gel (Promega) de acordo com as recomendações do fabricante.

Em seguida o fragmento foi clonado no vetor de entrada pGEM®-T Easy Vector (Promega) seguindo as recomendações do fabricante. O vetor com o inserto foi, então, inserido em células competentes de *Escherichia coli*, linhagem Top 10, por meio de transformação via choque térmico. A suspensão bacteriana foi plaqueada em meio de cultura LB (Luria-Broth) sólido contendo o antimicrobiano ampicilina ($100 \mu\text{g mL}^{-1}$) e X-gal ($4 \mu\text{L}$ de solução 20 mg mL^{-1}), sendo a placa incubada *overnight* à 37°C para a seleção das bactérias transformadas. As colônias de bactérias que se multiplicaram foram transferidas, após raspagem com alça de replicação, para tubos contendo 5 mL de meio de cultura LB líquido e novamente incubadas *overnight* à 37°C sob agitação. Uma alíquota de cada cultura de bactéria transformada foi utilizada para preparar um

estoque em glicerol estéril e armazenada a -80° C. O volume remanescente da cultura foi submetido a uma mini-preparação com GeneJET Plasmid Miniprep Kit (Fermentas) para a purificação dos plasmídeos conforme recomendações do fabricante, que foram estocados a -20° C para análises futuras. A transformação das colônias foi confirmada por PCR e, adicionalmente, o fragmento clonado foi sequenciado pela Macrogen (<http://www.macrogen.com>), sendo as sequências de nucleotídeos submetidas ao programa Basic Local Alignment Search Tool (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) para analisar e confirmar a identidade dos fragmentos.

2.8. PCR em tempo real e análise da Curva de Desnaturação de Alta Resolução

Um ensaio de PCR em tempo real (qPCR) foi desenvolvido e os produtos foram submetidos a análise da curva de Desnaturação de Alta Resolução (HRM- do inglês High Resolution Menting) para investigar a capacidade do teste em detectar subpopulações do vírus na vacina Ma5.

O ensaio foi conduzido no termociclador Eco™ Real-Time PCR System (illumina®). Foram utilizados um volume de 10 µL SYBR® Select Master Mix (Life Technologies), 2 µL de cDNA (vacina Ma5), 2 µM de cada oligonucleotídeo C3L e C2U (Wang *et al.*, 1996) (**Quadro 2 e Figura 2**) e completou-se com Nuclease-Free Water (Promega) para um volume final de 20 µl. As condições de amplificação foram constituídas por 40 ciclos (94°C/ 30 segundos, 45°C/ 30 segundos e 72 °C/ 1 minuto). Os produtos da qPCR foram imediatamente submetidos a Desnaturação de Alta Resolução (HRM) em rampa de 65 a 95° C, com incremento de 0,1°C a cada ciclo. Os resultados foram analisados utilizando o software EcoStudy v5.0.4890 (illumina®). Após o ciclo de desnaturação, os produtos, juntamente com o marcador de tamanho molecular padrão de 100 pb DNA Ladder (Invitrogen™), foram corados com GelRed™ (Biotium) e visualizados em gel de agarose 2% por transiluminação UV.

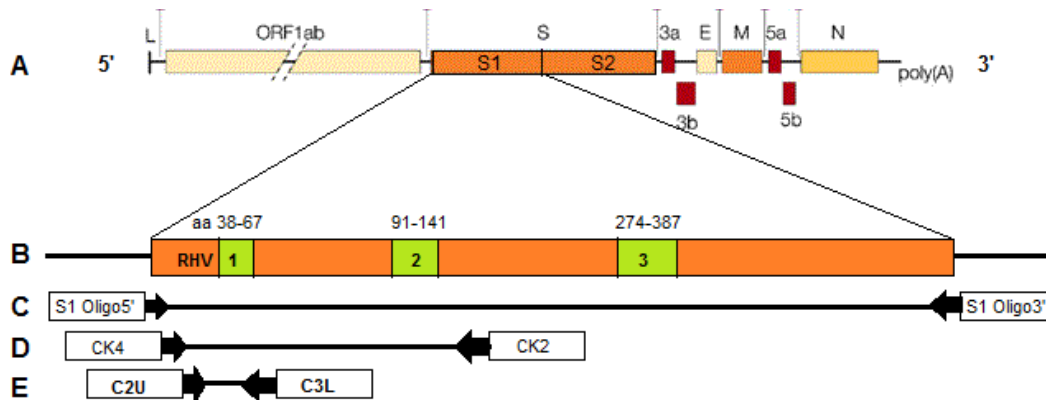


Figura 2: Representação esquemática das amplificações de S1 do IBV. (A) glicoproteína S1 (B) com as respectivas regiões hipervariáveis (RHV 1, 2 e 3) e a localização dos oligonucleotídeos usados nesse estudo (C, D e E).

Quadro 2: Sequências dos oligonucleotídeos utilizados nas reações de RT-PCR e sequenciamento.

Nome	Sequência (5' - 3')	Tm °C	Referência	Fragmento amplificado
S1OLIGO5' (+)	TGAAAACCTGAACAAAAGACA	50	Kwon <i>et al.</i> (1993)	1720 pb
S1OLIGO3' (-)	CATAACTAACATAAGGGCAA			
CK4 (+)	TCAAAGCTTCANGGNGGNGCNTA	50	Keeler <i>et al.</i> (1998)	600 pb
CK2 (-)	CTCGAATCCCGTRTTRTAYTGRCA			
C2U (+)	TGGTTGGCATTACACGGGG	45	Wang <i>et al.</i> (1996)	230 pb
C3L (-)	CAATGGGTAACAAACAC			

(+)= Forward; (-)= Reverse

3. RESULTADOS

3.1. VACINAS H120

3.1.1. Análise das sequências de S1 das vacinas H120 originais

As vacinas comerciais do IBV estirpe H120, designadas aqui como A, B, C e D exibiram sequência no gene S1 diferentes, sendo também observado nos cromatogramas picos secundários, indicando a presença de subpopulações do vírus intra-vacina. No entanto, não foi verificada diferença genética entre duas partidas consecutivas de vacina produzida pelo mesmo laboratório. Foram obtidas pelo menos três sequências completas de S1 de alta qualidade para cada vacina, que foram montadas baseando-se nas sequências senso e antisenso.

Sequenciamento genômico de alta qualidade apresentando no cromatograma dois ou mais picos na mesma posição pode ser utilizado para identificar diversidade no genoma de RNA viral dentro de um isolado (Bourret *et al.*, 2013; Dlugolenski *et al.*, 2011; Muthannan *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2007; Yan *et al.*, 2012), e as alturas ambíguas desses picos podem ser utilizadas para identificar as subpopulações virais predominante e inferior (Bourret *et al.*, 2013; Mckinley *et al.*, 2008). No presente estudo, foi determinado o limite de 20% para determinar pico secundário, sendo verificado que as vacinas exibiram não somente quantidade de posições de picos secundários diferentes como também comportamento distinto dessas subpopulações.

Na análise dos cromatogramas da sequência completa do gene S1 foi verificado que todas as vacinas exibiram picos secundários nas posições 125, 345 e 353 (**Figura 3**). As vacinas A, B e C exibiram na posição 125 (entre barras) um pico principal de timina (vermelho) representando a subpopulação predominante e um pico de altura menor de guanina (preto) mostrando a subpopulação inferior. Em contrapartida, embora a vacina D exibiu pico secundário nessa mesma posição, houve uma inversão de predominância entre essas subpopulações. Na posição 345 as vacinas A e B exibiram um pico principal de timina e um inferior de citosina, nas vacinas C e D também foi verificada uma inversão dessas subpopulações. Ainda nessa posição foi observado que a vacina A exibiu uma proporção de aproximadamente 50% das duas subpopulações, enquanto a vacina D exibiu essas mesmas subpopulações com proporção significativamente diferentes, sendo representada por cerca de 90% da subpopulação predominante e 10% da subpopulação inferior e, portanto, muito abaixo do limite determinado para determinar pico secundário nesse estudo. Já na posição 353, apesar das vacinas mostrarem proporção diferente de subpopulação, todas exibiram um pico principal de guanina e outro inferior de timina.

A vacina B exibiu dois picos secundários adicionais, sendo um deles na posição 253 mostrando uma proporção similar de guanina e timina (**Figura 4**). O outro foi verificado na terceira posição do códon 111 mostrando um pico principal de citosina e o inferior de timina (**Figura 5A**).

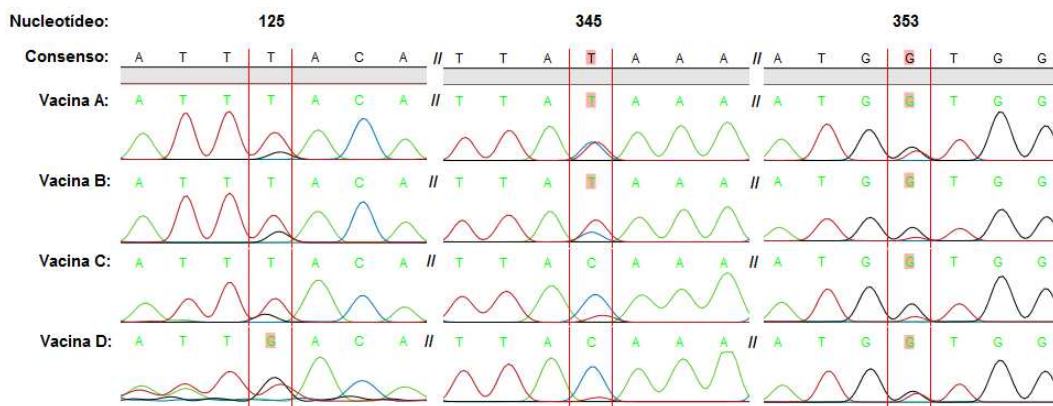


Figura 3: Sessões de cromatogramas exemplificando posições de picos secundários detectados na sequência de S1 em todas as vacinas H120. As vacinas A, B e C exibiram na posição 125 (entre barras) um pico principal de timina (vermelho) representando a subpopulação predominante e um pico de altura menor de guanina (preto) mostrando a subpopulação inferior. Na mesma posição a vacina D exibiu uma inversão de predominância entre essas subpopulações. Na posição 345 as vacinas A e B exibiram um pico principal de timina e um inferior de citosina, nas vacinas C e D também foi verificada uma inversão dessas subpopulações. Ainda nessa posição a vacina A exibiu uma proporção de aproximadamente 50% das duas subpopulações, enquanto a vacina D exibiu cerca de 90% da subpopulação predominante e 10% da subpopulação inferior. Já na posição 353, apesar das vacinas mostrarem proporção diferente de subpopulação, todas exibiram um pico principal de guanina e outro inferior de timina.

Essa proporção diferente de subpopulação detectada no cromatograma consequentemente refletiu no consenso das sequências de S1 obtidas em triplicata para uma vacina. Ou seja, no alinhamento das três sequências obtidas foram verificados polimorfismos especialmente nessas posições de pico secundário. Como exemplificado na **figura 4**, as sequências de S1 obtidas da vacina B na mesma corrida mostra um pico secundário na posição 253 (entre barras) exibindo aproximadamente 50% das subpopulações. No entanto, as reações 1 e 2 exibem uma subpopulação predominante de guanina, enquanto a reação 3 mostra uma inversão de predominância dessas subpopulações, sendo timina predominando sobre guanina. Além disso, o códon formado pelo nucleotídeo contendo guanina codifica para histidina, enquanto aquele que contém o nucleotídeo timina codifica para o aminoácido asparagina.

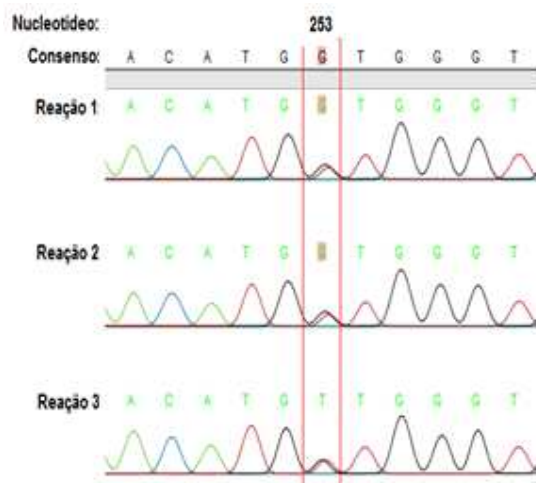


Figura 4: Exemplo de predominância alternada de subpopulação da vacina B nas sequências de S1 obtidas de reações distintas na mesma corrida. Na posição 253 (entre barras) as reações 1 e 2 exibem uma subpopulação predominante de guanina e outra inferior de timina. Em contrapartida, a reação 3 mostra uma inversão, mostrando uma subpopulação predominante de timina e outra inferior de guanina.

Ao nível de consenso, foram verificadas 32 diferenças na sequência de aminoácidos entre todas as vacinas H120 produzidas por diferentes laboratórios (**Quadro 3**). A maior diferença na sequência de aminoácidos foi verificada entre as vacinas produzidas pelos laboratórios A e C, que exibiu 14 mudanças; enquanto a menor diferença foi mostrada entre as vacinas A e B, sendo verificado 2 aminoácidos distintos. Uma diferença de 10 e 13 aminoácidos entre a vacina B e as vacinas D e C, respectivamente, foi observada. Finalmente, 3 diferenças na sequência de aminoácidos foi verificada entre as vacinas produzidas pelos laboratórios C e D.

Quadro 3: Comparação dos aminoácidos entre as vacinas H120 de diferentes fabricantes.

Posição	Vacina A	Vacina B	Vacina C	Vacina D
19	Val	Ala	Val	Val
38	Asn	Asp	Asn	Asn
64	Gly	Gly	Glu	Gly
69	Ile	Ile	Thr	Thr
73	Gly	Gly	Asp	Gly
79	Thr	Ile	Ile	Ile
83	Asp	Gly	Gly	Gly
101	Tyr	Tyr	His	His
130	Ser	Ser	Phe	Phe
179	Ala	Ala	Glu	Ala
205	Arg	Arg	Lys	Lys
246	Thr	Thr	Ile	Ile
271	Asn	Asn	Tyr	Tyr
273	Thr	Thr	Ser	Ser
376	Gly	Gly	Glu	Glu
476	Ser	Ser	Gly	Gly

3.1.2. Análise das sequências de S1 das vacinas H120 após o re-isolamento

A dinâmica molecular do IBV, ao nível de subpopulação, foi estudada comparando a sequência do gene S1 da vacina original com aquela obtida após uma passagem adicional em ovos embrionados de galinha SPF.

A análise dos cromatogramas das sequências de S1 das vacinas obtidas antes e após o re-isolamento mostrou comportamento distinto entre as vacinas. A vacina B não exibiu alteração na sequência S1 após o re-isolamento. A vacina D exibiu emergência de cinco picos secundários após o re-isolamento. No entanto, eles não foram considerados porque estavam muito abaixo de 20% determinado nesse estudo para detectar pico secundário, não sendo possível, portanto, diferenciá-los de artefatos do sequenciamento.

O comportamento das subpopulações das vacinas que foram considerados relevantes estão demonstrados na **Figura 5**. A vacina original do laboratório C exibiu na primeira posição do códon 111 (ponta da seta) da sequência S1 um pico principal de citosina (verde) representando a subpopulação predominante e um pico quase imperceptível de timina (vermelho) mostrando a presença de uma subpopulação inferior. Após o re-isolamento dessa vacina foi verificada na mesma posição que a subpopulação inferior (vermelho) foi evidenciada, sendo detectada inclusive como a subpopulação predominante em uma das reações de sequenciamento (**Figura 5A**).

Em contrapartida, a vacina A original mostrou somente um pico de adenina (verde) na primeira posição do códon 388 (ponta da seta). No entanto, após o re-isolamento foi verificada a emergência de um pico secundário de guanina (preto), indicando que uma mutação foi associada com o re-isolamento (**Figura 5B**).

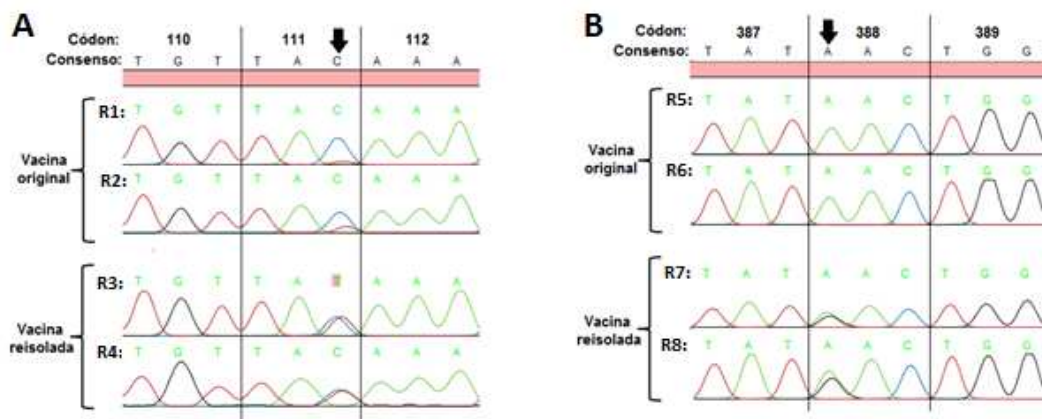


Figura 5: Sessões de cromatogramas de S1 exemplificando o comportamento das subpopulações das vacinas H120 após o reisolamento. (A) A sequência de S1 da vacina C original mostra na terceira posição do códon 111 (ponta da seta) que as reações 1 (R1) e R2 exibem um pico evidente de citosina (azul) indicando a subpopulação predominante, e um pico quase imperceptível de timina (vermelho) representando a subpopulação inferior. Por outro lado, o re-isolamento da vacina não somente evidencia a subpopulação previamente inferior constituída por timina (vermelho) na vacina original, demonstrado nas R3 e R4, como passa a ser a subpopulação predominante em R3. **(B)** A primeira posição do códon 388 na sequência de S1 da vacina A mostra (ponta da seta) que R5 e R6 da vacina original exibem somente um pico principal de adenina (verde), indicando a presença de apenas uma população do IBV. Em contraste, a vacina re-isolada mostra na mesma posição em R7 e R8 um pico principal de adenina (verde) indicando a subpopulação predominante, e um pico emergente sutilmente menor com guanina (preto) representando a subpopulação inferior.

3.2. VACINA Ma5

3.2.1. Análise das sequências de S1 da vacina Ma5 original e após a passagem em ovos embrionados

A análise das sequências de S1 obtidas de duas partidas consecutivas da vacina Ma5 original foram idênticas e exibiram 100% de identidade de nucleotídeos com a estirpe de referência (número de acesso AY561713, GenBank). No entanto, foi visualizada uma única posição heterogênea no cromatograma, na posição do nucleotídeo 125, sugerindo presença de subpopulação do IBV intra-vacina.

Como demonstrado na **Figura 6**, a sequência de S1 da vacina Ma5 original retratada numa sessão do cromatograma (**Figura 6A**), mostra que a segunda posição do códon 42 (ponta da seta) apresenta um pico principal de timina (vermelho)

representando a população predominante codificando para o aminoácido asparagina e, na área inferior a esse pico, com cerca de 20% em altura, exibe o nucleotídeo guanina (preto) indicando uma subpopulação codificando para treonina.

Após a inoculação da vacina Ma5 em ovos embrionados de galinha SPF, as duas subpopulações da vacina foram consistentemente detectadas em todos os órgãos analisados dos embriões (traqueia, pulmões, rins, intestino delgado e bolsa cloacal), conforme a vacina original (**Figura 6A**). No entanto, a análise da sequência de S1 obtida do LCA não foi visualizada a subpopulação inferior do IBV (**Figura 6B**), previamente detectada na vacina original.

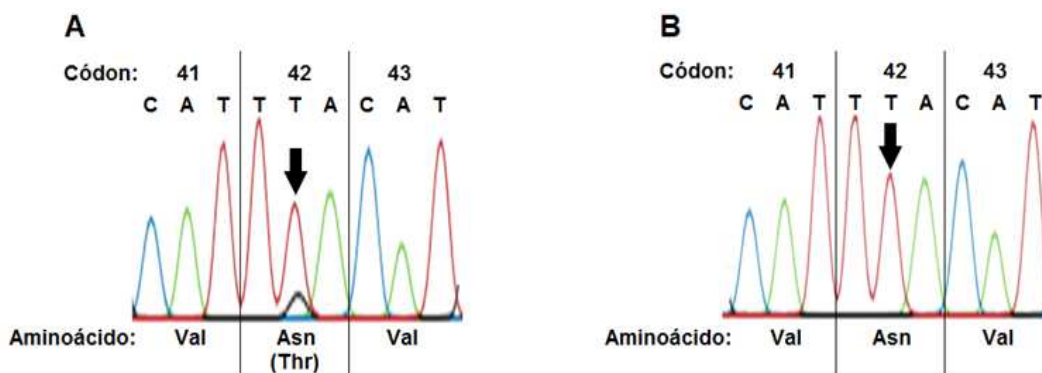


Figura 6: Sessões dos cromatogramas da sequência de S1 da vacina Ma5. (A) A vacina original exibe uma posição de pico secundário na sequência S1, mostrando (ponta da seta) que a segunda posição do códon 42 apresenta um pico principal de timina (vermelho) e um pico menor de guanina (preto), indicando uma subpopulação predominante codificando para o aminoácido asparagina e uma segunda subpopulação codificando para treonina. **(B)** Na mesma posição da vacina original a vacina re-isolada do líquido cório-alantoide de ovos embrionados de galinha SPF exibiu apenas um único pico de timina.

3.2.2. Clonagem e análise das sequências

Foram obtidas aproximadamente 38 colônias transformadas, visualizadas de forma bem definida na placa de crescimento contendo meio LB sólido. Os clones transformantes foram amplificados na PCR convencional para confirmar a presença do fragmento gênico de interesse e todos exibiram banda de tamanho esperado (~230 pb). Confirmada a presença do inserto de interesse no vetor, seguiu-se a extração do DNA plasmidial das células transformadas, e o material extraído foi avaliado em gel de agarose e quantificado em espectrofotômetro.

Devido ao grande número de colônias transformantes obtido, um ensaio de PCR em tempo real foi desenvolvido e o produto amplificado de cada clone foi submetido a análise da curva de desnaturação de alta resolução (HRM). Esse ensaio foi utilizado com o propósito de permitir a seleção de clones exibindo comportamento

de desnaturação distinto e reduzir a necessidade de sequenciar todos os clones obtidos.

Para avaliar todos os 38 clones obtidos foi necessário realizar três corridas em placas distintas, e o perfil de desnaturação dos amplicons realizado em triplicata para cada clone foi sistematicamente estudado nessa triagem, sendo selecionados seis clones (dados não mostrados).

Após essa triagem, uma nova corrida foi realizada com os seis clones. Entre os seis clones selecionados, cinco exibiram perfil de desnaturação distinto daquele visualizado para o mesmo fragmento obtido da vacina Ma5 original, enquanto um deles exibiu comportamento similar.

A **Figura 7** retrata o gráfico da curva HRM aplicado nos produtos de amplificação dos seis clones selecionados. O clone 5 foi utilizado como o padrão (linha horizontal azul) contra os quais os clones 6, 11, 16, 18 e 20 e o mesmo fragmento da vacina Ma5 original foram avaliados. A vacina Ma5 original e o clone 20 estão representados por picos positivos, enquanto o clone 11 exibe um pico negativo. Por outro lado, os clones 6, 16 e 18 mostram uma curva sinusoidal.

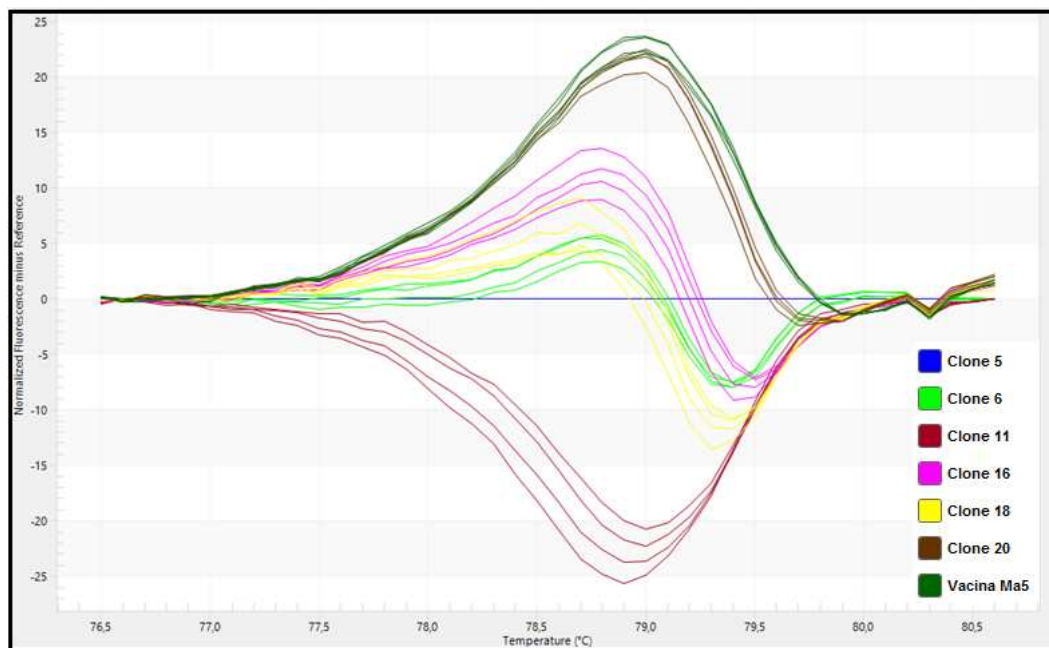


Figura 7: Gráfico da análise da curva HRM. O clone 5 foi utilizado como o padrão (linha horizontal azul) contra os quais os demais clones e o mesmo fragmento da vacina Ma5 original foram avaliados. A vacina Ma5 original e o clone 20 estão representados por picos positivos, enquanto o clone 11 exibe um pico negativo. Em contrapartida, os clones 6, 16 e 18 mostram uma curva sinusoidal.

Apesar de alguns clones selecionados exibirem comportamento de desnaturação distinto, foi verificada uma sobreposição na temperatura de desnaturação (T_m) entre eles e a vacina Ma5 original (**Quadro 4**).

Portanto, um ensaio adicional foi executado para avaliar o efeito do comportamento de desnaturação e da T_m , sendo utilizados a vacina original, dois clones exibindo comportamento de desnaturação distinto e uma mistura desses clones. Os clones 20 e 11 foram selecionados para esse ensaio e foram misturados em quantidade de DNA conhecida e proporcional, sendo 3:1 (clone 20: clone 11), 2:2 (clone 20: clone 11) e 1:3 (clone 20: clone 11). Quando os clones foram deliberadamente misturados em proporções variáveis foi verificado que o ensaio não foi capaz de detectar diferença significativa em nenhuma das misturas dos clones e da vacina (dados não mostrados). Apesar dessa técnica ser naturalmente muito sensível e dependente da sequência de bases no DNA, esse ensaio mostrou que a técnica não é capaz de diferenciar estirpes de vírus em amostras contendo DNA misto que apresentam diferença de temperatura de desnaturação muito pequena.

Quadro 4: Valores das temperaturas de desnaturação (T_m) obtidas para a vacina Ma5 original e dos clones selecionados para sequenciamento.

Amostra	T_m
Vacina Ma5 original	79,2° C (-0,1° C)
Clone 5	78,9° C (-0,1° C)
Clone 6	78,9° C
Clone 11	78,6° C (-0,1° C)
Clone 16	79,0° C (-0,1° C)
Clone 18	78,9° C (-0,1° C)
Clone 20	79,1° C

Definidos os clones, os mesmos foram sequenciados para confirmar a originalidade dos insertos e permitir a identificação das subpopulações. No alinhamento das sequências dos clones com a vacina Ma5 original foi verificado um polimorfismo comum na posição do nucleotídeo T129C. Polimorfismos únicos e adicionais foram detectados nos clones #20 (A140G), #5 (T193C) e no #11 (G284A). Por outro lado, os clones #6, 16 e 18 que apresentaram um comportamento de desnaturação similares, exibiram sequências idênticas (**Quadro 5**).

Apesar da análise da curva HRM ser incapaz de diferenciar mistura de subpopulações do vírus exibindo pequena variação na T_m em uma amostra, a técnica permitiu diferenciar com sucesso as subpopulações intra-vacina isoladas.

Quadro 5: Polimorfismos verificados nas sequências do fragmento S1 dos clones em relação ao mesmo fragmento obtido do produto da qPCR da vacina Ma5 original.

Amostra	Posição do nucleotídeo			
	129	140	193	284
Vacina Ma5	T	A	T	G
Clone 20	C	<u>G</u>	T	G
Clone 5	C	A	<u>C</u>	G
Clone 11	C	A	T	<u>A</u>
Clone 6	C	A	T	G
Clone 16	C	A	T	G
Clone 18	C	A	T	G

4. DISCUSSÃO

A ocorrência da bronquite infecciosa das galinhas (BIG) em plantéis avícolas no Brasil e diversas partes do mundo, na maioria das vezes em lotes vacinados, tem despertado interesse na comunidade científica, especialmente em relação à formulação e/ou composição das vacinas contra *Infectious bronchitis virus* (IBV). No presente estudo a sequência completa do gene S1 foi obtida diretamente de quatro vacinas H120 disponíveis comercialmente no país e produzidas por diferentes laboratórios, designadas aqui como A, B, C e D.

Estudos prévios baseado no sequenciamento da glicoproteína S1 de IBV, detectaram subpopulações virais em duas vacinas comerciais de IBV do sorotipo Arkansas (Ark), bem como no estoque original do vírus atenuado distribuído para as companhias de vacinas e também na estirpe virulenta de origem (Nix *et al.* 2000). Uma análise mais acurada verificou 16 posições exibindo picos secundários no cromatograma da sequência de S1 entre as quatro vacinas comerciais do IBV Ark atualmente em uso nos E.U.A., sendo verificada posição diferente desses picos na sequência de nucleotídeo e proporção distinta de subpopulações entre essas vacinas (Gallardo *et al.*, 2010; Mckinley *et al.*, 2008; van Santen e Toro, 2008). Outro estudo confirmou a presença de duas subpopulações virais em uma preparação comercial da vacina do IBV estirpe VicS, disponível atualmente apenas na Austrália (Hewson *et al.*, 2012).

Utilizando essa metodologia, foi verificado que as vacinas contra o IBV estirpe H120 do sorotipo Massachusetts comercializadas no país exibiram no cromatograma da sequência de S1 pelo menos três posições de picos secundários bem definidos. Para esse estudo foi determinado um limite de 20% para identificar picos secundários, no entanto, outros picos abaixo desse limite foram visualizados e não puderam ser distinguidos de artefatos do sequenciamento. Embora a existência de picos secundários no cromatograma da sequência de S1 das vacinas de IBV pode indicar a presença de subpopulações do vírus, através desta metodologia é praticamente impossível determinar com precisão o número exato de subpopulações de IBV intra-vacina. Essa dificuldade pode ser melhor entendida por relatos prévios demonstrando que os coronavírus aviários, incluindo o IBV, existem como uma mistura de mutantes dentro de um isolado (Jackwood *et al.*, 2003).

Foram obtidas pelo menos três sequências de S1 de boa qualidade para cada vacina comercial, no entanto, a sequência consenso dessas sequências numa análise individual para cada vacina, exibiu alguns polimorfismos ao nível de nucleotídeos. Especula-se que a obtenção de sequência de S1 diferente para a mesma vacina, obtidas de reações de RT-PCR distintas na mesma corrida, demonstra na verdade, a

sequência de S1 de uma determinada subpopulação específica, quando a alíquota de DNA molde utilizada para a amplificação contém uma maior proporção do genoma dessa subpopulação. Essa possibilidade parece ser mais frequente quando duas subpopulações existem em proporção muito similares.

No entanto, no estudo de van Santen e Toro (2008), a análise do cromatograma da sequência completa de S1 de uma vacina comercial de IBV estirpe H120 comercializada nos E.U.A. apresentou pico secundário em apenas uma posição (nucleotídeo 372), sendo relatado uma subpopulação predominante do vírus exibindo um pico maior de citosina e um pico menor representando a subpopulação inferior mostrando timina na mesma posição, uma diferença sinônima. Embora em nosso estudo todas as vacinas exibiram citosina na posição 372 da sequência de S1, não foi verificado pico secundário nessa posição. É possível que a supracitada vacina não seja comercializada no Brasil, embora a maioria das vacinas contra o IBV encontradas no Brasil seja produzida por grandes companhias multinacionais com planta de produção em seus países de origem, sendo somente envasada e comercializada aqui. Cabe ressaltar que, uma das vacinas analisadas aqui apresentou 99,8% de identidade ao nível de nucleotídeos com a estirpe vacinal dos E.U.A (número de acesso EU359657), uma relação de identidade que não foi encontrada entre nenhuma das vacinas analisadas. Sendo assim, a diferença na sequência de S1 obtida nos dois estudos, provavelmente para a mesma vacina, seja reflexo dessa alternância de predomínio de subpopulações.

Embora o uso de vacina contra IBV seja economicamente viável para a indústria avícola, especialmente para a produção de frangos de corte, estudos epidemiológicos convencionais e moleculares têm confirmado a habilidade do vírus evoluir rapidamente e burlar com sucesso extensivos programas de vacinação. Tem sido verificado que a pressão imunológica exercida pela vacina tem favorecido a evolução do vírus (Toro *et al.*, 2012). Uma evidência para isso é a frequente identificação de IBV no país, na maioria das vezes em plantéis avícolas vacinados, que são isolados de casos clínicos compatíveis com a bronquite infecciosa, mas com sequências de S1 muito semelhantes às vacinas (Fraga *et al.*, 2013; Chacón *et al.*, 2011; Villarreal *et al.*, 2010).

No presente estudo, a análise da sequência de S1 das vacinas H120 exibiu uma ampla diversidade genética. Ao mesmo tempo foi verificada uma significativa variação na sequência de aminoácidos entre as vacinas, que variou de 2 aminoácidos entre as vacinas AxB até 14 aminoácidos entre AxC. Essa significativa diferença na sequência de aminoácidos entre as vacinas H120 reflete na proporcional diferença antigênica entre elas, e devido às diferentes propriedades bioquímicas de alguns

aminoácidos na glicoproteína S1, pode-se também prever que a mudança fenotípica ocorre durante o processo de invasão do hospedeiro. Essa hipótese é fortalecida pela observação de veterinários de campo, que relatam que algumas vacinas H120 induzem reação vacinal mais exacerbada e/ou duradoura. Portanto, as diferenças nos perfis de reações demonstram que as vacinas de IBV não são todas iguais, e a intensidade e a duração da reação parecem ser específica do produto.

Por questões econômicas ou mesmo logística, uma situação vista no campo é o uso de vacinas contra o IBV produzidas por diferentes laboratórios dentro de um mesmo lote ou unidade de produção avícola. Por outro lado, em regiões avícolas densamente povoadas é inevitável o risco de escape de vírus entre granjas próximas, o que torna esse tipo de vacinação uma prática de risco, especialmente quando são utilizadas vacinas vivas contra o IBV produzidas por diferentes laboratórios e, portanto, como verificado nesse estudo, de constituições genéticas diferentes. O uso de vacinas de diferentes laboratórios e/ou a introdução de um novo vírus vacinal por escape entre lotes pode favorecer um aumento de risco para incremento de variabilidade genética entre os IBV. Existe evidência demonstrando a recombinação entre estirpe de IBV do sorotipo Massachusetts vacinal com amostras de campo em condições naturais (Liu *et al.*, 2013).

A diversidade genética nas vacinas tem sido sugerida proporcionar uma vantagem para o vírus, permitindo ao vírus adaptar-se às alterações no ambiente e também a capacidade para infectar diferentes tecidos do hospedeiro (Jackwood e Sommer, 2002). Enquanto outros têm sugerido que a presença de vários genótipos virais em vacinas de IBV pode ser vantajoso, aumentando a diversidade antigênica e, portanto, ampliando o espectro de proteção, embora isto não tenha sido demonstrado (Nix *et al.*, 2000).

Estirpes de IBV de vacina pertencente ao mesmo sorotipo e proveniente de diferentes laboratórios, mas que apresentam diferenças na sequência do gene S1, provavelmente, refletem a origem da estirpe do vírus semente que foi utilizada para produzir a vacina e o número de passagens em ovos embrionados de galinha utilizados para atenuar o vírus. No entanto, a explicação para vacinas de IBV oriundas da mesma estirpe semente e provenientes de diferentes fabricantes, mas que apresentam diferenças nas sequências do gene S1 e maior diversidade viral, ainda não estava clara. Para investigar esse fenômeno, foi realizada uma única passagem adicional das vacinas H120 em ovos embrionados, empregando o mesmo método padrão utilizado pelos laboratórios para a produção da vacina. Na análise da sequência S1 das vacinas originais e após o re-isolamento foi verificado que 2 das quatro vacinas re-isoladas exibiram comportamentos distintos.

Enquanto na vacina C uma determinada subpopulação que foi detectada num pico secundário na vacina original como subpopulação inferior, tornou-se mais evidente ou até mesmo a subpopulação predominante após o re-isolamento. Por outro lado, uma subpopulação do vírus emergiu após o re-isolamento da vacina A em uma posição que não correspondia a um pico secundário na vacina original, fornecendo evidência que essa variação assenta no pressuposto de que tal subpopulação emergiu de mutação e/ou recombinação biológica, em vez de alteração genética artificial introduzida pelo procedimento de amplificação genômica *in vitro*. Sendo assim, parece razoável assumir que a modificação no protocolo utilizado para a produção das vacinas pode favorecer a replicação de uma determinada subpopulação em detrimento de outra, bem como parece induzir diversidade genética.

A sequência de S1 da vacina Ma5 foi amplificada diretamente da vacina comercial, sendo verificado 100% de identidade com a estirpe de referência (acesso AY561713, GenBank). No entanto, a análise do cromatograma de S1 (posição 125) mostrou claramente uma região de pico secundário, indicando a presença de uma subpopulação predominante do vírus exibindo um pico maior de timina e um pico menor representando a subpopulação inferior mostrando cerca de 20% de guanina na mesma posição, uma diferença não sinônima. Ou seja, uma subpopulação predominante codificando para o aminoácido asparagina e uma inferior codificando para treonina. Para melhor abordar essa questão, foi desenvolvido um sistema para analisar a população de espécies de RNA da vacina e identificar os variantes, no qual contemplou a amplificação de um fragmento flanqueando essa região, clonagem, escaneamento por análise HRM e sequenciamento.

Foram obtidos pelo menos 38 clones, no entanto, somente 6 deles foram selecionados para o sequenciamento e identificação. Essa seleção foi baseada no escaneamento por análise HRM e somente os clones que exibiram comportamento de desnaturação distinto do mesmo fragmento obtido para a vacina Ma5 original foram escolhidos. Como o clone da subpopulação inferior não foi identificado entre os selecionados, é possível que o comportamento de desnaturação do DNA dessa subpopulação inferior tenha um comportamento de desnaturação similar com aquele visualizado para a vacina. Embora entre os clones identificados não foi possível obter a subpopulação inferior previamente visualizada no cromatograma de S1 da vacina original, outras quatro subpopulações foram identificadas, indicando que a vacina Ma5 é constituída por diferentes subpopulações de IBV.

Adicionalmente, a dinâmica biológica e molecular da vacina Ma5 foi investigada após a inoculação em ovos embrionados de galinha SPF. A vacina foi consistentemente detectada em todos os órgãos dos embriões analisados, sendo

visualizadas as duas subpopulações da vacina original nos cromatogramas das sequências de S1 obtidas dos órgãos. Em contrapartida, somente a subpopulação predominante da vacina original foi detectada no líquido corio-alantoide (LCA). No entanto, a aparente capacidade reduzida da subpopulação inferior da vacina Ma5 para infectar o LCA, obviamente não indica a perda da capacidade de infectar outros tecidos, visto que a produção dessa vacina é feita através da replicação do vírus em cultura de células de embriões de galinha. Na verdade isso pode indicar uma capacidade alterada para se ligar a receptores celulares diferentes. Tem sido sugerido que alteração próxima do domínio de ligação ao receptor da glicoproteína S1 pode modificar a afinidade dos coronavírus para diferentes glicoproteínas de superfície da célula (Cavanagh *et al.*, 1992; Schultze *et al.*, 2005). A habilidade de IBV replicar em muitas superfícies epiteliais pode estar relacionada, em parte, ao fato da adsorção do vírus às células hospedeiras ser dependente de ácido N-acetilneuramínico (ácido siálico) na superfície das células (Cavanagh, 2007). Esse vírus se liga preferencialmente ao ácido siálico quando a sua ligação ao oligossacarídeo é α 2-3 (Schultze *et al.*, 1992). Embora o LCA possui uma grande variedade de células e, possivelmente, a maioria delas expressa o ácido siálico em sua superfície, a afinidade de IBV para esse receptor até explica sua natureza pantrópica no hospedeiro natural, mas não pode ser o único fator, porque o ácido neuramínico também está presente em células que não são infectadas pelo IBV. Pode ser que o ácido siálico seja um passo de ligação primária, mas requer que outros contatos sejam feitos, talvez envolvendo um receptor secundário, mais específico e menos distribuído (Cavanagh, 2007).

Sendo assim, é provável que a subpopulação inferior da vacina Ma5 tenha sido negativamente selecionada no LCA de embriões de galinha. Uma vez que, a mudança de aminoácido na sequência de S1 da vacina Ma5 original, detectada nesse estudo, pode ter importância relevante nas características biológicas dessa subpopulação, porque em última análise ele determina o tipo de relação que o vírus estabelece com o hospedeiro (Phillips *et al.*, 2011). Por outro lado, embora o aminoácido treonina no códon 42 do gene S1 pode exercer um efeito seletivo negativo na vacina Ma5 no LCA, a sua presença nessa posição também parece não ser o único determinante, porque todas as vacinas H120 também mostram uma ou mais subpopulações de IBV exibindo esse aminoácido na mesma posição e replicam eficientemente no LCA. Portanto, a explicação esteja relacionada com outros genes, conforme estudos prévios reportando que variação genética nos genes que codificam para a nucleoproteína (Jia *et al.*, 1995), proteína não estrutural 3 (Phillips *et al.*, 2012) e na região não traduzida 3' (Liu *et al.* 2009), afetam a capacidade de infecção por IBV.

No presente estudo foi verificada uma ampla diversidade genética entre as vacinas contra IBV disponíveis comercialmente no Brasil, bem como em vacinas contra IBV de outros sorotipos reportados previamente (Hewson *et al.*, 2012; Toro *et al.*, 2012; Gallardo *et al.*, 2010; van Santen e Toro, 2008), no entanto, a significância do uso de uma vacina contra o IBV exibindo uma maior ou menor diversidade genética ainda não está claro. Enquanto a maior diversidade genética de uma vacina apresenta uma vantagem para o hospedeiro ao estimular uma imunidade mais ampla, as pesquisas têm sugerido que essa diversidade pode ser benéfica para o vírus para a sua replicação e persistência no hospedeiro e evoluir para um fenótipo virulento (Ndegwa *et al.*, 2014, 2012; Jackwood *et al.*, 2002; Nix *et al.*, 2000).

Pelo menos do ponto de vista aplicado, os resultados obtidos desse estudo podem ajudar a explicar os diferentes resultados e reações obtidos da vacinação contra IBV quando se utiliza vacina produzida por laboratório diferente.

5. CONCLUSÕES

As vacinas H120 comercializadas no Brasil compartilham algumas subpopulações, no entanto, algumas delas podem ser predominantes em uma determinada vacina e inferiores em outra. Por outro lado, algumas vacinas possuem algumas subpopulações específicas.

A variação na sequência de S1 obtida das vacinas H120 após o re-isolamento utilizando a mesma técnica empregada pelos laboratórios para a produção da vacina, ou seja, replicação da vacina em ovos embrionados de galinhas SPF, mas possivelmente empregando alteração no protocolo pode justificar a variação genética e antigênica entre essas vacinas produzidas por diferentes laboratórios.

Em relação a vacina Ma5, apesar de ser clonada, foi verificado que essa vacina é constituída por distintas subpopulações do vírus.

Pelo menos em embriões de galinhas, a vacina Ma5 não sofreu mutação e/ou seleção após replicar no hospedeiro, no entanto, foi verificado a habilidade de subpopulação da vacina infectar fluido específico do embrião.

CAPÍTULO II – DISTRIBUIÇÃO DE SUBPOPULAÇÕES DE IBV EM DIFERENTES ÓRGÃOS DE GALINHAS NATURALMENTE ACOMETIDAS PELA DOENÇA

RESUMO

Num plantel de matrizes pesadas, mantido sob um rigoroso programa de biossegurança, um lote de pintinhos com dois dias de vida foi vacinado com a vacina Ma5, no entanto aos dezoito dias de idade o lote apresentou sinais clínicos sugestivos de BIG. Para efetuar o diagnóstico, a sequência parcial de S1 de IBV foi primeiramente obtida diretamente de amostras clínicas das aves. Exceto na traqueia, que foi detectada a vacina Ma5, vírus variantes de IBV distintos da vacina original foram identificados em todos os órgãos analisados, mostrando tropismo específico. A relevância desse achado assenta no pressuposto repertório patogênico que a infecção por IBV pode desencadear em um lote de galinhas. A análise de S1 também mostrou que essas subpopulações eram mais similares geneticamente com a vacina Ma5 na comparação com a estirpe patogênica de referência (M41). Adicionalmente, um *pool* de amostras clínicas de rins de galinhas infectados com o IBV identificado como variante foi inoculado em ovos embrionados e utilizando rins de embriões após a 1ª passagem para a identificação molecular do vírus, a vacina Ma5 foi detectada. Portanto, a detecção da vacina sugere sua ineficácia em proteger as aves frente ao desafio com IBV variantes exibindo poucas alterações de aminoácidos. Em contrapartida, foi verificado que o IBV obtido do LCA após a 3ª passagem de amostra clínica de rins de galinhas exibiu mudança de nucleotídeos em 12 posições na comparação com a sequência de S1 obtida diretamente do órgão. Esse resultado indica que diferentes microambientes exercem distinta pressão sobre o IBV. Sendo assim, a identificação de IBV diretamente de amostras clínicas asseguram a obtenção de sequências de S1 com maior confiabilidade, especialmente quando o objetivo é efetuar estudos filogenéticos, e reduz a chance de obter um diagnóstico equivocado ou inconclusivo.

CHAPTER II- SUBPOPULATIONS DISTRIBUTION OF IBV IN DIFFERENT ORGANS OF CHICKENS NATURALLY AFFECTED BY THE DISEASE

ABSTRACT

A broiler breeding stock, kept under a strict biosafety program, a flock of chicks with two days of age was vaccinated with the vaccine Ma5, but at eighteen days old this flock presented clinical signs suggestive of infectious bronchitis. To make the diagnosis, partial sequence of S1 of the IBV was first obtained directly from clinical samples of chickens. Except in the trachea and small intestine which was detected the vaccine Ma5, distinct subpopulations of IBV variants, have been identified in all organs studied, showing specific tropism. The relevance of these findings are based on the assumption that the pathogen repertoire of the infection of IBV can trigger in a flock of chickens. S1 analysis also showed that these subpopulations were more genetically similar with the vaccine in the comparison with the pathogenic strain of reference (M41). Additionally, a pool of clinical samples of kidneys of chickens infected with IBV identified as variant was inoculated in embryonated eggs and using kidneys from embryos after the first passage for the molecular identification of the virus, the vaccine Ma5 has been detected. Therefore, the detection of the vaccine strengthens its ineffectiveness in protecting the birds against the challenge with IBV variants exhibiting few amino acid changes. In contrast, it was verified that the IBV obtained by the LCA after the third passage of the clinical sample of the kidneys of chicken exhibited change of nucleotides in 12 positions in comparison with the sequence of S1 obtained directly from the organ. This result indicates that different distinct microenvironments exert pressure on the IBV. Thus, IBV identification directly from clinical samples ensure the attainment of S1 sequences with greater reliability, especially when the objective is to perform phylogenetic studies, and reduces the chance of getting a wrong diagnosis or inconclusive.

1. INTRODUÇÃO

Infectious bronchitis virus (IBV) é uma das principais causas de perdas econômicas na indústria avícola, afetando o desempenho de galinhas reprodutoras, frangos de corte e poedeiras comerciais de qualquer idade.

Embora o uso de vacina tem sido atribuído diminuir a taxa de prevalência da bronquite infecciosa das galinhas (BIG), novos casos de doenças associadas ao IBV continuam a ser relatados em plantéis avícolas previamente vacinados. Para se obter melhores resultados de vacinação contra o IBV, é altamente recomendado associar a implementação de um rigoroso programa de biossegurança, que pode assumir um papel de grande relevância na prevenção da BIG. No entanto, o cumprimento dessas medidas parece não impedir a ocorrência da doença. Embora o IBV seja considerado pouco resistente às condições ambientais e sensível a maioria dos desinfetantes comumente utilizado na avicultura, isto não impede a introdução de IBV variante daquele utilizado como vacina no ambiente de criação.

Em regiões avícolas densamente povoadas é inevitável o risco de escape de vírus entre granjas próximas, o que torna esse tipo de vacinação uma prática de risco, especialmente quando são utilizadas vacinas vivas contra o IBV produzidas por diferentes companhias e, portanto, de constituições genéticas diferentes.

Adicionalmente, relatos de coronavírus aviário similares geneticamente com o IBV, bem como a própria vacina têm sido cada vez mais frequentemente isolados de diferentes espécies de aves de vida livre, especialmente no entorno de plantéis avícolas industriais, o que poderia constituir um ambiente importante para a perpetuação e uma maior disponibilidade de material genético no campo (Hughes *et al.*; 2009; Jonassen *et al.*, 2005; Liu *et al.*, 2005; Muradrasoli *et al.*, 2009; Woo *et al.*, 2009). Isso associado a alta frequência de mutações genéticas e eventos de recombinação em IBV poderia favorecer o surgimento de novas partículas virais altamente patogênica para as galinhas.

Tem sido verificado no país a frequente identificação de IBV, na maioria das vezes em plantéis avícolas vacinados, que são isolados de casos clínicos compatíveis com a BIG, mas com sequências de S1 muito semelhantes às vacinas (Fraga *et al.*, 2013; Chacón *et al.*, 2011; Villarreal *et al.*, 2010).

Diante dessas evidências, a presente pesquisa teve como objetivos:

- Obter a sequência parcial de S1 do IBV diretamente de diferentes amostras clínicas de galinhas naturalmente acometidas pela doença.
- Avaliar a estabilidade genética de IBV de campo isolado de amostras clínicas de rins em ovos embrionados de galinhas SPF com aquele identificado diretamente de amostras clínicas.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Amostras de campo

No início de 2013, um estabelecimento avícola que aloja um plantel de matrizes pesadas mantido sob um rigoroso programa de biossegurança, localizado na região centro-oeste do estado de Minas Gerais, detectou um problema sanitário em um lote. Foram enviadas dez aves sacrificadas e refrigeradas para o Departamento de Veterinária da Universidade Federal de Viçosa (DVT/UFV) para diagnóstico. O médico veterinário responsável técnico relatou que o lote foi vacinado aos 2 dias de vida contra o IBV estirpe Ma5, administrada via spray gota grossa, e aos 18 dias de idade as aves apresentavam-se com sinais clínicos de espirro, poliúria e alta mortalidade. Foi realizada a necropsia das aves de forma asséptica e fragmentos de rins foram imergidos em formol tamponado 10% e os remanescentes, bem como traqueia, pulmões, intestino delgado e bolsa cloacal foram colhidos separadamente para formar um *pool* de cada órgão sendo armazenados a -80° C até o momento do seu processamento. Para a confecção das lâminas histológicas de amostras clínicas de rins procedeu-se à técnica convencional de rotina laboratorial.

2.2. Isolamento de IBV de amostras clínicas de rins

A técnica utilizada foi a considerada padrão (Gelb e Jackwood, 2008; OIE, 2013), com algumas alterações. Fragmentos de amostras clínicas de rins foram inoculados em ovos embrionados de galinha SPF para o isolamento do IBV, sendo colhidos rins e líquido corio-alantoide (LCA) dos embriões na 1ª e 3ª passagens respectivamente, conforme fluxograma (**Figura 8**).

Um *pool* de pequenos fragmentos de rins de todas as aves doentes foi macerado com o auxílio de um almofariz (gral) e pistilo esterilizados, homogeneizado em suspensão a 10-15% (P/V) de PBS contendo antimicrobianos (10000UI penicilina/mL e 10000UI de estreptomicina/mL) e incubado à temperatura ambiente por 60 minutos. Em seguida, a suspensão tecidual foi clarificada por centrifugação a 1000 x *g* por 15 minutos a 4° C. Um volume de 200 µL dessa solução foi inoculado na cavidade corio-alantoide de ovos embrionados de galinha SPF com 9-11 dias de incubação por uma pequena perfuração realizada na casca do ovo com o auxílio de uma seringa estéril.

Para a 1ª passagem foram utilizados 15 ovos embrionados, sendo 10 destinados ao isolamento viral e cinco como controle da infecção, que foram inoculados com PBS estéril. A perfuração realizada nos ovos foi vedada com cola branca e retornados para a incubadora. Os ovos foram avaliados diariamente por ovoscopia, sendo considerada inespecífica a mortalidade embrionária ocorrida 24

horas pós-inoculação (PI), e os embriões mortos durante este período foram descartados.

Decorridas 40 horas PI foi colhido 1 mL de LCA de cada um dos embriões infectados para se obter um *pool*, que foi utilizado para a próxima passagem. Dos dez embriões infectados na 1ª passagem, cinco retornaram para a incubadora, enquanto os demais foram resfriados a 4°C *overnight* por 24 horas e utilizados para a coleta dos rins. Para a 2ª e 3ª passagens foram utilizados 10 ovos embrionados em cada ensaio, sendo 5 destinados ao isolamento viral e cinco como controle da infecção, conforme descrito acima, exceto que nessas passagens não foram coletados rins de embriões. Aos 7 dias PI dos embriões de cada passagem, todos os ovos infectados e controles, foram resfriados a 4°C *overnight* por 24 horas e os embriões infectados foram analisados comparativamente com os controles para averiguar lesões sugestivas da replicação do vírus.

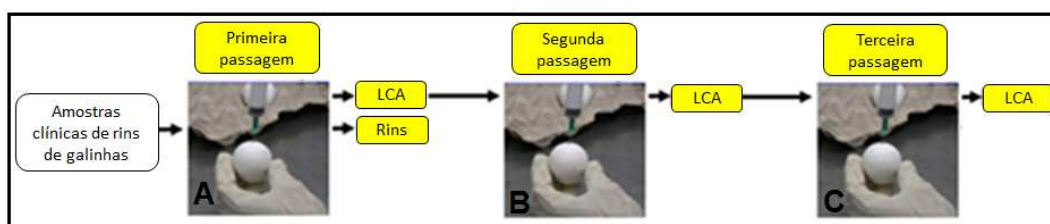


Figura 8- Fluxograma de inoculação e coleta de materiais dos embriões infectados. (A) Primeira passagem: inoculação de amostras clínicas de rins de galinhas com coleta de LCA de todos os 10 embriões infectados 40 horas PI e coleta de rins de 5 desses embriões infectados. (B) Segunda passagem: inoculação de LCA colhido na 1ª passagem e coleta de LCA 40 horas PI. (C) Terceira passagem: inoculação de LCA colhido na 2ª passagem e coleta de LCA 40 horas PI para identificação do IBV. Após a coleta do LCA nas 1ª, 2ª e 3ª passagens os ovos retornaram para a incubadora onde permaneceram por mais sete dias PI para avaliar alterações características nos embriões pela replicação do vírus.

2.3. Extração de RNA

Para a extração do RNA das amostras teciduais, fragmentos de traqueia, pulmões, rins, intestino delgado, bolsa cloacal de aves doentes, bem como de rins de embriões após a 1ª passagem de amostras clínicas de rins (**Quadro 6**), foram macerados com um micropistilo em um microtubo juntamente com Trizol® Reagent (Invitrogen™), conforme as especificações do fabricante.

Para investigar a dinâmica molecular do IBV após passagem de rins de galinhas doentes em ovos embrionados de galinha SPF, o RNA viral foi obtido do LCA dos embriões inoculados na 1ª e 3ª passagens de amostras clínicas de rins obtidas no item 2.2 utilizando-se Trizol® LS Reagent (Invitrogen™) de acordo com as

recomendações do fabricante. O RNA foi ressuspensão em 50 µL de UltraPure™ DEPC-treated Water (Invitrogen™), analisado e quantificado pelo método de fluorescência utilizando-se NanoDrop Lite Spectrophotometer (Thermo Scientific) e imediatamente utilizado na reação de transcrição reversa.

Quadro 6: Fontes de extração de RNA do IBV de amostras clínicas e após o isolamento.

Material	Extração de RNA
Amostras clínicas	<ol style="list-style-type: none"> 1. Direto das amostras: traqueia, pulmão, intestino delgado, bolsa cloacal e rins. 2. Após uma passagem de amostras clínicas de rins: LCA* e rins de embriões SPF. 3. Após três passagens de amostras clínicas de rins: LCA de embriões SPF.

(*) Líquido corio-alantoide

2.4. Síntese de cDNA

O RNA do IBV foi retrotranscrito para cDNA no termociclador Veriti® Thermal Cycler (Applied Biosystems). O volume final da mistura de reação foi de 20 µL, contendo 2 a 5 µL de RNA e a enzima SuperScript® III Reverse Transcriptase (Invitrogen™) conforme recomendações do fabricante. Para a síntese do cDNA a ser utilizado na PCR convencional foram usados 50 µM do oligonucleotídeo S1OLIGO3' previamente descrito (Kwon *et al.*, 1993). Os cDNA's foram quantificados pelo método de fluorescência utilizando-se NanoDrop Lite Spectrophotometer (Thermo Scientific) e imediatamente utilizados.

2.5. Nested RT-PCR

A amplificação foi realizada em duas reações consecutivas no termociclador Veriti® Thermal Cycler (Applied Biosystems). Na primeira reação, a RT-PCR foi realizada em microtubos de 0,2 mL contendo 25 µL de Go Taq® Green Master Mix (Promega), 3-5 µL de cDNA, 50 µM de cada oligonucleotídeo S1OLIGO5' e S1OLIGO3' (Kwon *et al.*, 1993) e Nuclease-Free Water (Promega) para um volume final de 50 µL. As condições de amplificação foram constituídas por um ciclo de 94°C por um minuto, seguindo-se 35 ciclos (94°C/ 30 segundos, 50°C/ 45 segundos e 72°C/ 2 minutos) e uma extensão final de 72°C por 10 minutos.

A segunda PCR (nested) foi constituída de 25 µL de Go Taq® Green Master Mix (Promega), 2 µL de DNA amplificado, 50 µM de cada oligonucleotídeo CK2 e CK4

(Keeler *et al.*, 1998) e Nuclease-Free Water (Promega) para um volume final de 50 µL. O ensaio foi executado por um ciclo de 94°C por um minuto, seguindo-se 40 ciclos (94°C/ 30 segundos, 50°C/ 45 segundos e 72°C/ 1 minuto) e uma extensão final de 72°C por 5 minutos. Os produtos da PCR, de aproximadamente 600 pb, foram corados com GelRed™ (Biotium) por eletroforese em gel de agarose 1,8% utilizando-se o padrão molecular de 100 pb DNA Ladder (Invitrogen™) e revelados com o auxílio de um transiluminador de incidência de luz ultravioleta. A amplificação do segmento genômico alvo do IBV foi realizada em triplicata para cada amostra na mesma corrida e os produtos foram sequenciados separadamente.

2.6. Sequenciamento e análise da sequência do gene S1

O sequenciamento foi realizado pela MacroGen (<http://www.macrogen.com/eng/>), e as sequências de nucleotídeos do gene S1 de ambas as fitas foram compiladas utilizando o *software* CLC Genomics Workbench 7.5 (<http://www.clcbio.com/blog/clc-genomics-workbench-7-5/>). O programa BlastX (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) foi usado para pesquisa no Genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) para sequências homólogas de S1 do IBV.

3. RESULTADOS

3.1. Análises macro e microscópica

Na necropsia das aves apresentando sinais clínicos sugestivos da BIG foi observado deposição de urato no subcutâneo e em todas as serosas; rins aumentados de volume, hemorrágicos e/ou pálidos e retenção de urato nos ureteres (**Figura 9**).

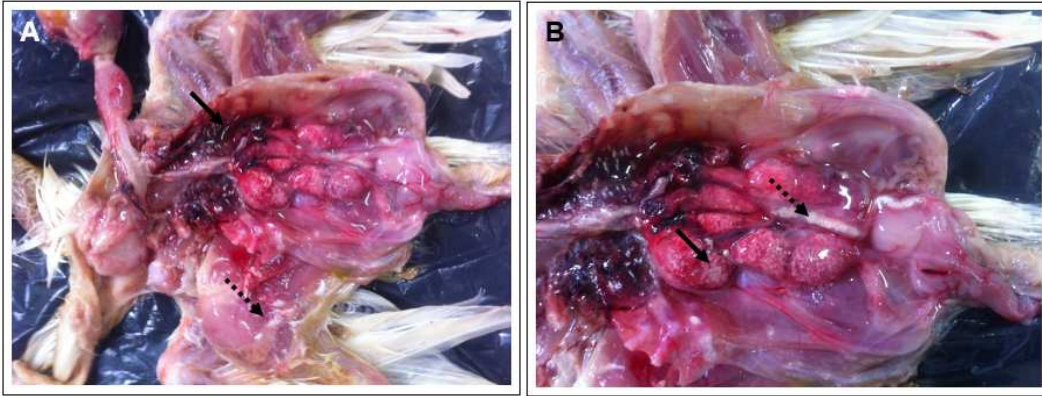


Figura 9- Lesões macroscópicas em galinhas. (A) Deposição de urato no subcutâneo (seta segmentada) e na pleura (seta contínua). (B) Rins aumentados de volume, hemorrágicos e/ou pálidos (seta contínua) e retenção de urato nos ureteres (seta segmentada). Fotos do autor.

Nefrite-nefrose tipicamente ocorre em galinhas como resultado de infecção por IBV. Alterações histológicas por essa síndrome são demonstradas na **figura 10**, caracterizadas por degeneração turva e necrose de coagulação tubular, edema intersticial, acentuado acúmulo de uratos e cilindros granulosos intratubulares, infiltrado de células mononucleares (linfócitos e plasmócitos) na cortical e medular. Os glomérulos mostram-se invadidos por células inflamatórias, exibindo um quadro de glomerulite aguda.

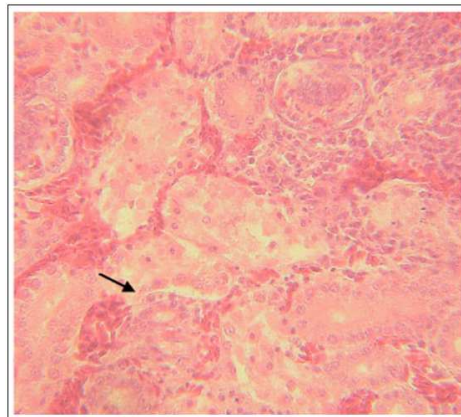


Figura 10- Lesões microscópicas em amostra clínica de rim. Congestão, hemorragia e necrose focal nos túbulos urinários (seta) e infiltração de linfócitos no rim de galinha com 18 dias de idade naturalmente acometida pela BIG (HE x 400). Foto do autor.

3.2. Isolamento de IBV em ovos embrionados de galinha SPF

O isolamento de IBV de amostras clínicas de rins foi escolhido em detrimento dos demais devido ao fato desse órgão apresentar lesões macroscópicas evidentes e ter sido acreditado como a principal causa de morte das aves.

Após a terceira passagem seriada de rins de galinhas doentes, os embriões infectados e os do grupo controle foram analisados (**Figura 11**). Aos 7 dias pós-infecção o embrião do grupo controle exibe desenvolvimento normal (A), enquanto os embriões infectados exibem nanismo, enrolamento e hiperemia (B), indicando isolamento do IBV.

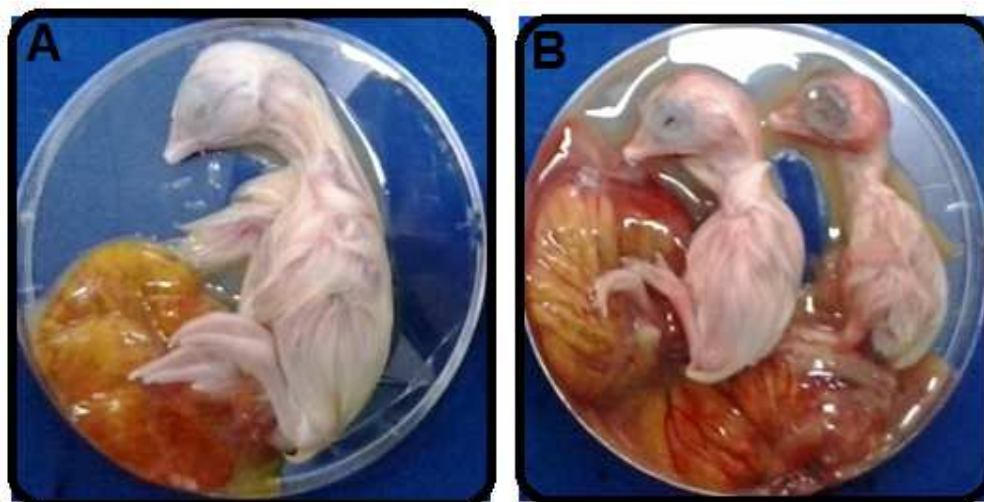


Figura 11: Isolamento de IBV em ovos embrionados de galinha SPF. (A) embrião não infectado apresentando desenvolvimento normal, **(B)** embriões infectados após a terceira passagem de rins de galinhas doentes exibindo aos sete dias pós-infecção nanismo, enrolamento e hiperemia. Os embriões foram desenrolados para apresentação. Fotos do autor.

3.3. Análise da sequência parcial de nucleotídeos de S1 dos IBV identificados diretamente de amostras clínicas

As sequências de nucleotídeos de S1 obtidas nesse estudo diretamente de amostras clínicas de galinhas foram comparadas com a sequência da vacina Ma5 original (**Quadro 7**).

No alinhamento foi verificado que os IBV identificados na traqueia (TR) e no intestino delgado (ID) exibiram 100% de identidade com a vacina Ma5. No entanto, IBV variante foi identificado em órgão específico. Nos pulmões (PU) foi identificado IBV exibindo 4 mudanças de nucleotídeos na sequência de S1, sendo T345C, G353T, C389T e C426A, na comparação com a vacina Ma5. Na bolsa cloacal (BC) as mudanças foram observadas em três posições G353A, C426A e G537C. Nos rins (RI) foi verificada a maior variação, totalizando nove mudanças. Essas mudanças

ocorreram nas posições T147A, T162C, T206C, G218A, T301C, C389T, C536A, G614A e G669A.

Quadro 7: Alinhamento das sequências parciais de S1 detectadas em amostras clínicas mostrando as posições dos nucleotídeos exibindo polimorfismos em relação a vacina Ma5. Os polimorfismos estão destacados em vermelho.

Posição do nucleotídeo/ Amostras	147	162	206	218	301	345	353	389	426	536	537	614	669
Vacina Ma5 original	T	T	T	G	T	T	G	C	C	C	G	G	G
TR	T	T	T	G	T	T	G	C	C	C	G	G	G
ID	T	T	T	G	T	T	G	C	C	C	G	G	G
PU	T	T	T	G	T	C	T	T	A	C	G	G	G
BC	T	T	T	G	T	T	A	C	A	C	C	G	G
RI	A	C	C	A	C	T	G	T	C	A	G	A	A

TR: traqueia; ID: intestino delgado; PU: pulmão; BC: bolsa cloacal e RI: rim.

3.4. Análise da sequência parcial de aminoácidos de S1 dos IBV identificados diretamente de amostras clínicas

A similaridade entre os aminoácidos da sequência parcial do gene S1 das amostras obtidas foram avaliadas, correspondente aos resíduos 43-236 da estirpe M41 (**Quadro 8**). Apesar da pouca mudança na sequência de nucleotídeos de S1 das amostras em comparação com a vacina Ma5, a maioria refletiu em alteração de aminoácidos. Essas alterações ocorreram entre os resíduos 69 a 205 que inclui a região hipervariável 2, no entanto, não foi verificada alteração na região hipervariável 1 das amostras na comparação com a vacina Ma5. Todas as mudanças na sequência de nucleotídeos de S1 verificadas na bolsa cloacal (BC) na comparação com a vacina Ma5 resultaram em alteração de aminoácidos (3/3), sendo as alterações verificadas nos códons G118D, A179D e A205R; nos pulmões (PU) (4/3) nos códons G118V, A179E e A205R. Enquanto nos rins (RI) (9/6) ocorrem alterações nos códons I69T, G73D, Y101H, S130F, A179E e A205K. As sequências de aminoácidos das amostras também foram mais similares à vacina Ma5 na comparação com a estirpe de referência patogênica (M41).

Quadro 8: Alinhamento das sequências parciais de aminoácidos de S1 obtidas de amostras clínicas mostrando as posições dos aminoácidos exibindo polimorfismos em relação a vacina Ma5 e a estirpe Mass 41. A numeração foi baseada na sequência S1 da estirpe Mass 41 (nº acesso M21883; GenBank). A localização das duas regiões hipervariáveis identificada por Kusters *et al.* (1989).

Códon/ Amostras	Região conservada	Região hipervariável 1				Região hipervariável 2	Região conservada		
	43-47	54-68	69	73	101	116-141	179	205	229-236
Mass 41	HGGAY	SESNNAGSSPGQVG	T	G	H	KYDGGCPITGM LQKNFLRVSAM KNGQL	A	K	CQYNTG
Ma5	HGGAY	SESNNAGSSSGCTVG	I	G	Y	KHGGCPITGM LQQHSIRVSAM KNGQL	A	A	CQYNTG
TR	HGGAY	SESNNAGSSSGCTVG	I	G	Y	KHGGCPITGM LQQHSIRVSAM KNGQL	A	A	CQYNTG
ID	HGGAY	SESNNAGSSSGCTVG	I	G	Y	KHGGCPITGM LQQHSIRVSAM KNGQL	A	A	CQYNTG
PU	HGGAY	SESNNAGSSSGCTVG	I	G	Y	KHVGCPITGM LQQHSIRVSAM KNGQL	E	R	CQYNTG
BC	HGGAY	SESNNAGSSSGCTVG	I	G	Y	KHDGCPITGM LQQHSIRVSAM KNGQL	D	R	CQYNTG
RI	HGGAY	SESNNAGSSSGCTVG	T	D	H	KHGGCPITGM LQQHFRVSAM KNGQL	E	K	CQYNTG

TR: traqueia; ID: intestino delgado; PU: pulmão; BC: bolsa cloacal e RI: rim.

3.5. Análise da sequência parcial de S1 de IBV identificado após o isolamento de amostras clínicas de rins

Na primeira passagem de amostras clínicas de rins em ovos embrionados não foi detectado IBV a partir do líquido corio-alantoide (LCA), no entanto a vacina Ma5 foi detectada nos rins de embriões (**Quadro 9**). Embora não foi visualizado nenhum pico secundário nos cromatogramas da sequência parcial de S1 do vírus obtida diretamente de amostras clínicas de rins que pudessem indicar a presença da vacina. Por outro lado, o isolamento de IBV de amostras clínicas de rins após a terceira passagem utilizando o LCA exibiu mudança em 12 nucleotídeos no fragmento de S1 analisado na comparação com aquela obtida diretamente de amostras clínicas de rins, e somente o nucleotídeo A na posição 536 foi conservado. Em três posições foram verificadas mutações: T345C, G353T e C426T; enquanto os demais nucleotídeos do vírus isolado reverteram para o genótipo da vacina nas posições A147T, C162T, C206T, A218G, C301T, T389C, A537G, A614G e A669G.

Quadro 9: Alinhamento das sequências parciais de S1 obtidas de amostras clínicas de rins e após passagem em ovos embrionados. São mostradas as posições e a sequência de nucleotídeos da vacina Ma5 (vermelho), do IBV detectado em amostra clínica de rins (azul), de rins de embrião na 1ª passagem e do LCA de embrião após a 3ª passagem de amostras clínicas de rins.

Posição do nucleotídeo/ amostra	147	162	206	218	301	345	353	389	426	536	537	614	669
Vacina Ma5	T	T	T	G	T	T	G	C	C	C	G	G	G
Rins doentes	A	C	C	A	C	T	G	T	C	A	A	A	A
Rim doente isolado em rim de embrião após a primeira passagem	T	T	T	G	T	T	G	C	C	C	G	G	G
Rim doente isolado em LCA de embrião após a terceira passagem	T	T	T	G	T	<u>C</u>	<u>I</u>	C	<u>I</u>	A	G	G	G

4. DISCUSSÃO

No presente estudo, um fragmento de S1 de IBV foi amplificado e identificado diretamente de diferentes amostras clínicas de galinhas previamente vacinadas com a vacina Ma5, mas apresentando sinais clínicos compatíveis com a BIG. À exceção da traqueia e do intestino delgado que foi detectada a vacina Ma5, em todos os demais órgãos analisados foi detectado IBV variante específico em cada órgão. Essa grande diversidade genética de IBV detectada em amostras clínicas indica ser reflexo de um elevado nível inicial de replicação da amostra de campo, fornecendo oportunidade adicional para gerar vírus variantes patogênicos ao hospedeiro, e reforçando a ideia de falha de vacinação. Portanto, esse achado tem grande relevância por fornecer informações adicionais e um melhor entendimento da complexa interação multifatorial existente entre a infecção por IBV de campo e a galinha, podendo resultar na manifestação de distintos sinais clínicos e processos patológicos verificados num mesmo lote de aves acometidos pela doença.

Ao mesmo tempo os resultados desse estudo confirmam a frequente identificação de IBV variantes no Brasil, na maioria das vezes em plantéis avícolas vacinados, que são isolados de casos clínicos compatíveis com a BIG, mas com sequências de S1 muito semelhantes às vacinas (Fraga *et al.*, 2013; Chacón *et al.*, 2011; Villarreal *et al.*, 2010). No entanto, nenhum deles exibiu 100% de identidade com aqueles já descritos no país. Foi preconizado que a evolução de IBV inclui tanto a geração de diversidade genética, caracterizada por eventos de mutação e/ou recombinação que ocorrem durante a replicação viral, quanto o processo de seleção exercido pelas múltiplas forças ambientais dentro do hospedeiro sobre as inúmeras populações emergentes do vírus (Toro *et al.*, 2012). Portanto, parece razoável assumir que diferentes práticas de manejo, medidas de biossegurança e *status* de saúde dos plantéis verificados em distintos sistemas de produção também poderiam exercer diferentes forças no processo evolutivo do vírus.

A prevenção da BIG na unidade de produção avícola estudada é sistematicamente realizada em pintos na primeira semana de vida utilizando a vacina Ma5 por *spray*, no entanto, alguns lotes de galinhas exibindo sinais clínicos compatíveis com a doença são cada vez mais frequentes. Na verdade, muitos estudos têm relatado as limitações e os inconvenientes decorrentes dessa prática.

Em vários estudos de vacinação contra o IBV foi demonstrada a eficácia de proteção contra desafio quando a vacinação foi realizada no primeiro dia de vida (de Wit *et al.*, 2011; Cook *et al.*, 1999). No entanto, nesses estudos uma segunda dose foi realizada duas semanas depois, o que pode ter mascarado a ineficiência relativa da resposta imune específica após a primovacinação. Esses resultados sugerem que a

vacinação contra o IBV em idade precoce pode não ser totalmente protetora, e como consequência os pintos permanecem vulneráveis ao desafio. Um estudo recente demonstrou a falta de proteção mediada por vacina no grupo de pintinhos vacinados com 1 dia de vida e em menor extensão no grupo vacinado com 7 dias de idade, enquanto as aves vacinadas aos 14 dias de idade foram protegidas após o desafio com uma estirpe homóloga (van Ginkel *et al.*, 2015).

Outro fator que pode influenciar a vacinação precoce é o nível de anticorpos maternos, uma questão não abordada nesse estudo. No entanto, é sabido que existe uma relação linear com o nível de anticorpos no plasma da galinha e a transferência de IgG (IgY) para a circulação dos pintinhos. Quando pintos de 1 dia com altos títulos de anticorpos maternos foram desafiados com IBV foi verificado 95% de proteção, mas inferior a 30% quando desafiados aos 7 dias. De acordo com os autores, essa proteção correlaciona com anticorpos respiratórios locais e não anticorpos séricos (Mondal e Naqi, 2001). Isso suporta que a proteção por anticorpos maternos, que é predominantemente do isotipo IgG, tem importância para evitar a ativação de um sistema imune imaturo, incapacitando-o de gerar uma resposta imunitária totalmente protetora em idade precoce da vida.

A importância da aplicação correta da vacina viva também tem sido subestimada, especialmente quando a vacina é acidental ou propositalmente super diluída, induzindo resposta imune de forma ineficaz. Um estudo utilizando uma ampla variação na dose de vacina contra o IBV da estirpe VicS (diferença de 200 vezes) demonstrou que a dosagem da vacina teve um efeito significativamente maior na diversidade de subpopulações do vírus após a replicação em galinhas (Ndegwa *et al.*, 2014). Por outro lado, equipamentos mal regulados para vacinação por *spray* pode exacerbar a resposta vacinal. É uma preocupação a maior frequência de sinais clínicos e lesões mais severas associadas à vacina contra o IBV, especialmente no trato respiratório, aumentando assim a incidência de colibacilose nas aves vacinadas (Matthijs *et al.*, 2003).

A imunodepressão das aves e a incidência de IBV provavelmente pode também ter influência negativa no resultado da vacinação, resultando em falha de proteção adequada em galinhas vacinadas contra o vírus, embora essa relação não foi investigada na atual pesquisa. No entanto, um estudo verificou que muitos surtos de BIG ocorreu em galinhas simultaneamente mostrando hipotrofia da bolsa cloacal e/ou do timo (Toro *et al.*, 2006). Em ambientes de produção, as galinhas são expostas a vários fatores de estresse e agentes infecciosos e não infecciosos que prejudicam a imunidade inata e adaptativa (Hoerr, 2010). Em concordância com a literatura, infecções com o vírus da doença de Marek, vírus da doença de Gumboro e vírus da

anemia infecciosa das galinhas são vírus endêmicos, e não infecciosos como as micotoxinas, que são onipresentes em sistema de produção avícola, são todos conhecidos como agentes imunodepressores (Adair, 2000; Ingraio *et al.*, 2013; Mahgoub *et al.*, 2012; Singh *et al.*, 2012; Yunus *et al.*, 2012). Portanto, uma maior diversidade viral em uma população parcialmente imune proporciona uma oportunidade adicional de adaptação e evasão da resposta imune (Gandon e Day, 2008; McKinley *et al.*, 2008; Gandon e Mackinnon, 2001).

No campo, proteção ao nível de plantel é de maior interesse do que ao nível de proteção individual, pois é importante assegurar que a vacina previna a transmissão de vírus desafio de uma ave infectada para outras do mesmo lote. Assim, um fenômeno de “reação de rolagem” de vacina pouco documentado, mas amplamente aceito, ocorre em lotes de galinhas comerciais quando menos de 100% das aves recebem a vacina, permitindo a transmissão repetida do vírus vacinal de aves vacinadas para aquelas não vacinadas. A natureza altamente infecciosa de IBV combinada com vacinação e re-infecção pela vacina em um lote de galinhas, provavelmente favorece o surgimento de variantes virais. A evidência para isso pode ser encontrada na multiplicidade de vírus variantes com sequências muito semelhantes a vacina utilizada no lote (Nix *et al.*, 2000).

Muitos métodos, contemplando uma ampla variedade de técnicas atualmente disponíveis, têm sido utilizados para detectar direto ou indiretamente o IBV. No entanto, em relação a um problema clínico no campo, é imprescindível incluir a identificação do isolado envolvido, a fim de permitir a escolha de um programa de vacinação com melhor possibilidade de conseguir uma proteção suficiente contra o IBV no lote seguinte e/ou monitorar os fenômenos de variação que ocorrem no curso da evolução do vírus.

Embora a análise das sequências de S1 exibiu alta similaridade ao nível de nucleotídeos com a vacina Ma5, todas as amostras de IBV detectadas nesse estudo exibiram mudança de aminoácido, que em última análise reflete em diferenças antigênicas e fenotípicas do vírus. Portanto, esse achado tem grande importância sob o ponto de vista aplicado porque ele ilustra o potencial repertório antigênico, e principalmente patogênico, que a infecção por IBV de campo pode imputar sobre um lote de galinhas. Nesse lote acometido pela BIG foi relatada alta taxa de mortalidade e, embora o maior acometimento dos rins pode ter sido a principal causa, essas aves também apresentavam sinais clínicos extra-renais, tais como transtornos respiratório e digestivo. O fato das sequências de S1 dos vírus de campo serem mais similares à vacina Ma5 utilizada nesse lote de galinhas na comparação com a estirpe de

referência patogênica (M41), que é intimamente relacionada genética e antígenicamente com a vacina, não está em desacordo com a literatura.

Estudos reportando o nível de homologia no gene S1, ou uma parte dele, e o nível de proteção cruzada mostraram que, em geral, existe grande chance de bom nível de proteção cruzada entre estirpes com um alto nível de homologia do que entre estirpes com baixa homologia. No entanto, as pesquisas também mostram que a relação não é muito forte. Algumas estirpes que diferem por somente uma pouca porcentagem de outras estirpes na parte sequenciada de S1 mostraram uma queda significativa em proteção cruzada, enquanto que houve um alto nível de proteção cruzada contra outras estirpes com homologia mais baixa. Os resultados também mostram uma ampla variação no nível de proteção cruzada que é obtida para estirpes com o mesmo nível de homologia em comparação com as estirpes que são usadas como vacinas (Abdel-Moneim *et al.*, 2006; Meir *et al.*, 2004). No entanto, uma limitação que necessita ser considerada é o tamanho e a localização diferente na região S1 de IBV que diferentes grupos de pesquisas usam para suas análises e o nível de homologia.

Ainda, as proteínas S1 das estirpes Beaudette e M41 de IBV possuem 95% de similaridade de aminoácidos. Quando galinhas foram inoculadas com um IBV Beaudette recombinante expressando S1 da estirpe M41, uma boa proteção foi induzida contra o desafio com a M41, conforme avaliado pela atividade ciliar. Em contraste, a inoculação com a estirpe Beaudette induziu muito pouca proteção contra o desafio com a M41, sugerindo que alguns dos poucos aminoácidos que diferem entre as duas estirpes estão associados com epitopos indutores de proteção (Hodgson *et al.*, 2004). Outro estudo demonstrou que alguns isolados da estirpe D274 de IBV que possuem ao nível de S1 uma identidade de nucleotídeos $\geq 97\%$ e similaridade de aminoácidos $\geq 95\%$ foram estimadas como sendo de diferentes sorotipos por testes de neutralização utilizando culturas de órgãos de traqueia (Cavanagh *et al.*, 1992; Cook e Huggins, 1986; Cook, 1984).

O estudo de proteção cruzada utilizando galinhas SPF é o sistema mais importante sob o ponto de vista prático, presumivelmente porque ele avalia a resposta imune completa (humoral e celular) e, portanto, fornece informação mais confiável sobre a eficácia de uma vacina. Como demonstrado no presente estudo, uma ampla diversidade antigênica foi verificada entre as amostras de campo de IBV infetando órgãos específicos das galinhas acometidas pela doença dentro de um mesmo lote. Embora essas amostras do vírus poderiam compartilhar epitopos na imunidade cruzada, seria importante avaliar todas. No entanto, esse estudo é intensivamente laborioso, caro e requer um grande número de galinhas e facilidade de isolamento.

O mais comum para o diagnóstico de rotina, além é claro do histórico, sinais clínicos e achados anatomopatológicos sugestivos da doença, é o isolamento de IBV em ovos embrionados de galinha SPF para conseguir quantidades suficientes do genoma viral e utilizar o líquido corio-alantoide do embrião para a amplificação do gene de interesse do vírus na RT-PCR, mais frequentemente da glicoproteína S1 (total ou parcial), seguido pelo sequenciamento. São necessárias três ou mais passagens em ovos embrionados para o isolamento primário de IBV; no entanto, o grau de mutação do vírus é relatado aumentar drasticamente quando o número de passagens aumenta (Liu *et al.*, 2009). É conhecido também que somente estirpes adaptadas a ovos embrionados induzem lesões embrionárias evidentes, e que alguns isolados de campo de IBV não induzem lesões características durante várias passagens (de Wit, 2000).

Como verificado nesse estudo, quando amostras clínicas de rins de galinhas infectados com IBV identificados como variantes foram inoculadas em ovos embrionados para o isolamento e utilizando rins de embriões após a 1ª passagem para a identificação molecular do vírus, somente a vacina Ma5 foi detectada. Uma possível explicação pode ser devido ao fato do IBV existir como uma mistura de mutantes genéticos dentro de um isolado. Como o sequenciamento detecta a subpopulação predominante em uma amostra é possível que a proporção da vacina em amostras clínicas de rins de galinhas estivesse baixa o suficiente para não ser detectada por sequenciamento dos produtos da RT-PCR. Por outro lado, a detecção da vacina em rins de embrião, provavelmente, seja devido a vacina ser altamente adaptada ao embrião e, portanto, sua replicação deve ter sido favorecida em detrimento do vírus variante.

Em contrapartida, foi verificado que o IBV obtido do LCA de embriões após a 3ª passagem de amostras clínicas de rins de galinhas exibiu significativas alterações genéticas na comparação com a sequência de S1 obtida diretamente do órgão. A variação genética especialmente na sequência de S1 de IBV de campo passado em ovos embrionados é bem documentada, no entanto essa variação é mais frequentemente verificada após um número maior de passagens para a atenuação do vírus. Esse resultado indica que amostras de IBV de campo pode ter comportamento genético diferente, sendo concebível que esses vírus se deparam com microambientes diferentes e, portanto, passíveis de seleção e/ou mutação.

A análise da sequência de um isolado de campo (estirpe 793/B) atenuado após passagens em ovos embrionados, seguido por uma passagem em galinhas e novamente uma passagem em ovos embrionados revelou seleção de nucleotídeos em S1 nos vírus passados em galinhas e em ovos embrionados. Os autores sugerem que o isolado de campo era composto por uma mistura de duas subpopulações de IBV,

sendo que a subpopulação inferior na amostra de campo foi selecionada para embriões, enquanto a predominante foi selecionada para galinhas (Cavanagh *et al.*, 2005).

Sendo assim, a isolamento de IBV de amostras clínicas em ovos embrionados para identificação podem não confirmar o papel do vírus detectado como o agente causador de um surto de doença. Adicionalmente, o isolamento de IBV em ovos embrionados de galinha SPF é trabalhoso, demorado e caro, além de estarem em desacordo com a nova filosofia de pensamento sobre os princípios de bem-estar animal e bioética, embora ainda existam situações em que eles simplesmente não podem ser substituídos. Portanto, é válido tentar identificar IBV diretamente de amostras clínicas para obter sequências genômicas com mais confiabilidade, especialmente quando o objetivo é efetuar estudos filogenéticos. Caso contrário, a obtenção de sequência genômica de IBV após o isolamento em ovos embrionados pode ser uma adição de variação para esses dados.

5. CONCLUSÕES

Conforme verificado nesse trabalho, a identificação de IBV pode ser conseguida diretamente de amostras clínicas e que subpopulações do vírus são detectadas em órgãos específicos de galinhas acometidas pela doença dentro de um mesmo lote.

O isolamento de IBV de amostras clínicas em ovos embrionados, mesmo que utilizando poucas passagens, pode sofrer mutações em S1.

**CAPÍTULO III – ESTABELECIMENTO DE INFECÇÃO PERSISTENTE E EVIDÊNCIA
DE TRANSMISSÃO VERTICAL DE ESTIRPE VACINAL Ma5 DE
*Infectious bronchitis virus***

RESUMO

A persistência de IBV em um lote de galinhas em final do ciclo de produção, previamente vacinado com a vacina Ma5 e naturalmente acometido pela doença na fase inicial de vida, foi investigado. Para compor esse estudo, diferentes órgãos de galinhas aparentemente saudáveis foram pesquisados para a presença do vírus. A vacina Ma5 foi detectada no intestino delgado, rins e oviduto dessas aves. No entanto, um IBV variante, denominado aqui como TC/15, exibindo significativa variação genética na sequência parcial de S1 na comparação com a vacina Ma5 e aquelas identificadas nos diferentes órgãos das aves na época da doença, foi detectado nas tonsilas cecais. Devido a grande variação genética exibida por esse vírus, ele foi agrupado na árvore filogenética no grupo/sorotipo (BR-I) distinto do sorotipo da vacina e das demais amostras (Mass), previamente descrito. Como esperado, essa variação genética também refletiu de forma significativa na sequência de aminoácidos de S1. Adicionalmente, embriões vivos com 18 dias de incubação oriundos desse lote foram utilizados para a detecção e identificação de IBV. Utilizando o LCA desses embriões a vacina Ma5 foi detectada. Embora não foi possível verificar a proporção de embriões que estavam infectados pela vacina, devido a utilização de um *pool* do LCA, esse achado tem grande relevância em termos práticos. Tomados juntos, esses resultados sugerem que, além da vacina, outra (s) subpopulação (s) de IBV podem persistir por longos períodos no hospedeiro e, pelo menos em galinhas em final de produção a vacina Ma5 pode ser transmitida verticalmente. A significância da persistência desses vírus, bem como da transmissão vertical, embora especulativa, são discutidos.

**CHAPTER III- ESTABLISHMENT OF PERSISTENT INFECTION AND EVIDENCE OF
VERTICAL TRANSMISSION OF VACCINE STRAIN Ma5 of *Infectious bronchitis
virus***

ABSTRACT

The persistence of IBV in a flock of broiler breeders at the end of the production cycle, previously vaccinated with the vaccine Ma5 and naturally affected by illness in early stage of life, was investigated. For this study, different organs of apparently healthy chicken were researched for the presence of the virus. Ma5 vaccine was detected in the small intestine, kidneys and oviduct of these birds. However, a variant IBV, referred to herein as the TC/15, exhibiting significant genetic variation in the partial sequence S1 in comparison with the Ma5 vaccine and those identified in the different organs of the birds at the time of disease, was detected in the cecal tonsils. Due to the great genetic variation displayed by this virus, it was clustered in the phylogenetic analysis with the previously characterized BR-I genotype strains, different from the serotype of the vaccine and the other samples (Mass). As expected, this genetic variation also reflected significantly in the amino acid sequence of S1. Additionally, living embryos with 18 days of incubation originating from this flock were used for the detection and identification of IBV. Using the LCA of these embryos the vaccine Ma5 was detected. Although it has not been possible to ascertain the proportion of embryos that were infected by the vaccine, because the use of a pool of LCA, this finding has great importance in practical terms. Taken together, these results suggest that, in addition to the vaccine, other subpopulation (s) of the IBV can persist for long periods in the host and, at least in chickens at the end of production the vaccine Ma5 can be transmitted vertically. The significance of the persistence of these viruses, as well as vertical transmission, although speculative, is discussed.

1. INTRODUÇÃO

Alguns trabalhos experimentais têm verificado a capacidade de IBV vacinal estabelecer infecção por longos períodos de tempo em galinhas, enquanto outros detectaram concentração de RNA do vírus aumentada e mais persistente em galinhas sofrendo de imunodepressão a nível de campo (Toro *et al.*, 2006; Naqi *et al.*, 2003).

Ao mesmo tempo que os resultados de pesquisas experimentais demonstram que a presença de anticorpos no tempo da infecção protegem órgãos internos de infecção contra o IBV, eles verificam a eliminação e persistência a longo prazo em tecidos específicos de galinhas infectadas com a vacina.

É evidente que a persistência e eliminação de IBV por longos períodos de tempo em galinhas tem grandes implicações no controle dessa infecção, e o entendimento desse fenômeno ainda não está claro. Muitos trabalhos têm especulado que a persistência pode favorecer os fenômenos de mutação e/ou recombinação, permitindo a evolução do vírus para um fenótipo virulento (Toro *et al.*, 2012). Além disso, essa maior diversidade viral pode elevar a complexidade da epidemiologia, dificultando ainda mais a interpretação das diferentes manifestações clínicas e o diagnóstico da BIG.

O papel da transmissão vertical na epidemiologia de IBV também não está comprovado em nível de campo, provavelmente, muito se deve a falta de estudos nessa área. No entanto, em galinhas infectadas experimentalmente o vírus foi recuperado a partir de ovos postos entre uma e 6 semanas após a infecção, bem como o vírus foi isolado a partir de de uma pequena quantidade de pintos de um dia dessas galinhas (Cook, 1971).

Diante dessas evidências, parece razoável investigar se galinhas previamente vacinadas e acometidas pela BIG podem atuar como reservatório ou estabelecer infecção persistente por IBV. Embora não seja possível determinar persistência de IBV em nível de campo, em função das inúmeras fontes possíveis de introdução do vírus, é esperado obter importantes informações na relação vírus/hospedeiro e a tendência evolutiva dos potenciais IBV detectados.

Para explorar essa investigação, diferentes órgãos de galinhas em final de produção e líquido corio-alantoide de embriões vivos com 18 dias de incubação oriundos desse lote foram utilizados como fonte de RNA genômico de IBV para a detecção e identificação molecular.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Amostras de campo

Ao final do ciclo de produção do lote de matrizes (52 semanas – 364 dias de idade) estudado na presente pesquisa, que foi previamente vacinado com a vacina Ma5 aos 2 dias de vida e acometido pela BIG aos 18 dias de idade, foi relatado um índice zootécnico inferior desse lote em comparação com outros na mesma propriedade, caracterizado por menor produção e qualidade de ovos, taxa de fecundidade e eclodibilidade, apesar das aves terem sido vacinadas contra diferentes agentes infecciosos, incluindo um reforço de vacina inativada contra o IBV. Para tanto, cinco galinhas sacrificadas e refrigeradas foram enviadas ao DVT/UFV. Embora à necropsia não foi visualizada nenhuma lesão macroscópica, foram coletados rins, intestino delgado, tonsilas cecais e oviduto sob a forma de *pool* para formar um conjunto de cada órgão, que foram armazenados a -80°C. Além disso, dez ovos embrionados vivos desse lote (18 dias de incubação) foram refrigerados a 4°C por 24 horas e coletado aproximadamente um mililitro de líquido cório-alantoide de cada embrião para formar um *pool* e armazenado a -80°C até o momento do seu processamento.

2.2. Extração de RNA

Para a extração do RNA das amostras teciduais, fragmentos de rins, intestino delgado, tonsilas cecais e oviduto das galinhas foram macerados com um micropistilo em um microtubo juntamente com Trizol® Reagent (Invitrogen™), conforme as especificações do fabricante. Do LCA dos embriões obtidos no item 2.1, o RNA viral foi extraído utilizando-se Trizol® LS Reagent (Invitrogen™) de acordo com as recomendações do fabricante. O RNA foi ressuspenso em 50 µL de UltraPure™ DEPC-treated Water (Invitrogen™), analisado e quantificado pelo método de fluorescência utilizando-se NanoDrop Lite Spectrophotometer (Thermo Scientific) e imediatamente utilizado na reação de transcrição reversa.

2.3. Síntese de cDNA

O RNA do IBV foi retrotranscrito para cDNA no termociclador Veriti® Thermal Cycler (Applied Biosystems). O volume final da mistura de reação foi de 20 µL, contendo 2 a 5 µL de RNA e a enzima SuperScript® III Reverse Transcriptase (Invitrogen™) conforme recomendações do fabricante. Para a síntese do cDNA a ser utilizado na PCR convencional foram usados 50 µM do oligonucleotídeo S1OLIGO3' (Kwon *et al.*, 1993). Os cDNA's foram quantificados pelo método de fluorescência

utilizando-se NanoDrop Lite Spectrophotometer (Thermo Scientific) e imediatamente utilizados.

2.4. Nested RT-PCR

A amplificação foi realizada em duas reações consecutivas no termociclador Veriti® Thermal Cycler (Applied Biosystems). Na primeira reação, a RT-PCR foi realizada em microtubos de 0,2 mL contendo 25 µL de Go Taq® Green Master Mix (Promega), 3-5 µL de cDNA, 50 µM de cada oligonucleotídeo S1OLIGO5' e S1OLIGO3' (Kwon *et al.*, 1993) e Nuclease-Free Water (Promega) para um volume final de 50 µL. As condições de amplificação foram constituídas por um ciclo de 94°C por um minuto, seguindo-se 35 ciclos (94°C/ 30 segundos, 50°C/ 45 segundos e 72°C/ 2 minutos) e uma extensão final de 72°C por 10 minutos.

A segunda PCR (nested) foi constituída de 25 µL de Go Taq® Green Master Mix (Promega), 2 µL de DNA amplificado, 50 µM de cada oligonucleotídeo CK2 e CK4 (Keeler *et al.*, 1998) e Nuclease-Free Water (Promega) para um volume final de 50 µL. O ensaio foi executado por um ciclo de 94°C por um minuto, seguindo-se 40 ciclos (94°C/ 30 segundos, 50°C/ 45 segundos e 72°C/ 1 minuto) e uma extensão final de 72°C por 5 minutos. Os produtos da PCR, de aproximadamente 600 pb, foram corados com GelRed™ (Biotium) por eletroforese em gel de agarose 1,8% utilizando-se o padrão molecular de 100 pb DNA Ladder (Invitrogen™) e revelados com o auxílio de um transiluminador de incidência de luz ultravioleta. A amplificação do segmento genômico alvo do IBV foi realizada em triplicata para cada amostra na mesma corrida e os produtos foram sequenciados separadamente.

2.5. Sequenciamento e análise da sequência do gene S1

O sequenciamento foi realizado pela MacroGen (<http://www.macrogen.com/eng/>), e as sequências de nucleotídeos do gene S1 de ambas as fitas foram compiladas utilizando o *software* CLC Genomics Workbench 7.5 (<http://www.clcbio.com/blog/clc-genomics-workbench-7-5/>). O programa BlastX (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) foi usado para pesquisa no Genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) para sequências homólogas de S1 do IBV.

Para estabelecer a relação evolutiva entre as amostras de IBV sequenciados no presente estudo foi montado um banco de dados com 39 sequências parciais do gene S1 do vírus. Esse banco de dados contemplou 7 sequências parciais identificadas nesse estudo juntamente com sequências de isolados brasileiros previamente descritos (BR-I e BR-II) e algumas estirpes de referência depositadas no GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank>).

Um total de 39 sequências de nucleotídeos foram alinhadas utilizando a plataforma *online* de alinhamento múltiplo global (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/>), comparando diferentes ferramentas (CLUSTAL W, MAFFT e MUSCLE), a fim de obter o resultado mais aproximado do alinhamento ótimo das sequências dos dois bancos de dados. Todas as ferramentas utilizadas apresentaram o mesmo resultado e, por convenção, foi escolhido o algoritmo MUSCLE para o alinhamento das sequências. Após o alinhamento, todas as lacunas foram removidas para cada par de sequências e um total de 451 sítios foram obtidos para cada sequência no banco de dados final.

A construção da árvore filogenética foi conduzida no aplicativo MEGA 6 (TAMURA *et al.*, 2013). As sequências foram agrupadas pelo método de distância por agrupamento, utilizando o algoritmo Neighbor-joining e o modelo de substituição de nucleotídeos de Kimura- 2- parâmetros. A consistência estatística foi calculada por 10.000 repetições pelo método de bootstrap.

3. RESULTADOS

3.1 Análise da sequência parcial de S1 dos VBIG

Um segmento de S1 de IBV foi amplificado diretamente de intestino delgado, rins, tonsilas cecais e oviduto de galinhas e no LCA de embriões viáveis com 18 dias de incubação oriundos desse lote. As sequências parciais de S1 de IBV obtidas no intestino delgado, rins e oviduto de galinhas, bem como do LCA de embriões foram alinhadas com a vacina Ma5 e foi verificado 100% de identidade de nucleotídeos.

Entretanto, nas tonsilas cecais foi detectado IBV variante, denominado aqui como TC/15, exibindo significativa variação genética. Além disso, foi verificada na região hipervariável 2 do gene S1 do vírus TC/15 inserções de aminoácidos em duas posições (**Quadro 10**). Em uma das posições foi verificada a inserção de 2 aminoácidos entre as posições 118 e 119 (ST) e mais 5 aminoácidos entre as posições 140 e 141 (NGPSG), baseado na sequência de aminoácidos da estirpe Ma5.

Quadro 10: Alinhamento da sequência parcial de aminoácidos de S1 de IBV identificados em órgãos de galinhas em final do ciclo de produção. A sequência de aminoácidos é baseada na estirpe de referência Ma5 (116-141) e as inserções de aminoácidos na sequência S1 do vírus TC/15 são mostradas em negrito.

Amostra	Região hipervariável 2
Ma5	KHG- - GCPITGMLQQHSIRVSAMKNGQ- - - - -L
ID	KHG- - GCPITGMLQQHSIRVSAMKNGQ- - - - -L
RI	KHG- - GCPITGMLQQHSIRVSAMKNGQ- - - - -L
OV	KHG- - GCPITGMLQQHSIRVSAMKNGQ- - - - -L
LCA	KHG- - GCPITGMLQQHSIRVSAMKNGQ- - - - -L
TC/15	KSG ST ACPLTGLIPQNHIRISAMKQGN NGPSG L

ID: intestino delgado; RI: rins; OV: oviduto; LCA: líquido corio-alantoide e TC/15: tonsilas cecais

1.2. Construção e análise da árvore filogenética

O programa BlastX (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) foi usado para pesquisa no GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) para sequências homólogas, sendo verificada alta similaridade genética entre o vírus TC/15 e outros IBV variantes previamente descritos no país.

Para a construção da árvore filogenética foram utilizadas a sequência parcial de S1 de IBV identificado nas tonsilas cecais das galinhas ao final do ciclo de produção (TC/15), as sequências parciais de nucleotídeos de S1 obtidas diretamente de amostras clínicas de galinhas desse lote na época em que foram acometidas pela doença (traqueia: TR, pulmão: PU, rins: RI, intestino delgado: IN e bolsa cloacal: BC),

bem como, alguns isolados brasileiros previamente descritos e algumas estirpes de referência recuperadas do GenBank (**Figura 12**).

Conforme demonstrado na árvore filogenética, os vírus identificados diretamente de amostras clínicas de galinhas (TR, PU, RI, IN, BC) exibiram alta similaridade na sequência parcial de S1 com a vacina Ma5 e, portanto, foram agrupados no genótipo Massachusetts (Mass). Por outro lado, o vírus TC/15 mostrou alta variação na sequência parcial de S1 na comparação com a vacina Ma5, mostrando acentuada divergência do genótipo Mass, sendo, portanto, agrupado com outras estirpes previamente caracterizadas no genótipo BR-I. (Fraga *et al.*, 2013; Chacón *et al.*, 2011; Villarreal *et al.*, 2010).

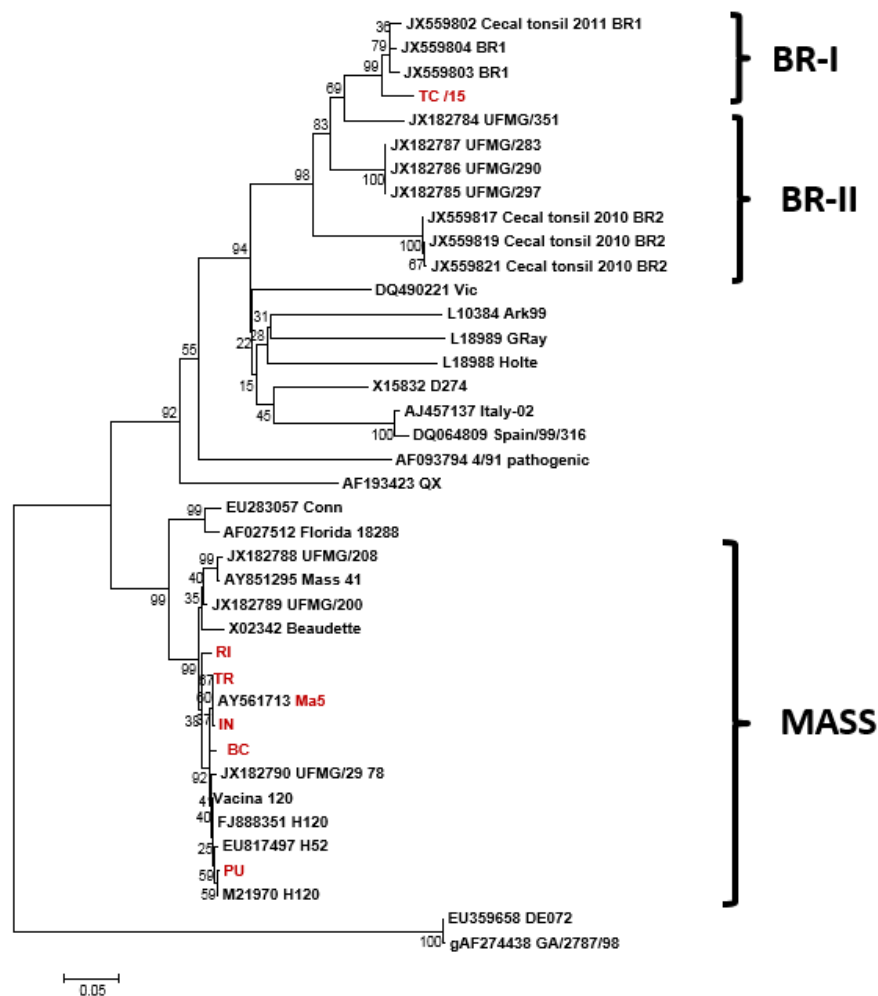


Figura 12: Relação filogenética de *Infectious bronchitis virus*. A árvore mostra a relação entre os IBV identificados diretamente de amostras clínicas de traqueia (TR), intestino delgado (IN), pulmões (PU), rins (RI) e bolsa cloacal (BC) na época em que as aves foram acometidas pela doença, o vírus identificado nas tonsilas cecais das galinhas ao ciclo de produção (TC/15), alguns isolados brasileiros previamente descritos e estirpes de referência recuperados do GenBank.

4. DISCUSSÃO

A dinâmica biológica e molecular de IBV foi estudada a nível de campo em um plantel de matrizes que foi previamente vacinado aos dois dias de vida com a vacina Ma5 e acometido na fase inicial de criação pela BIG aos 18 dias de idade.

Na época da doença clínica uma variedade de espécies de RNA do IBV foi identificada, sugerindo que a falha de vacinação permitiu um elevado nível inicial de replicação da amostra de campo, fornecendo oportunidade adicional para gerar essa grande diversidade genética do vírus, aumentando assim o repertório patogênico. Essa hipótese é sustentada pela identificação de subpopulações de IBV distintas daquelas identificadas na vacina original, que foram identificadas infectando órgãos específicos. No entanto, todos os IBV exibiram sequência de S1 muito semelhante à vacina Ma5 e, portanto, foram agrupados na árvore filogenética no mesmo genotipo da vacina (Mass), juntamente com outros IBV variantes previamente descritos no país acometendo planteis galinhas (Fraga *et al.*, 2013; Chacón *et al.*, 2011; Villarreal *et al.*, 2010).

Em contrapartida, quando as galinhas desse lote atingiram o final de produção (52 semanas de idade), a vacina Ma5 foi detectada no intestino delgado, rins e oviduto. No entanto, nenhuma das subpopulações de IBV identificadas nos órgãos das aves desse lote quando foram severamente acometidas pela BIG, foi detectada nas galinhas no final do ciclo de produção. Como as galinhas foram vacinadas antes de serem acometidas pela doença, esse achado sugere que a debelação da infecção por essas subpopulações (patogênicas) parece estar mais associada com a resposta imune induzida por esses próprios vírus do que necessariamente pela vacina.

Além da detecção da vacina Ma5 na maioria dos órgãos dessas galinhas ao final do ciclo de produção, uma outra subpopulação de IBV, denominada aqui como TC/15, foi identificada nas tonsilas cecais. O vírus TC/15 exibiu considerável variação genética na sequência parcial de S1 na comparação com a vacina Ma5 e os demais vírus variantes detectados na fase clínica da doença. Devido à grande variação genética exibida por esse vírus, ele foi agrupado na árvore filogenética no grupo/sorotipo BR-I previamente descrito (Fraga *et al.*, 2013; Chacón *et al.*, 2011; Villarreal *et al.*, 2010), distinto do sorotipo da vacina e dos demais vírus identificados em amostras clínicas no presente estudo (Mass).

Por outro lado, é curioso que o vírus TC/15 exibiu alta similaridade genética com os outros previamente descritos no grupo BR-I, que foram isolados de galinhas com doença clínica. A pequena diferença na sequência de nucleotídeos em S1 verificada entre o vírus TC/15 e os demais do grupo BR-I, parece ter conferido uma vantagem seletiva, visto que o vírus TC/15 foi detectado em galinhas aparentemente

saudáveis. Como o processo de imunidade é resultado de desafios imunogênicos vividos pela galinha por meio de exposição a patógenos, incluindo o IBV, conclui-se que galinhas mais velhas tendem a produzir maior concentração e melhor qualidade de imunoglobulinas quando comparadas aos pintos. Portanto, a detecção do vírus TC/15 sugere que a evolução do IBV não cessa, mas sim parece alterar ou seguir caminhos diferentes (Toro *et al.*, 2012), evoluindo para um genótipo mais adaptado ao hospedeiro.

Essa hipótese está totalmente em acordo com os coronavírus de mamíferos que têm mostrado sofrer constante mudança genética durante persistência *in vivo* (Adami *et al.*, 1995). De fato, uma variedade de formas variantes do vírus da hepatite murino (MHV) foi isolado de camundongos persistentemente infectados (Rowe *et al.*, 1997). Nesse estudo, 11 dos vinte camundongos persistentemente infectados abrigavam variantes exibindo deleção em S1, indicando que deleções são comuns durante infecção persistente, mas não requerida para estabelecer persistência (Rowe *et al.*, 1997). Além disso, foi verificado que cada camundongo abrigava variantes distintos em seu sistema nervoso central, ilustrando a complexidade da população de vírus de RNA persistentes que podem contribuir para a doença crônica.

Na percepção atual do processo evolutivo, os mecanismos responsáveis pela geração de variabilidade genética constituem-se na produção de variação em cada geração, sendo os variantes genéticos ou fenotípicos adequados expostos ao processo de seleção. Portanto, qualquer indivíduo, e por analogia o IBV, favorecido por essa seleção de genótipos irá contribuir para o *pool* de genes que estará apto a se espalhar nas futuras gerações e, assim, aumentar a adaptação da população como um todo (Mayr, 1988). Consistente com esses princípios, a persistência da infecção por determinadas populações de RNA de IBV detectadas no presente estudo indica que essas populações possuem um mecanismo altamente sofisticado para escapar do sistema imune. Do ponto de vista evolutivo, o escape imunológico confere uma vantagem seletiva, o que seria de interesse do vírus e estabelecer uma relação estável e de longo prazo com o hospedeiro, tendendo ao comensalismo.

Embora assumida a persistência do vírus TC/15, a sua detecção não exclui a possibilidade de ter sido amplificado o RNA inativado, e no presente estudo esse vírus não foi isolado para avaliar sua viabilidade. No entanto, isso não explicaria completamente porque os demais RNA's dos vírus detectados na fase clínica da doença não foram amplificados. Um estudo, ainda que de forma empírica, sugere uma possível explicação para a persistência viral que poderia ser aplicado e parece ajudar a explicar esse fenômeno.

É geralmente acreditado que indivíduos que reconhecem uma variedade de epitopos diferentes tem um melhor controle imune do que indivíduos que respondem por somente um epitopo. No entanto, um estudo transversal em indivíduos infectados por HIV-1 sugere que o inverso pode ser verdade, porque a persistente resposta à múltiplos epitopos é uma consequência de variação antigênica (Nowak *et al.*, 1995). Um típico antígeno proteico contém vários epitopos que podem ser reconhecidos por linfócitos T citotóxico (CTL), no entanto em uma resposta imune antiviral característica *in vivo*, os CTL reconhecem somente um pequeno número desses potenciais epitopos, algumas vezes somente um deles (Schaeffer *et al.*; 1989; Adorini *et al.*; 1988). Esse complexo fenômeno é conhecido como imunodominância, ou seja, uma competição não linear entre o sistema imune e os múltiplos epitopos de um patógeno geneticamente variável. Variação antigênica dentro dos epitopos que estimulam os CLT foi verificada para muitos vírus, e esse escape antigênico pode ser responsável para a persistência viral. Portanto, é possível que a vacina Ma5 e o vírus TC/15 detectado nas galinhas ao final do ciclo de produção representem subpopulações de IBV selecionadas de genomas persistentes.

População de patógeno antigenicamente homogênea estimula uma resposta imunodominante contra um simples epitopo, enquanto uma população de patógeno antigenicamente heterogênea induz respostas flutuantes complicadas contra múltiplos epitopos. A variação antigênica no epitopo dominante pode mudar a resposta para o epitopo mais fraco e, portanto, altera a pressão seletiva na população do patógeno como um todo e reduz o controle do patógeno (Nowak *et al.*, 1995). O conceito de mudança de imunodominância em resposta à variação antigênica poderia também explicar porque a infecção pela vírus TC/15 foi detectada restritamente nas tonsilas cecais. Eles podem se manter restritos e/ou em baixos níveis porque a pressão seletiva nessa população mudou com uma resposta imune alterada para a vacina Ma5 na época da avaliação.

É evidente que a persistência e eliminação de IBV por longo período de tempo em galinhas tem grandes implicações no controle dessa infecção, e a significância desses fenômenos ainda não está clara, bem como, o papel da transmissão vertical na epidemiologia de IBV também não está totalmente estabelecido. Portanto, um estudo adicional foi realizado objetivando verificar se é possível detectar IBV em ovos embrionados oriundos dessas galinhas persistentemente infectadas. Embora a infecção de ovos embrionados com estirpes vacinais de IBV matam o embrião poucas horas após a infecção, no presente estudo a vacina Ma5 foi detectada no LCA de embriões viáveis com 18 dias de incubação.

Consistente com esse achado, a transmissão vertical de IBV em galinhas foi suspeitada em um caso clínico de campo (McFerran *et al.*, 1971). Também existe relato da suspeita da transmissão de coronavírus aviário em avestruz (Villareal *et al.*, 2008). Em nível experimental, o IBV foi recuperado a partir de ovos postos entre uma e 6 semanas após a infecção de galinhas, bem como o vírus também foi isolado a partir de pintos de um dia dessas aves (Cook, 1971).

O papel dos galos na disseminação de IBV em lotes de matrizes, embora de grande importância, ainda é em grande parte desconhecido. No entanto, foi verificado que o vírus replica nos testículos de galos (Villarreal *et al.*, 2007a), e existe evidência experimental demonstrando que a transmissão venérea do vírus em galinhas é viável, e galinha inseminada com sêmen infectado pelo vírus foi positiva para o RNA viral na traqueia (Gallardo *et al.*, 2011).

A detecção da vacina Ma5 em embriões viáveis, provavelmente, reflete a natureza apatogênica da vacina. Por outro lado, o fato de somente a vacina Ma5 ter sido detectada em ovos embrionados de galinhas em final de produção, não exclui a possibilidade da transmissão do vírus TC/15. Essa hipótese é sustentada por pelo menos duas razões: 1) pela presença abaixo do limiar de detecção da RT-PCR e, 2) pelo fenômeno de oscilação imunológica descrito acima, ou seja, no momento em que os ovos foram analisados a resposta imune das galinhas estava direcionada para esse vírus e, portanto, inibindo sua replicação. Um estudo monitorando a excreção de IBV em galinhas experimentalmente infectadas verificou que a excreção do vírus não foi contínua, e algumas das aves re-excretaram o vírus depois de uma pausa na eliminação de até 42 dias (Naqi *et al.*, 2003).

A significância da transmissão vertical tem grande importância no controle da BIG, mas esse fenômeno parece ser de importância negligenciada. Uma analogia para uma dessas consequências foi a investigação da possibilidade de recombinação genômica entre diferentes estirpes de IBV pela co-infecção de ovos embrionados de galinha SPF com estirpes vacinais do vírus (Arkansas, Massachusetts e Connecticut) separadamente, com um vírus de campo Delaware-072, sendo observada recombinação entre a estirpe Massachusetts e a amostra de campo (Estevez *et al.*, 2003).

Nessa pesquisa não foi realizado um estudo fenotípico para as populações de RNA de IBV persistentes e, portanto, necessitam ser melhor investigadas. No entanto, esse achado abre um novo aspecto na epidemiologia do vírus. Na visão atual do processo infeccioso há a percepção de que ocorre uma interação multifatorial e complexa entre o IBV e a galinha (**Figura 13**). Essa interação pode resultar na

manifestação de sinais clínicos, na eliminação da estirpe patogênica, ou mesmo na conversão do indivíduo em portador.

5. CONCLUSÕES

Dentre as hipóteses que foram formuladas para compor esse estudo, baseado na sequência parcial do gene S1, pode-se concluir que:

- A vacina Ma5 pode estabelecer infecção persistente.
- A infecção por amostras de IBV de campo parece evoluir para genoma mais adaptado ao hospedeiro e também estabelecer infecção persistente sem sinais clínicos aparentes.
- Pelo menos em galinhas em final de produção a vacina Ma5 pode ser transmitida verticalmente.

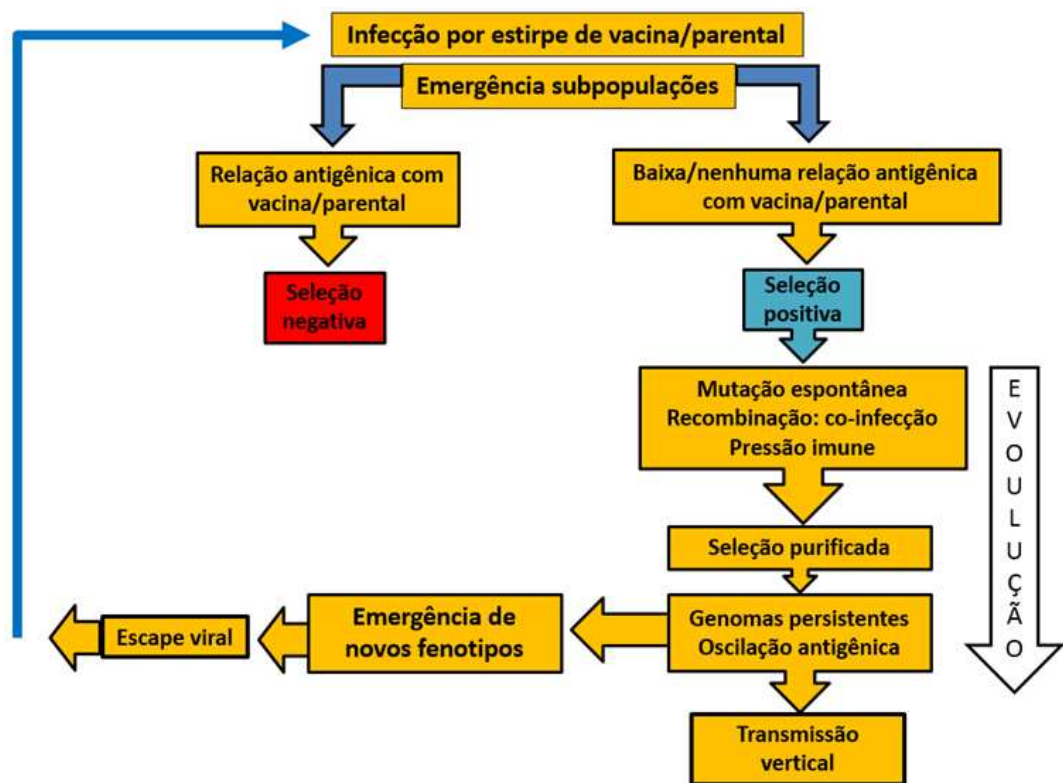


Figura 13: Diagrama esquemático das possíveis vias evolutivas e emergência de novas estirpes de IBV.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 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. **Virology Journal**. v.3, n.1, p.78-86, 2006.
- Abreu, J.T.; Resende, J.S.; Flatschart, R.B.; Folgueras-Flatschart, A.V.; Mendes, A.C.; Martins, N.R.; Silva, C.B.; Ferreira, B.M.; Resende, M. Molecular analysis of brazilian infectious bronchitis field isolates by reverse transcription-polymerase chain reaction, restriction fragment length polymorphism, and partial sequencing of the N Gene. **Avian Diseases**. v.50, n.4, p.494-501, 2006.
- Adair, B. M. Immunopathogenesis of chicken anemia virus infection. **Dev. Comp.Immunol.** v.24, n.2-3, p.247-255, 2000.
- Adami, C.; Pooley, J.; Glomb, J.; Stecker, E.; Fazal, F.; Fleming, J.O.; Baker, S.C. Evolution of mouse hepatitis virus (MHV) during chronic infection: quasispecies nature of the persisting MHV RNA. **Virology**. v.209, p.337-346, 1995.
- Adorini, L.; Appella, E.; Doria, G.; Nagy, Z.A. Mechanisms influencing the immunodominance of T cell determinants. **J Exp Med**. v.168, p.2091-2104, 1988.
- Adzhar, A.; Gough, R.E.; Haydon, D.; Shaw, K.; Britton, P.; Cavanagh, D. Molecular analysis of the 793/B serotype of infectious bronchitis virus in Great Britain. **Avian Pathology**. v.26, n.3, p.625-640, 1997.
- Adzhar, A.; Shaw, K.; Britton, P.; Cavanagh, D. Universal oligonucleotides for the detection of infectious bronchitis virus by the polymerase chain reaction. **Avian Pathology**. v. 25, p. 817-836, 1996.
- Alexander, D.J.; Gough, R.E. Isolation of avian infectious bronchitis virus from experimentally infected chickens. **Res. vet. Sci**. v.23, p.344-347, 1977.
- Alexander, D.J.; Gough, R.E.; Pattison, M. A long-term study of the pathogenesis of infection of fowls with three strains of avian infectious bronchitis vims. **Res. vet. Sci**. v.24, p.228-233, 1978.
- Almeida, D.O.; Tortelly, R.; Nascimento, E.R.; Chagas, M.A.; Khan, M.I.; Pereira, V.L. Avian infectious bronchitis and deep pectoral myopathy - a case control study. **Poultry Science**. v.91, n.12, p.3052-3056, 2012.
- Ammayappan, A.; Upadhyay, C.; Gelb, J.; Vakharia, V.N. Complete genomic sequence analysis of infectious bronchitis virus Ark DPI strain and its evolution by recombination. **Virology Journal**. v.5, p.157, 2008.
- Ammayappan, A.; Upadhyay, C.; Gelb Jr., J.; Vakharia, V.N. Identification of sequence changes responsible for the attenuation of avian infectious bronchitis virus strain Arkansas DPI. **Arch. Virol**. v.154, n.3, p.495-499, 2009.
- Andrade, L.F.; Villegas, P.; Fletcher, O.J.; Laudencia. R. Evaluation of ciliary movement in tracheal rings to assess immunity against infectious bronchitis virus. **Avian Diseases**, v.26, n.4, p.805-815, 1982.
- Armesto, M.; Cavanagh, D.; Britton, P. The replicase gene of avian coronavirus infectious bronchitis virus is a determinant of pathogenicity. **PLoS One**, v.4, n.10, p.1-11, 2009.
- Ballesteros, M.L.; Sánchez, C.M.; Enjuanes, L. Two amino acid changes at the N-terminus of transmissible gastroenteritis coronavirus spike protein result in the loss of enteric tropism. **Virology**, v.227, n.2, p.378-388, 1997.

- Bijlenga, G.; Cook, J.K.A.; Gelb, J.J.; de Wit, J.J. Development and use of the H strain of avian infectious bronchitis virus from the Netherlands as a vaccine: a review. **Avian Pathology**, v.33, n.6, p. 550-557, 2004.
- Boltz, D.A.; Nakai, M.; Bahr, J.M. Avian Infectious Bronchitis Virus: a possible cause of reduced fertility in rooster. **Avian Diseases**, v.48, n.4, p.909-915, 2004.
- Bourret, V.; Croville, G.; Mariette, J.; Klopp, C.; Bouchez, O.; Tiley, L.; Guérin, J-L. Whole-genome, deep pyrosequencing analysis of a duck influenza A virus evolution in swine cells. *Infection*, **Genetics and Evolution**, v.18, p.31-41, 2013.
- Britton, P.; Cavanagh, D. Avian coronavirus diseases and infectious bronchitis vaccine development. *In: Coronaviruses: Molecular and Cellular Biology*. Thiel V., ed. Caister Academic Press, Norfolk, UK, 161-181, 2007.
- Casais, R.; Dove, B.; Cavanagh, D.; Britton, P. Recombinant avian infectious bronchitis virus expressing a heterologous spike gene demonstrates that the spike protein is a determinant of cell tropism. **Journal Virology**, v.77, n.16, p.9084-9089, 2003.
- Cascone, P.J.; Haydar, T.F.; Simon, A.E. Sequences and structures required for recombination between virus-associated RNAs. **Science**, v. 260, p. 801-805, 1993.
- Cavanagh, D. A nomenclature for avian coronavirus isolates and the question of species status. **Avian Pathology**, v. 30, p.109-115, 2001.
- Cavanagh, D.; Casais, R.; Armesto, M.; Hodgson, T.; Izadkhasti, S.; Davies, M.; Lin, F.; Tarpey, I.; Britton, P. Manipulation of the infectious bronchitis coronavirus genome for vaccine development and analysis of the accessory proteins. **Vaccine**, v. 25, n.30, p.5558-5562, 2007.
- Cavanagh, D. Coronavirus avian infectious bronchitis virus. **Vet. Res.**, v.38, n.2, p.281-297, 2007.
- Cavanagh, D. Coronaviruses in poultry and other birds. **Avian Pathology**, v.34, n.6, p.439-448, 2005.
- Cavanagh, D. Coronavirus IBV: structural characterization of the spike protein. **J. Gen. Virol.**, v.64, n.12, p.2577-2583, 1983.
- Cavanagh, D.; Davis, P.J.; Cook, J.K.A.. Infectious bronchitis virus: evidence for recombination within the Massachusetts serotype. **Avian Pathology**, v.21, n.3, 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 Pathology**, v.21, n.1, p.33-43, 1992.
- Cavanagh, D.; Davis, P.J. Coronavirus IBV: removal of spike glycopolyptide S1 by urea abolishes infectivity and haemagglutination but not attachment to cells. **J. Gen. Virol.**, v.67, n.7, p.1443, 1986.
- Cavanagh, D.; Davis, P.J.; Mockett, A.P. Amino acids within hypervariable region 1 of avian coronavirus IBV (Massachusetts serotype) spike glycoprotein are associated with neutralization epitopes. **Virus Res.**, v.11, n. 2, p.141-150, 1998.
- Cavanagh, D.; Gelb, J. Infectious bronchitis. *In: Saif, Y.M.; Fadly, A.M.; Glisson, J.R.; McDougald, L.R.; Nolan, L.K.; Swayne, D.E. Diseases of Poultry*. 12th ed. Ames, IA, Blackwell Publishing, Ames, Iowa. 2008. p.117-135.
- Cavanagh, D.; Mawditt, K.; Adzhar, A.; Gough, R. E.; Picault, J. P.; Naylor, C. J.; Haydon, D.; Shaw, K.; Britton, P. Does IBV change slowly despite the capacity of the spike protein to vary greatly? **Adv. Exp. Med. Biol.**, v.440, p.729-734, 1998.

Cavanagh, D.; Mawditt, K.; Welchman Dde, B.; Britton, P.; Gough, R.E. Coronaviruses from pheasants (*Phasianus colchicus*) are genetically closely related to coronaviruses of domestic fowl (infectious bronchitis virus) and turkeys. **Avian Pathology**. v.31, n.1, p.81–93, 2002.

Cavanagh, D.; Picault, J.P.; Gough, R.E.; Hess, M.; Mawditt, K.L.; Britton, P. Variation in the spike protein of the 793/B type of infectious bronchitis virus, in the field and during alternate passage in chickens and embryonated eggs. **Avian Pathology**, v.34, n.1, p.20-25, 2005.

Cavanagh, D. Severe acute respiratory syndrome vaccine development: experiences of vaccination against avian infectious bronchitis coronavirus. **Avian Pathology**, v.32, n.6, p.567-582, 2003.

Cavanagh, D. The coronavirus surface glycoprotein. In: **The Coronaviridae**. S. G. Siddel, ed. Plenum press, New York. pp 73-103. 1995.

Cavanagh, D. Structural characterization of IBV glycoproteins. **Adv. Exp. Med. Biol.** v.173, p.95-108. 1984.

Cavanagh, D. Structural polypeptides of coronavirus IBV. **J. Gen. Virol.**, v.53, n.1, p.93-103, 1981.

Cavanagh, D. The coronavirus surface glycoprotein. In: **The Coronaviridae**. S. G. Siddel, ed. Plenum press, New York. pp 73-103. 1995.

Chacón, J.L.; Rodrigues, J.N.; Assayag Junior, M.S.; Peloso, C.; Pedroso, A.C; Ferreira, A.J. Epidemiological survey and molecular characterization of avian infectious bronchitis virus in Brazil between 2003 and 2009. **Avian Pathology**. v.40, n.2, p.153-162, 2011.

Chang, C.C.; Yoon, K.J.; Zimmerman, J.J.; Harmon, K M.; Dixon, P.M.; Dvorak, C.M.; Murtaugh, M.P. Evolution of porcine reproductive and respiratory syndrome virus during sequential passages in pigs. **J. Virol.** v.76, p.4750–4763, 2002.

Chong, K.T. & Apostolov, K. The pathogenesis of nephritis in chickens induced by infectious bronchitis virus. **J. comp. Pathol**, 92, 199-211, 1982.

Chu, D.K.; Leung, C.Y.; Gilbert, M.; Joyner, P.H.; Ng, E.M.; Tse, T.M.; Guan, Y.; Peiris, J.S.; Poon, L.L. Avian coronavirus in wild aquatic birds. **J. Virol.**, v. 85, p. 12815-12820, 2011.

Collisson, E.W.; Pei, J.; Dzielawa, J.; Seo, S.H. Cytotoxic T lymphocytes are critical in the control of infectious bronchitis virus in poultry. **Dev. Comp. Immunol.**, v.24, n.2-3, p.187-200, 2000.

Cook, J.K. Duration of experimental infectious bronchitis in chickens. **Res. vet. Sci.**, v.9, p.506-514, 1968.

Cook, J.K.A.; Huggins, M.B. Newly isolated serotypes of infectious bronchitis virus: their role in disease. **Avian Pathology**, v.15, p.129- 138, 1986.

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 Pathology**, v. 28, p.477-85, 1999.

Cook, J.K.A.; Otsuki, K.; Martins, N.R.; Ellis, M.M.; Huggins, M.B. The secretory antibody response of inbred lines of chicken to avian infectious bronchitis virus infection. **Avian Pathology**, v. 21, p. 681-692, 1992.

Cook J.K.A. Recovery of infectious bronchitis virus from eggs and chicks produced by experimentally inoculated hens. **J. comp. Pathol.**, v.81, p.203-211, 1971.

Cook, J.K.A. The classification of new serotypes of infectious bronchitis virus isolated from poultry flocks in Britain between 1981 and 1983. **Avian Pathology**, v.13, p.733-741, 1984.

de Groot, R.J.; Luytjes, W.; Horzinek, M.C.; van der Zeijst, B.A.M.; Spaan, W.J.M.; Lenstra, J.A. Evidence for a coiled-coil structure in the spike proteins of coronaviruses. **J. Molec. Biol.**, v.196, p.963-966, 1987.

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

de Wit, J.J.; Nieuwenhuisen-van Wilgen, J.; Hoogkamer, A.; van de Sande, H.; Zuidam, G.J.; Fabri, T.H. Induction of cystic oviducts and protection against early challenge with infectious bronchitis virus serotype D388 (genotype QX) by maternally derived antibodies and by early vaccination. **Avian Pathology**, v.40, p.463-471, 2011.

Dhinakar Raj, G.; Suresh Kumar, K.; Nainar, A.M.; Nachimuthu, K. Egg: embryo weight ratio as an indicator of dwarfism induced by infections bronchitis virus. **Avian Pathology**. v.33, n.3, p.307-309, 2004.

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 Diseases**, v. 44, n.3, p. 582-589, 2000.

Dlugolenski, D.; Jones, I.; Saavedra, G.; Tompkins, S.M.; Tripp, R.A.; Mundt, E. Passage of low-pathogenic avian influenza (LPAI) viruses mediates rapid genetic adaptation of a wild-bird isolate in poultry. **Arch Virol.**, v.156, p.565-576, 2011.

El-Houadfi, M.; Jones, R.C.; Cook, J.K.A.; Ambali, A.G. The isolation and characterisation of six avian infectious bronchitis viruses isolated in Morocco. **Avian Pathology**, v.15, p.93-105, 1986.

Estevez, C.; Villegas, P.; El-Atrache, J. A recombination event, induced in ovo, between a low passage infectious bronchitis virus field isolate and a highly embryo adapted vaccine strain. **Avian Diseases**, v. 47, n. 4, p. 1282-1290, 2003.

Fang, S.G.; Shen, S.; Tay, F.P.; Liu, D.X. Selection of and recombination between minor variants lead to the adaptation of an avian coronavirus to primate cells. **Biochem. Biophys. Res. Comm.**, v.336, p.417-423, 2005.

Felippe, P.A.N.; Silva, L.H.A.; Santos, M.M.A.B.; Spilki, F.R.; Arns, C.W. Genetic diversity of avian infectious bronchitis virus isolated from domestic chicken flocks and coronaviruses from feral pigeons in Brazil between 2003 and 2009. **Avian Diseases**, v.54, n, 4, p.1191-1196, 2010.

Feng, J.; Hu, Y.; Ma, Z.; Yu, Q.; Zhao, J.; Liu, X.; Zhang, G. Virulent Avian Infectious Bronchitis Virus, People's Republic of China. **Emerging Infectious Diseases**, v.18, n.12, p. 1994- 2001, 2012.

Fleeton, M.N.; Chen, M.; Berglund, P.; Rhodes, G.; Parker, S.E.; Murphy, M.; Atkins, G.J.; Liljestrom, P. Self-replicative RNA vaccines elicit protection against influenza A virus, respiratory syncytial virus, and a tickborne encephalitis virus. **J. Infect. Dis.**, v. 183, p. 1395-1398, 2001.

Fraga, A.P.; Balestrin, E.; Ikuta, N.; Fonseca, A.S.K.; Spilki, F.R.; Canal, C.W.; Lunge, V.R. Emergence of a new genotype of avian infectious bronchitis virus in Brazil. **Avian Diseases**, v.57, n.2, p.225-232, 2013.

Gallagher, T.M.; Buchmeier, M.J. Coronavirus spike proteins in viral entry and pathogenesis. **Virology**, v.279, p.371-374, 2001.

Gallardo, R.A.; Hoerr, F.J.; Berry, W.D.; van Santen, V.L.; Toro, H. Infectious bronchitis virus in testicles and venereal transmission. **Avian Diseases**. v.55, n.2, p.255-258, 2011.

- Gallardo, R.A.; van Santen, V.L.; Toro, H. Effects of chicken anemia virus and infectious bursal disease virus-induced immunodeficiency on infectious bronchitis virus replication and phenotypic drift. **Avian Pathology**. v.41, n.5, p.541-458, 2012.
- Gallardo, R.A.; Van Santen, V.L.; Toro, H. Host intraspatial selection of infectious bronchitis virus populations. **Avian Diseases**. v.54, n.2, p.807-813, 2010.
- Gandon, S.; Day, T. Evidences of parasite evolution after vaccination. **Vaccine**, v.26, (Suppl. 3), p.4-7, 2008.
- Gandon, S.; Mackinnon, M.J.; Nee, S.; Read, A.F. Imperfect vaccines and the evolution of pathogen virulence. **Nature**, v. 414, p.751-756, 2001.
- Gavrilin, G.V.; Cherkasova, E.A.; Lipskaya, G.Y.; Kew, O.M.; Agol, V.I. Evolution of circulating wild poliovirus and of vaccine-derived poliovirus in an immunodeficient patient: a unifying model. **J. Virol.**, v.74, p.7381-7390, 2000.
- Geall, A.J.; Verma, A.; Otten, G.R.; Shaw, C.A.; Hekele, A.; Banerjee, K. *et al.* Nonviral delivery of self-amplifying RNA vaccines. *Proc Natl Acad Sci USA*, v. 109, p. 14604-14609, 2012.
- Gelb, J.Jr.; Jackwood, M.W. 2008. Infectious bronchitis. In: **A laboratory manual for the isolation, identification, and characterization of avian pathogens**, 5th ed. Dufour-Zavala, L.; Swayne, D.E.; Glisson, J.R.; Jackwood, M.W.; Pearson, J.E.; Reed, W.M.; Woolcock, P. eds. American Association of Avian Pathologists, Athens, GA. p. 146–149. 2008.
- Gelb, J.Jr.; Keeler Jr, C.L.; Nix, W.A.; Rosenberger, J.K.; Cloud, S.S. Antigenic and S-1 genomic characterization of the Delaware variant serotype of infectious bronchitis virus. **Avian Diseases**., v.41, p.661-669, 1997.
- Gelb, Jr.J.; Wolff, J.B.; Moran, C.A. Variant serotypes of infectious bronchitis virus isolated from commercial layer and broiler chickens. **Avian Diseases**. v.5, n.1, p.82-87, 1991.
- Ghorashi, S.A.; O'Rourke, D.; Ignjatovic, J.; Noormohammadi, A.H. Differentiation of infectious bursal disease virus strains using real-time RT-PCR and high resolution melt curve analysis. **J. Virol. Methods**. v.171, n.1, p.264-271, 2011.
- Gough, R.E.; Cox, W.J.; Winkler, C.E.; Sharp, M.W.; Spackman, D. Isolation and identification of infectious bronchitis virus from pheasants. **Vet. Rec.**, v. 138, p. 208-209, 1996.
- Guo, K.; Dormitorio, T.; Ou, S-C; Giambrone, J. Detection and differentiation of avian reoviruses using SYBR-Green I-based two-step Real-Time Reverse Transcription PCR with Melting Curve Analysis. **Avian diseases**, v.56, n.2, p. 369-376, 2012.
- Guy, J.S. Turkey coronavirus is more closely related to avian infectious bronchitis virus than to mammalian coronaviruses: a review. **Avian Patholog.**, v. 29, p. 207-212, 2000.
- Grenfell, B. T.; Pybus, O.G.; Gog, J.R.; Wood, J.L.; Daly, J.M.; Mumford, J.A.; Holmes, E.C. Unifying the epidemiological and evolutionary dynamics of pathogens. **Science**, v.303, p.327-332, 2004.
- Hewson, K.A.; Browning, G.F., Devlin, J.M.; Ignjatovic, J.; Noormohammadi, A.H. Application of high-resolution melt curve analysis for classification of infectious bronchitis viruses in field specimens. **Aust. Vet. J.** v.88, n.10, p. 408-413, 2010.
- Hewson, K.A.; Ignjatovic, J.; Browning, G.F.; Devlin, J.M.; Noormohammadi, A.H. Infectious bronchitis virus with naturally occurring genomic rearrangement and gene detection. **Arch Virol.**, v. 156, n. 2, p. 245-252, 2011.

Hewson, K.A.; Scott, P.C.; Devlin, J.M.; Ignjatovic, J.; Noormohammadia, A.H. The presence of viral subpopulations in an infectious bronchitis virus vaccine with differing pathogenicity – A preliminary study. **Vaccine**, v.30, p.4190- 4199, 2010.

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

Hodgson, T.; Casais, R.; Dove, B.; Britton, P.; Cavanagh, D. Recombinant infectious bronchitis coronavirus Beaudette with the spike protein gene of the pathogenic M41 strain remains attenuated but induces protective immunity. **Journal of Virology**, v.78, p.13804-13811, 2004.

Hoerr, F.J. Clinical aspects of immunosuppression in poultry. *Avian Dis.*, v.54, p.2-15, 2010.

Hong, S.M.; Kwon, H.J.; Kim, I.H.; Mo, M.L.; Kim, J.H. Comparative genomics of Korean infectious bronchitis viruses (IBVs) and an animal model to evaluate pathogenicity of IBVs to the reproductive organs. **Viruses**, v.4, p.2670-2683, 2012.

Hopkins, S.R.; Yoder Jr, H.W. Increased incidence of airsacculitis in broilers infected with *Mycoplasma synoviae* and chicken-passaged infectious bronchitis vaccine virus. **Avian Diseases**, v.28, p.386-396, 1984.

Huang, Y.P.; Wang, C.H. Sequence changes of infectious bronchitis virus isolates in the 3.7.3 kb of the genome after attenuating passage in embryonated eggs. **Avian Pathology**, v.36, p.59-67, 2007.

Hughes, L.A.; Savage, C.; Naylor, C.; Bennett, M.; Chantrey, J.; Jones, R. Genetically diverse coronaviruses in wild bird populations of northern England. **Emerg. Infect. Dis.** v.15, p.1091-1094, 2009.

Ignjatovic J., Galli L., The S1 glycoprotein but not the N or M proteins of avian infectious bronchitis virus induces protection in vaccinated chickens. **Arch. Virol.**, v.138, p.117-134, 1994.

Ignjatovic, J.; Sapats, S. Avian infectious bronchitis vírus. **Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.**, v.19, n.2, p.493-508, 2000.

Ingrao, F.; Rauw, F.; Lambrecht, B.; van den Berg, T. Infectious Bursal Disease: a complex host-pathogen interaction. **Dev Comp Immunol.**, v.41, n.3, p.429-438, 2013.

INTERNATIONAL Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV). VIRUS taxonomy Disponível em: <http://www.ictvonline.org/index.asp?bhcp=1>. Acesso em: 09/11/2015.

Ito, N. K.; Miyaji, C.; Okabayashi, S. Controle de variantes do vírus da bronquite infecciosa das galinhas In: CONFERENCIA APINCO DE CIENCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLAS, 1., Santos, 2006. Anais. Santos:, Fundação APINCO de Ciência e Tecnologia Avícolas, 2006. p.75-99.

Jackwood, D.J.; Sommer, S.E. Identification of infectious bursal disease virus quasispecies in commercial vaccines and field isolates of this double-stranded RNA virus. **Virology**, n.304, p.105-113, 2002.

Jackwood, M.W.; Boynton, T.O.; Hilt, D.A.; McKinley, E.T.; Kissinger, J.C.; Paterson, A.H.; Robertson, J.; Lemke, C.; McCall, A.W.; Williams, S.M.; Jackwood, J.W.; Byrd, L.A. Emergence of a group 3 coronavirus through recombination. **Virology**, v.398, p.98-108. 2010.

Jackwood, M.W.; Hilt, D.A.; Callison, S.A. Detection of infectious bronchitis virus by real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction and identification of a quasispecies in the Beaudette strain. **Avian Diseases**. v.47, n.3, p.718-724, 2003.

Jackwood, M.J. Review of infectious bronchitis virus around the world. **Avian Diseases**, v.56, n.4, p.634-641, 2012.

- Jackwood, M.W.; Yousef, N.M.; Hilt, D.A. Further development and use of a molecular serotype identification test for infectious bronchitis virus. **Avian Diseases**. v.41, n.1, p.105-110, 1997.
- Jarvis, T.C.; Kirkegaard, K. Poliovirus RNA recombination: mechanistic studies in absence of selection. **EMBO J.** 11:3135–3145, 1992.
- Ji, J.; Loeb, L.A. Fidelity of HIV-1 reverse transcriptase copying RNA in vitro. **Biochemistry**, v.31, n.4, p.954-958, 1992.
- 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. **Arch. Virol.** v.140, n.2, p.259-271. 1995.
- Jonassen, C.M.; Kofstad, T.; Larsen, I.L.; Lovland, A.; Handeland, K.; Follestad, A.; Lillehaug, A. Molecular identification and characterization of novel coronaviruses infecting graylag geese (*Anser anser*), feral pigeons (*Columba livia*) and mallards (*Anas platyrhynchos*). **J. Gen. Virol.** v.86, p.1597-1607, 2005.
- Jones, R.C.; Ambali, A.G. Re-excretion of an enterotropic infectious bronchitis virus by hens at point of lay after experimental infection at day old. **Vet. Rec.**, v.120, p.617-618, 1987.
- Judo, M.S.; Wedel, A.B.; Wilson, C. Stimulation and suppression of PCR-mediated recombination. **Nucleic Acids Res.**, v.26, n.7, p.1819-1825, 1998.
- Kalhor, N.H.; Veits, J.; Rautenschlein, S.; Zimmer, G. A recombinant vesicular stomatitis virus replicon vaccine protects chickens from highly pathogenic avian influenza virus (H7N1). **Vaccine**, v. 27, p. 1174-1183, 2009.
- Kant, A.; Koch, G.; van Roozelaar, D.J.; Kusters, 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 glycopolyptide. **Journal of General Virology**, v.73, n.3, p.591-596, 1992.
- Keeler, C.L.Jr.; Reed, K.L.; Nix, W.A.; Gelb, J.Jr. Serotype Identification of Avian Infectious Bronchitis Virus by RT-PCR of the Peplomer (S-1) gene. **Avian Diseases**, v. 42, n. 2, p. 275-284, 1998.
- Keck, J.G.; Matsushima, G.K.; Makino, S.; Fleming, J.O.; Vannier, D.M.; Stohlman, S.A.; Lai, M.M.C. In vivo RNA-RNA recombination of coronavirus in mouse brain. **J. Virol.**, v. 62, p. 1810-1813, 1988.
- 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. Gen. Virol.**, v.71, p.1929, 1990a.
- Koch, G.; Kant, A. Binding of antibodies that strongly neutralize infectious bronchitis virus is dependent on the glycosylation of the viral peplomer protein. **Adv. Exp. Med. Biol.**, v.276, p.143-150, 1990b.
- Kong, L.L.; Omar, A.R.; Hair Bejo, M.; Ideris, A. Tan, S.W. Development of SYBR green I based one-step real-time RT-PCR assay for the detection and differentiation of very virulent and classical strains of infectious bursal disease virus. **J. Virol. Methods**. v.161, n.2, p.271-279, 2009.
- Kottier, S.A.; Cavanagh, D; Britton, P. First experimental evidence of recombination in infectious bronchitis virus. **Adv. Exp. Med. Biol.**, v. 380, p.551-556, 1995.
- Kusters, J.G.; Jager, E.J.; Niesters, H.G.; van der Zeijst, B.A. Sequence evidence for RNA recombination in field isolates of avian coronavirus infectious bronchitis virus. **Vaccine**, v. 8, p.605-608, 1990.

- Kusters, J.G.; Jager, E.; Lenstra, J.A.; Koch, G.; Posthumus, W.P.; Meeuwen, R. H.; van der Zeijst, B. A. Analysis of an immunodominant region of infectious bronchitis virus. **J. Immunol.**, v.143, p.2692, 1989.
- Kusters, J.G., Niesters, H.G.M.; Bleumink-Pluym, N.; Davelaar, F.G.; Horzinek, M.C.; van der Zeijst, B.A.M. Molecular epidemiology of infectious bronchitis virus in the Netherlands. **J. Gen. Virol.**, v.68, p.343, 1987.
- Kusters, J.G.; Niesters, H.G.M.; Lenstra, J.A.; Horzinek, M.C.; van der Zeijst, B.A.M. Phylogeny of antigenic variants of avian coronavirus IBV. **Virology**, v.169, 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 Diseases**, v.37, n.1, p.194–202, 1993.
- Lai, M.M.C.; Cavanagh, D. The molecular biology of coronaviruses. **Adv Virus Res.** v.48, p.1-100, 1997.
- Lai, M.M.C. RNA recombination in animal and plant viruses. **Microbiol. Rev.**, v.56, p. 61-79, 1992.
- Lai, M.M.C.; Holmes, K.V. Coronaviridae: the viruses and their replication. In: Knipe, D.M.; Howley, P.M.; Griffin, D.E.; Lamb, R.A.; Martin, M.A.; Roizman, B. *et al.*, editors. *Fields virology*. 4th ed. Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins; 2001. p.1163-85.
- Landman, B.S.; Loupos, A.B.; Gelb Jr, J. Infectious bronchitis virus S1 gene sequence comparison is a better predictor of challenge of immunity in chickens than serotyping by virus neutralization. **Avian Pathology**, v.35, n.2, p.127-133, 2006.
- Lee, C.W.; Hilt, D.A.; Jackwood, M.W. Redesign of primer and application of the reverse transcriptase-polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism test to the DE072 strain of infectious bronchitis virus. **Avian Diseases**, v.44, n.3, p.650-654, 2000.
- Lee, C.W.; Jackwood, M.W. Evidence of genetic diversity generated by recombination among avian coronavirus IBV. **Arch Virol.**, v. 145, n. 10, p. 2135-2148, 2000.
- Lee, C.W.; Jackwood, M.W. Origin and evolution of Georgia 98 (GA98), a new serotype of avian infectious bronchitis virus. **Virus Res.** v.80, n.1-2, p.33-39, 2001.
- Lin J-H, Tseng C-P, Chen Y-J, Lin C-Y, Chang S-S, Wu H-S, Cheng J-C. Rapid differentiation of influenza A virus subtypes and genetic screening for virus variants by high-resolution melting analysis. **J Clin Microbiol.** v.46, n.3, p.1090-1097, 2008.
- 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.** v.86, p.719-725, 2005.
- Liu, S.; Zhang, X.; Gong, L.; Yan, B.; Li, C.; Han, Z.; Shao, Y.; Li, H.; Kong, X. Altered pathogenicity, immunogenicity, tissue tropism and 3'-7 kb region sequence of an avian infectious bronchitis coronavirus strain after serial passage in embryos. **Vaccine**, v.27, n.34, p.4630-4640, 2009.
- Liu, S.W.; Zhang, Q.X.; Chen, J.D.; Han, Z.X.; Liu, X.; Feng, L.; Shao, Y.H.; Rong, J.G.; Kong, X.G.; Tong, G.Z. Genetic diversity of avian infectious bronchitis coronavirus strains isolated in China between 1995 and 2004. **Arch. Virol.**, v.151, p.1133-1148, 2006.
- Liu, X.; Shao, Y.; Ma, H.; Sun, C.; Zhang, X.; Li, C.; Han, Z.; Yan, B.; Kong, X.; Liu, S. Comparative analysis of four Massachusetts type infectious bronchitis coronavirus genomes

reveals a novel Massachusetts type strain and evidence of natural recombination in the genome. **Infection, Genetics and Evolution**, v.14, p.29-38, 2013.

Li, W.; Zhang, C.; Sui, J.; Kuhn, J.H.; Moore, M.J.; Luo, S.; Wong, S.K.; Huang, I.C.; Xu, K.; Vasilieva, N.; Murakami, A.; He, Y.; Marasco, W.A.; Guan, Y.; Choe, H.; Farzan, M. Receptor and viral determinants of SARS-coronavirus adaptation to human ACE2. **EMBO J.**, v.24, p.1634-1643, 2005.

Li, Y.; Ball, L.A. Nonhomologous RNA recombination during negative-strand synthesis of flock house virus RNA. **J. Virol.**, v. 67, p. 3854-3860, 1993.

Lundberg, K.S.; Shoemaker, D.D.; Adams, M.W.W.; Short, J.M.; Serge, J.A.; Mathur, E.J. High-fidelity amplification using a thermostable DNA polymerase isolated from *Pyrococcus furiosus*. **Gene**, v. 108, p.1-6, 1991.

Luo, Z; Weiss, S.R. Roles in cell-to-cell fusion of two conserved hydrophobic regions in the murine coronavirus spike protein. **Virology**, v.244, n.2, p.483-94, 1998.

Mahgoub, H.A.; Bailey, M.; Kaiser, P. An overview of infectious bursal disease. **Arch Virol.**, v.157, n.11, p.2047-2057, 2012.

Mardani, K.; Browning, G.F.; Ignjatovic, J.; Noormohammadi, A.H. Rapid differentiation of current infectious bronchitis virus vaccine strains and field isolates in Australia. **Australian Veterinary Journal**, v.84, n.1-2, p.59-62, 2006.

Mardani, K.; Noormohammadi, A.H.; Hooper, P.; Ignjatovic, J.; Browning, G.F. Infectious bronchitis viruses with a novel genomic organization. **Journal of Virology**, v.82, n.4, p.2013-2024, 2008.

Mardani, K.; Noormohammadi, A.H.; Ignjatovic, J.; Browning, G.F. Naturally occurring recombination between distant strains of infectious bronchitis virus. **Arch Virol**, v. 155, n. 10, p. 1581-1586, 2010.

Matthijs, M.G.; Ariaans, M.P.; Dwars, R.M.; van Eck, J.H.; Bouma, A.; Stegeman, A.; Vervelde, L. Course of infection and immune responses in the respiratory tract of IBV infected broilers after superinfection with *E. coli*. **Vet Immunol Immunopathol**, v.127, n.1-2, p.77-84, 2009.

Mathijs, M.G.; van Eck, J.H.; Landman, W.J.; Stegeman, J.A. Ability of Massachusetts-type infectious bronchitis virus to increase colibacillosis susceptibility in commercial broilers: a comparison between vaccine and virulent field virus. **Avian Pathology**, v.32, n.5, p. 473-481, 2003.

Maurel, S.; Toquin, D.; Briand, F.X.; Queguiner, M.; Allee, C.; Bertin, J.; Ravillion, L.; Retaux, C.; Turblin, V.; Morvan, H.; Etteradossi, N. First full-length sequences of the S gene of European isolates reveal further diversity among turkey coronaviruses. **Avian Pathology**, v. 40, p. 179-189, 2011.

Mayr, E. *Toward a new philosophy of biology*, Harvard University Press, Cambridge, MA. 1988.

Meir, R.; Rosenblut, E.; Perls, S.; Kass, N.; Ayali, G.; Perk, S.; Hemsani, E. Identification of a novel nephropathogenic infectious bronchitis virus in Israel. **Avian Diseases**, v.48, n.3, p.635-641, 2004.

McFerran J.B., Cahill H.T., Young J.A. & Wright C.L. Isolation of infectious bronchitis virus from newborn chicks and dead-in-shell embryos. **Vet. Rec.**, v.89, n.21, p.560-561, 1971.

McKinley, E.T.; Hilt, D.A.; Jackwood, M.W. Avian coronavirus infectious bronchitis attenuated live vaccine undergo selection of subpopulations and mutations following vaccination. **Vaccine**, n.26, n.10, p.1274-1284, 2008.

McKinley, E.T.; Jackwood, M.W.; Hilt, D.A.; Kissinger, J.C.; Robertson, J.S.; Lemke, C.; Paterson, A.H. Attenuated live vaccine usage affects accurate measures of virus diversity and mutation rates in avian coronavirus infectious bronchitis virus. **Virus Res.** v.158, n.1-2, p.225-234, 2011.

McMinn, P.; Carrello, A.; Cole, C.; Baker, D.; Hampson, A. Antigenic drift of influenza A (H3N2) virus in a persistently infected immunocompromised host is similar to that occurring in the community. **Clin. Infect. Dis.**, v.29, p.456-458, 1999.

Mockett, A.P.; Cavanagh, D.; Brown, T.D. Monoclonal antibodies to the S1 spike and membrane proteins of avian infectious bronchitis coronavirus strain Massachusetts M41. **J. Gen. Virol.**, v.65, p.2281-2286, 1984.

Mo, M., Huang, B., Wei, P., Wei, T., Chen, Q., Wang, X., Li, M. & Fan, W. Complete genome sequences of two chinese virulent avian coronavirus infectious bronchitis virus variants. **J Virol.** v.86, n.19, p.10903-10904, 2012.

Mondal, S.P.; Cardona, C.J. Comparison of four regions in the replicase gene of heterologous infectious bronchitis virus strains. **Virology**, v.324, p.238-248, 2004.

Mondal, S.P.; Naqi, S.A. Maternal antibody to infectious bronchitis virus: its role in protection against infection and development of active immunity to vaccine. **Vet Immunol Immunopathol.**, v.79, p.31-40, 2001.

Montassier, M.F.S.; Brentano, L.; Richtzenhain, L.J.; Montassier, H.J. Genetic diversity on s1 glycoprotein of avian infectious bronchitis virus strains isolated in Brazil between 1988-2000. In: **International Symposium on avian coronavirus**, 5. Germany, 2006, Anais. Germany, 2006. p. 119-131.

Montassier, M.F.S.; Brentano, L.; Montassier, H.J.; Richtzenhain, L.J. Genetic grouping of avian infectious bronchitis virus isolated Brazil based on RT-PCR/RFLP analysis of the S1 gene. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.28, n.3, p.191-194, 2008.

Mork, A.K.; Hesse, M.; Abd El Rahman, S.; Herrler, G.; Winter, C. Differences in the tissue tropism to chicken oviduct epithelial cells between avian coronavirus IBV strains QX and B1648 are not related to the sialic acid binding properties of their spike proteins. **Vet Res.**, v.14, p.45-67, 2014.

Muradrasoli, S.; Mohamed, N.; Hornyak, A.; Fohlman, J.; Olsen, B.; Belak, S.; Blomberg, J. Broadly targeted multiprobe QPCR for detection of coronaviruses: coronavirus is common among mallard ducks (*Anas platyrhynchos*). **J. Virol. Methods.** v.159, p.277-287, 2009.

Muthannan A. Ramakrishnan, M.A.; Jin Tu, Z.; Singh, S.; Chockalingam, A.K.; Gramer, M.R.; Wang, P.; Goyal, S.M.; Yang, M.; Halvorson, D.A.; Sreevatsan, S. The feasibility of using high resolution genome sequencing of influenza A viruses to detect mixed infections and quasispecies. **Plos ONE.** v.4, n.9, e7105, 2009.

Naqi, S.; Gay, K.; Patalla, P.; Mondal, S.; Liu, R. Establishment of persistent avian infectious bronchitis virus infection in antibody-free and antibody-positive chickens. **Avian Diseases**, v.47, n.3, p.594-601, 2003.

Ndegwa, E.N.; Joiner, K.S.; Toro, H.; van Ginkel, F.W.; van Santen, V.L. The proportion of specific viral subpopulations in attenuated Arkansas Delmarva poultry industry infectious bronchitis vaccines influences vaccination outcome. **Avian Diseases.** v.56, n.4, p.642-653, 2012.

Ndegwa, E.N.; Toro, H.; van Santen, V.L. Comparison of vaccine subpopulation selection, viral loads, vaccine virus persistence in trachea and cloaca, and mucosal antibody responses after vaccination with two different Arkansas Delmarva poultry industry-derived infectious bronchitis virus Vaccines. **Avian Diseases.** v.58, n.1, p.102-110, 2014.

Nidzworski, D.; Rabalski, L.; Gromadzka, B. Detection and differentiation of virulent and avirulent strains of Newcastle disease virus by real-time PCR. **J. Virol. Methods**. v.173, n.1, p.144-149, 2011.

Nix, W.A.; Troeber, D.S.; Kingham, B.F.; Keeler, C.L.Jr; Gelb, J.Jr. Emergence of subtype strains of the Arkansas serotype of infectious bronchitis virus in Delmarva broiler chickens. **Avian Diseases**, v.44, n.3, p.568-581, 2000.

Nowak, M.A.; May, R.M.; Phillips, R.E.; Rowland-Jones, S.; Lailoo, D.G.; McAdam, S.; Klenerman, P.; Koppe, B.; Sigmund, K.; Banghham, C.R.M.; McMichael, A.J. Antigenic oscillations and shifting immunodominance in HIV-1 infections. **Nature**, v.375, p. 606-611, 1995.

Orr-Burks, N.; Gulley, S.L.; Gallardo, R.A.; Toro, H.; van Ginkel, F.W. Immunoglobulin A as an early humoral responder after mucosal Avian Coronavirus vaccination. **Avian Diseases**, v. 58, n. 2, p. 279-286, 2014.

OIE - Organização Mundial da Saúde Animal. Avian Infectious Bronchitis, Version adopted by the World Assembly of Delegates of the OIE in May 2013. Chapter 2.3.2. Disponível em: <http://www.oie.int/fileadmin/Home/fr/Health_standards/tahm/2.03.02_AIB.pdf> visitado em: 15/04/2014.

Pessoa, M.G.; Bzowej, N.; Berenguer, M.; Phung, Y.; Kim, M.; Ferrell, L.; Hassoba, H.; Wright, T.L. Evolution of hepatitis C virus quasispecies in patients with severe cholestatic hepatitis after liver transplantation. **Hepatology**, v.30, p.513-1520, 1999.

Petsch, B, Schnee, M, Vogel, AB, Lange, E, Hoffmann, B, Voss, D *et al*. Protective efficacy of in vitro synthesized, specific mRNA vaccines against influenza A virus infection. **Nat Biotechnol.**, v. 30, p. 1210-1216, 2012.

Pham, H.M.; Konnai, S.; Chang, K.S.; Mase, M.; Ohashi, K.; Onuma, M. Rapid detection and differentiation of Newcastle disease virus by real-time PCR with melting-curve analysis. **Arch. Virol.** v.150, n.12, p.2429-2438, 2005.

Phillips, J.E.; Jackwood, M.W.; McKinley, E.T.; Thor, S.W.; Hilt, D.A.; Acevedol, N.D.; Williams, S.M.; Kissinger, J.C.; Paterson, A.H.; Robertson, J.S.; Lemke, C. Changes in nonstructural protein 3 are associated with attenuation in avian coronavirus infectious bronchitis virus. **Virus Genes**, v.44, n.1, p.63-74, 2012.

Phillips, J.J.; Chua, M.M.; Rall, G.F.; Weiss, S.R. Murine coronavirus spike glycoprotein mediates degree of viral spread, inflammation, and virus-induced immunopathology in the central nervous system. **Virology**, v.301, p. 109-120, 2002.

Pijlman, G.P.; Suhrbier, A.; Khromykh, A.A. Kunjin virus replicons: an RNA-based, noncytopathic viral vector system for protein production, vaccine and gene therapy applications. **Expert Opin. Biol. Ther.**, v. 6, p. 135-145, 2006.

Probst, J.; Weide, B.; Scheel, B.; Pichler, B.J.; Hoerr, I.; Rammensee, H.G. Spontaneous cellular uptake of exogenous messenger RNA in vivo is nucleic acidspecific, saturable and ion dependent. **Gene Therapy**, v.14, n. 15, p. 1175-80, 2007.

Raggi, L.G.; Lee, G.G. Lack of correlation between infectivity, serologic response and challenge results in immunization with an avian infectious bronchitis vaccine. **J. Immunol.** v.94, p.538, 1965.

Raj, G.D.; Jones, R.C. Infectious bronchitis virus: immunopathogenesis of infection in the chicken. **Avian Pathology**, v 26, p.677-706, 1997.

- Rasschaert, D.; Laude, H. The predicted primary structure of the peplomer protein E2 of the porcine coronavirus transmissible gastroenteritis virus. **J. Gen. Virol.**, v.68, p.1883, 1987.
- Reed, G.H.; Kent, J.O.; Wittwer, C.T. High-resolution DNA melting analysis for simple and efficient molecular diagnostics. **Pharmacogenomics**, v.8, n.6, p.597-608, 2007.
- Reed, G.H.; Wittwer, C.T. Sensitivity and specificity of single-nucleotide polymorphism scanning by high-resolution melting analysis. **Clin Chem**, v.50, n.10, p.1748–1754, 2004.
- Renz, K.G.; Cheetham, B.F.; Walkden-Brown, S.W. Differentiation between pathogenic serotype 1 isolates of Marek's disease virus and the Rispens CVI988 vaccine in Australia using real-time PCR and high resolution melt curve analysis. **J. Virol. Methods**, v.187, n.1, p.144-152, 2013.
- Rocha, E.; Cox, N.J.; Black, R.A.; Harmon, M.W.; Harrison, C.J.; Kendal, A.P. Antigenic and genetic variation in influenza A (H1N1) virus isolates recovered from a persistently infected immunodeficient child. **Journal Virology**, v.65, n.5, p.2340-2350, 1991.
- Rowe, C.L., Baker, S.C.; Nathan, M.J.; Fleming, J.O. Evolution of mouse hepatitis virus: detection and characterization of spike deletion variants during persistent infection. **Journal Virology**, v. 71, n. 4, p. 2959-2969, 1997.
- 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. Virology**. v.77, n.3, p.413-418, 1996.
- Schaeffer, E.B.; Sette, A.; Johnson, D.L.; Bekoff, M.C.; Smiths, J.A.; Grey, H.H.; Søren Buus. Relative contribution of "determinant selection" and "holes in the repertoire" to T-cell responses. **Proc Natl Acad Sci USA.**, v. 86, n. 12, p. 4649-4653, 1989.
- Schmidt, I.; Skinner, M.; Siddell, S. Nucleotide sequence of the gene encoding the surface projection glycoprotein of coronavirus MHV-JHM. **J. Gen. Virol.**, v.68, n.1, p.47-56, 1987.
- 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**, v.189, p.792-794, 1992.
- Seo, H.S.; Collisson, E.W. Specific cytotoxic T lymphocytes are involved in in vivo clearance of infectious bronchitis virus. **Journal of Virology**, v.71, n.7, p.5173-5177, 1997.
- Seo, S.H.; Pei, J.; Briles, W.E.; Dzielawa, J.; Collisson, E.W. Adoptive transfer of infectious bronchitis virus primed alphabeta T cells bearing CD8 antigen protects chicks from acute infection. **Virology**, v.269, p.183-189, 2000.
- Seo, S.H.; Wang, L.; Smith, R.; Collisson, E.W. The carboxylterminal 120-residue polypeptide of infectious bronchitis virus nucleocapsid induces cytotoxic T lymphocytes and protects chickens from acute infection. **Journal of Virology**, v. 71, p. 7889-7894, 1997.
- Singh, S.D.; barathidasan, R.; Kumar, A.; Deb, R.; Verma, A.K.; Dhama, K. Recent trends in diagnosis and control of Marek's disease (MD) in poultry. **Pak J Biol Sci**, v.15, n.20, p.964-970, 2012.
- Smyth, R.P.; Schlub, T.E.; Grimm, A.; Venturi, V.; Chopra, A.; Mallal, S.; Davenport, M.P.; Mak, J. Reducing chimera formation during PCR amplification to ensure accurate genotyping. **Gene**, v.469, n.1-2, p.45-51, 2010.
- Sperry, S. M., L. Kazi, R. L. Graham, R. S. Baric, S. R. Weiss; M. R. Denison. Single-amino-acid substitutions in open reading frame (ORF) 1b-nsp14 and ORF 2a proteins of the coronavirus mouse hepatitis virus are attenuating in mice. **J. Virol.**, v.79, n.3391-3400, 2005.

Sun, L.; Zhang, G.H.; Jiang, J.W.; Fu, J.D.; Ren, T.; Cao, W.S.; Xin, C.A.; Liao, M.; Liu, W.J. A Massachusetts prototype like coronavirus isolated from wild peafowls is pathogenic to chickens. **Virus Res.**, v. 130, p. 121-128, 2007.

Sylte, M.J.; Hubby, B.; Suarez, D.L. Influenza neuraminidase antibodies provide partial protection for chickens against high pathogenic avian influenza infection. **Vaccine**, v. 25, p. 3763-3772, 2007.

Thor, S.W.; Hilt, D.A.; Kissinger, J.C.; Paterson, A.H.; Jackwood, M.W. Recombination in Avian Gamma-Coronavirus Infectious Bronchitis Virus. **Viruses**, v.3, n.9, p.1777-1799, 2011.

Toro, H.; Fernandez, I. Avian infectious bronchitis: specific lachrymal IgA level and resistance against challenge. **J. Vet. Med.** v. 41, p. 467-472, 1994.

Toro, H., Godoy, V.; Larenas, J.; Reyes, E.; Kaleta, E.F. Avian infectious bronchitis: viral persistence in the Harderian gland and histological changes after eyedrop vaccination. **Avian Diseases**, v. 40, p.114-120, 1996.

Toro, H.; Pennington, D.; Gallardo, R.A.; van Santen, V.L.; van Ginkel, F.W.; Zhang, J.F.; Joiner, K.S. Infectious bronchitis virus subpopulations in vaccinated chickens after challenge. **Avian Diseases**, v.56, p.501-508, 2012.

Toro, H.; van Santen, V.L.; Jackwood, M.W. Genetic diversity and selection regulates evolution of infectious bronchitis Virus. **Avian Diseases**, v.56, n.3, p.449-455, 2012.

Toro, H.; van Santen, V.L.; Li, L.; Lockaby, S.B.; van Santen, E.; Hoerr, F.J. Epidemiological and experimental evidence for immunodeficiency affecting avian infectious bronchitis. **Avian Pathology**, v.35, n.6, p.455-464, 2006.

Torres, C.A.; Villarreal, L.Y.; Ayres, G.R.; Richtzenhain, L.J.; Brandão, P.E.; 2013. Avian coronavirus in quail with respiratory and reproductive signs. **Avian Diseases**, v. 57, p. 295-299, 2013.

van Ginkel, F.W.; Padgett, J.; Martinez-Romero, G.; Miller, M.S.; Joiner, K. S.; Gulley, S. L. Age-dependent immune responses and immune protection after avian coronavirus vaccination. **Vaccine**, v. 33, n.23, p. 2655-2661, 2015.

van Santen, V. L.; Toro, H.. Rapid selection in chickens of subpopulations within ArkDPI-derived infectious bronchitis virus vaccines. **Avian Pathology**, v.37, n.3, p.293-306, 2008.

Vignuzzi, M.; Gerbaud, S.; van der Werf, S.; Escriou, N. Naked RNA immunization with replicons derived from poliovirus and Semliki Forest virus genomes for the generation of a cytotoxic T cell response against the influenza A virus nucleoprotein. **J. Gen. Virol.**, v. 82, p. 1737-1747, 2001.

Villarreal, L.Y.B.; Brandão, P.E.; Chacón, J.L.; Assayag, M.S.; Maiorka, P.C.; Raffi, P.; Saldenberg, 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 Diseases**, v. 51, p.900-904, 2007a.

Villarreal, L.Y.; Brandão, P.E.; Chacón, J.L.; Saldenberg, A.B.; Assayag, M.S.; Jones, R.C.; Ferreira, A.J. Molecular characterization of infectious bronchitis virus strains isolated from the enteric contents of Brazilian laying hens and broilers. **Avian Diseases** v.51, n.4, p.974-978, 2007b.

Villarreal L.Y.B.; Knobl, T.; Sandri, T.L.; Cappellele, C.P.; Richtzenhain, L.; Brandão, P.E. Natural vertical transmission of infectious bronchitis virus in ostrich. Proceedings of Conferência Apinco de Ciência e Tecnologia avícolas; 2008; Santos, São Paulo. Brasil. Campinas:FACTA; 2008. p. 238.

Villarreal, L.Y.; Sandri, T.L.; Sousa, S.P.; Richtzenhain, L.J.; de Witt, J.J.; Brandão, P.E. Molecular epidemiology of avian infectious bronchitis in Brazil from 2007 to 2008 in breeders, broilers, and layers. **Avian Diseases**, v.54, n.2, p.894-898, 2010.

Zhang, X.; Wu, Y.; Huang, Y.; Liu, X. Protection conferred by a recombinant Marek's disease virus that expresses the spike protein from infectious bronchitis virus in specific pathogen-free chicken. **Virology Journal**, v.85, p.1-9, 2012.

Züst, R.; Cervantes-Barragan, L.; Kuri, T.; Blakqori, G.; Weber, F.; Ludewig, B.; Thiel, V.. Coronavirus non-structural protein 1 is a major pathogenicity factor: implications for the rational design of coronavirus vaccines. **PLoS Pathog.**, v.3, n.8, p.1062-1072, 2007.

Wang, C.H.; Huang, Y.C. Relationship between serotypes and genotypes based on the hypervariable region of the S1 gene of infectious bronchitis virus. **Arch Virol.**, v.145, n.2, p.291-300, 2000.

Wang, C.H.; Tsai, C.T. Genetic grouping for the isolates of avian infectious bronchitis virus in Taiwan. **Arch. Virol.**, 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**, v.192, n.2. p. 710-716, 1993.

Wesseling, J. G., G. J. Godeke, V. E. C. J. Schijns, L. Prevec, F. L. Graham, M. C. Horzinek, and P. J. M. Rottier. Mouse hepatitis virus spike and nucleocapsid proteins expressed by adenovirus vectors protect mice against a lethal infection. **J. Gen. Virol.**, v.74:2061-2069. 1993.

Woo, P.C.; Lau, S.K.; Lam, C.S.; Lai, K.K.; Huang, Y.; Lee, P.; Luk, G.S.; Dyrting, K.C.; Chan, K. H.; Yuen, K.Y. Comparative analysis of complete genome sequences of three avian coronaviruses reveals a novel group 3c coronavirus. **J. Virol.**, v.83, p.908-917, 2009.

Yan, C-H.; Zhao, C-Y.; Ding, H.; Peng, Y-Q.; Jin, P-Y.; Yan, L.; Zhuang, H.; Li, T. Hepatitis B virus basal core promoter mutations A1762T/G1764A are associated with genotype C and a low serum HBsAg level in chronically-infected HBeAg-positive Chinese patients. **Antiviral Research**, v. 96, p.108-114, 2012.

Yu, L.; Jiang, 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 Diseases**, v.45, n.2, p.416-424, 2001.

Yunus, A.W.; Razzazi-Fazeli, E.; Bohm, J. Aflatoxin B (1) in affecting broiler's performance, immunity, and gastrointestinal tract: a review of history and contemporary issues. **Toxins (Basel)**, v.3, n.6, p.566-590, 2012.

ANEXO I

Sequências de S1 de IBV obtidas no presente estudo

Vacina Ma5:

ATGTTGGTAAACACCTCTTTTACTAGTACTCTTTTGTGTGCACTATGTAGTGTCTGCTTTGTATGACAGTAGTTCTTACGTGTACTACT
ACCAAAGTGCCTTCAGACCACCTGATGGTTGGCATTACATGGGGGTGCGTATGCGGTTGTTAAATTTCTAGTGAATCTAATAATGC
AGGCTCTTCATCTGGGTGTACTGTTGGTATTATTCATGGTGGTCTGTTGTTAAATGCTTCTTCTATAGCTATGACGGCACCCTCATCA
GGTATGGCTTGGCTAGCAGTCAGTTTGTACTGCATACTGTAACCTTTTCAGATACTACAGTGTGTTGTACACATTGTTATAAACATG
GTGGGTGTCCTATAACTGGCATGCTTCAACAGCATTCTATACGTGTTCTGCTATGAAAAATGGCCAGCTTTTCTATAATTTAACAGT
TAGTGTAGCTAAGTACCTACTTTTAAATCATTTCAGTGTGTTAATAATTTAACATCCGTATATTTAAATGGTGATCTGTTTACACC
TCTAATGGCACCACAGATGTTACATCTGCAGGTGTTATTTTAAAGCTGGTGGACCTATAACTTATAAAGTTATGAGAGAAGTTAGAG
CCCTGGCTTATTTTGTAAATGGTACTGCACAAGATGTTATTTTGTGTGATGGGTACCTAGAGGCTTGTAGCATGCCAGTATAATAC
TGGCAATTTTTCAGATGGCTTTTATCCTTTTACTAATAGTAGTTAGTTAAGCAGAAGTTTATGTTCTATCGTAAAAATAGTGTAAAT
ACTACTTTTACGTTACACAATTTCACTTTTATAATGAGACTGGCGCCAAACCCAAATCCTAGTGGTGTCCAGAATATTTCAAACCTACC
AAACAAAAACAGCTCAGAGTGGTATTATAAATTTTAAATTTTCTCTGAGTAGTTTGTATTATAAGGAGTCTAATTTTATGTATGG
ATCTTATACCCCAAGTTGTAATTTTAGACTAGAAAATTAATAATAGTTTGTGGTTTAAATTCACCTTTCAGTTTCAATTTGCTTACGGT
CCTCTTCAAGGTGGTGAAGCAATCTGTCTTTAGTGGTAGAGCAACCTGTTGTTATGCTTACTCATATGGAGGTCCTTTGCTGTGTA
AAGGTGTTTATTCAGGTGAGTTAGATCATAAATTTGAATGTGGACTGTTAGTTTATGTTACTAAGAGCGGTGGCTCTCGTATACAAC
AGCCACTGAACCCAGTTATAACTCAACACAATTAATAATATTACTTTAAATACCTGTGTTGATTATAATATATATGGCAGAAGT
GGCCAAGGTTTTTACTAATGTAACCGACTCAGCTGTAGTTATAATTTACTAGCAGACCGAGTTTGGCTATTTTATAGTACATCTG
GTTCCATAGACATCTTTGTCGTACAAGTGAATATGGTCTTAATTTATAAAGTTAACCTTGGGAAGATGTCAACCAGCAGTTTGT
AGTTTCTGGTGGTAAATTTAGTAGGTATTCTTACTTCACGTAATGAGACTGGTCCAGCTTCTTGAGAATCAGTTTACATCAAAATC
ACTAATGGAACACGTCGTTTATAGACG

Vacina A:

ATGTTGGTAAACACCTCTTTTACTAGTACTCTTTTGTGTGCACTATGTAGTGTCTGCTTTGTATGACAGTAGTTCTTACGTGTACTACT
ATCAAAGTGCCTTCAGACCACCTAATGGTTGGCATTACATGGGGGTGCTTATGCGGTAGTTAATTTCTAGCGAATCTAATAATGC
AGGCTCTTCATCTGGGTGTACTGTTGGTACTATTCATGGTGTCTGTTGTTAAATGCTTCTTCTATAGCTATGACGGCACCCTCATCA
GGTATGGCTTGGCTAGCAGTCAGTTTGTACTGCACACTGTAACCTTTTCAGATACTACAGTGTGTTGTACACATTGTTATAAACATG
GTGATGGCTTGGCTAGCAGTCAGTTTGTACTGCACACTGTAACCTTTTCAGATACTACAGTGTGTTGTACACATTGTTATAAACATG
GTGATGGCTTGGCTAGCAGTCAGTTTGTACTGCACACTGTAACCTTTTCAGATACTACAGTGTGTTGTACACATTGTTATAAACATG
TAGTGTAGCTAAGTACCTACTTTTAAATCATTTCAGTGTGTTAATAATTTAACATCCGTATATTTAAATGGTGATCTGTTTACACC
TCTAATGAGACCACAGATGTTACATCTGCAGGTGTTATTTTAAAGCTGGTGGACCTATAACTTATAAAGTTATGAGAGAAGTTAAAG
CCCTGGCTTATTTTGTAAATGGTACTGCACAAGATGTTATTTTAAAGCTGGTGGACCTATAACTTATAAAGTTATGAGAGAAGTTAAAG
TGGCAATTTTTCAGATGGCTTTTATCCTTTTATTAATAGTAGTTTAGTTAAGCAGAAGTTTATAGTCTATCGTAAAAATAGTGTAAAT
ACTACTTTTACGTTACACTAATTTTCAGTTTTCATAATGAGACTGGCGCCAAACCTAATCCTAGTGGTGTCCAGAATATTTCAAACCTACC
AAACAAAAACAGCTCAGAGTGGTATTATAAATTTTAAATTTTCTCTGAGTAGTTTGTATTATAAAGGAGTCTAATTTTATGTATGG
ATCTTATACCCCAAGTTGTAATTTTAGACTAGAAAATTAATAATAGTTTGTGGTTTAAATTCACCTTTCAGTTTCAATTTGCTTACGGT
CCTCTTCAAGGTGGTGAAGCAATCTGTCTTTAGTGGTAGAGCAACCTGTTGTTATGCTTATTATCATATGAAGGTCCTTTGCTTTGTA
AAGGTGTTTATTCGGGTGAGTTAGACCATAATTTGAATGTGGACTGTTAGTTTATGTTACTAAGAGCGGTGGCTCTCGTATACAAC
AGCCACTGAACCCAGTTATAACTCAACACAATTAATAATATTACTTTAAATACCTTGTGTTGATTATAATATATATGGCAGAAGT
GGCCAAGGTTTTTACTAATGTAACCGACTCAGCTGTAGTTATAATTTACTAGCAGACCGAGTTTGGCTATTTTATAGTACATCTG
GTTCCATAGACATCTTTGTTGTAACAGTGAATATGGTCTTAATTTATAAAGTTAAATCCTTGGGAAGATGTCAACCAGCAGTTTGT
AGTTTCTGGTGGTAAATTTAGTAGGTATTCTTACTTCACGTAATGAGACTGGTTCAGCTTCTTGAGAACCAGTTTACATCAAAATC
ACAATGGAACACGTCGTTATAGACG

Vacina B:

ATGTTGGTAAACACCTCTTTTACTAGTACTCTTTTGTGTGCACTATGTAGTGTCTGCTTTGTATGACAGTAGTTCTTACGTGTACTACT
ACCAAAGTGCCTTCAGACCACCTGATGGTTGGCATTACATGGGGGTGCGTATGCGGTTGTTAAATTTCTAGTGAATCTAATAATGC
AGGCTCTTCATCTGGGTGTACTGTTGGTATTATTCATGGTGGTCTGTTGTTAAATGCTTCTTCTATAGCTATGACGGCACCCTCATCA
GGTATGGCTTGGCTAGCAGTCAGTTTGTACTGCATACTGTAACCTTTTCAGATACTACAGTGTGTTGTACACATTGTTATAAACATG
GTGGGTGTCCTATAACTGGCATGCTTCAACAGCATTCTATACGTGTTCTGCTATGAAAAATGGCCAGCTTTTATAATTTAACAGT
TAGTGTAGCTAAGTACCTACTTTTAAATCATTTCAGTGTGTTAATAATTTAACATCCGTATATTTAAATGGTGATCTGTTTACACC
TCTAATGAGACCACAGATGTTACATCTGCAGGTGTTATTTTAAAGCTGGTGGACCTATAACTTATAAAGTTATGAGAGAAGTTAGAG
CCCTGGCTTATTTTGTAAATGGTACTGCACAAGATGTTATTTTGTGTGATGGGTACCTAGAGGCTTGTAGCATGCCAGTATAAATAC
TGGCAATTTTTCAGATGGCTTTTATCCTTTTACTAATAGTAGTTTGTGTTAAGCAGAAGTTTATGTTCTATCGTAAAAATAGTGTAAAT
ACTACTTTTACGTTACACAATTTCACTTTTATAATGAGACTGGCGCCAAACCCAAATCCTAGTGGTGTCCAGAATATTTCAAACCTACC
AAACAAAAACAGCTCAGAGTGGTATTATAAATTTTAAATTTTCTCTGAGTAGTTTGTATTATAAAGGAGTCTAATTTTATGTATGG
ATCTTATACCCCAAGTTGTAATTTTAGACTAGAAAATTAATAATAGTTTGTGGTTTAAATTCACCTTTCAGTTTCAATTTGCTTACGGT
CCTCTTCAAGGTGGTGAAGCAATCTGTCTTTAGTGGTAGAGCAACCTGTTGTTATGCTTACTCATATGGAGGTCCTTTGCTGTGTA
AAGGTGTTTATTCAGGTGAGTTAGATCATAAATTTGAATGTGGACTGTTAGTTTATGTTACTAAGAGCGGTGGCTCTCGTATACAAC
AGCCACTGAACCCAGTTATAACTCAACACAATTAATAATATTACTTTAAATACCTTGTGTTGATTATAATATATATGGCAGAAGT
GGCCAAGGTTTTTACTAATGTAACCGACTCAGCTGTAGTTATAATTTACTAGCAGACCGAGTTTGGCTATTTTATAGTACATCTG
GTTCCATAGACATCTTTGTCGTACAAGTGAATATGGTCTTAATTTATAAAGTTAAATCCTTGGGAAGATGTCAACCAGCAGTTTGT
AGTTTCTGGTGGTAAATTTAGTAGGTATTCTTACTTCACGTAATGAGACTGGTTCAGCTTCTTGAGAACCAGTTTACATCAAAATC
ACTAATGGAACACGTCGTTATAGACG

Vacina C:

ATGTTGGTAAACACCTCTTTTACTAGTACTCTTTTGTGTGCACTATGTAGTGTCTGCTTTGTATGACAGTAGTTCTTACGTGTACTACT
ACCAAAGTGCCTTCAGACCACCTGATGGTTGGCATTACATGGGGGTGCGTATGCGGTTGTTAAATTTCTAGTGAATCTAATAATGC
AGGCTCTTCATCTGGGTGTACTGTTGGTATTATTCATGGTGGTCTGTTGTTAAATGCTTCTTCTATAGCTATGACGGCACCCTCATCA
GGTATGGCTTGGCTAGCAGTCAGTTTGTACTGCATACTGTAACCTTTTCAGATACTACAGTGTGTTGTACACATTGTTATAAACATG
TGGGTGTCCTATAACTGGCATGCTTCAACAGCATTCTATACGTGTTCTGCTATGAAAAATGGCCAGCTTTTATAATTTAACAGT
TAGTGTAGCTAAGTACCTACTTTTAAATCATTTCAGTGTGTTAATAATTTAACATCCGTATATTTAAATGGTGATCTGTTTACACC
TCTAATGAGACCACAGATGTTACATCTGCAGGTGTTATTTTAAAGCTGGTGGACCTATAACTTATAAAGTTATGAGAGAAGTTAGAG
CCCTGGCTTATTTTGTAAATGGTACTGCACAAGATGTTATTTTGTGTGATGGGTACCTAGAGGCTTGTAGCATGCCAGTATAAATAC
TGGCAATTTTTCAGATGGCTTTTATCCTTTTACTAATAGTAGTTTGTGTTAAGCAGAAGTTTATGTTCTATCGTAAAAATAGTGTAAAT
ACTACTTTTACGTTACACAATTTCACTTTTATAATGAGACTGGCGCCAAACCCAAATCCTAGTGGTGTCCAGAATATTTCAAACCTACC
AAACAAAAACAGCTCAGAGTGGTATTATAAATTTTAAATTTTCTCTGAGTAGTTTGTATTATAAAGGAGTCTAATTTTATGTATGG
ATCTTATACCCCAAGTTGTAATTTTAGACTAGAAAATTAATAATAGTTTGTGGTTTAAATTCACCTTTCAGTTTCAATTTGCTTACGGT
CCTCTTCAAGGTGGTGAAGCAATCTGTCTTTAGTGGTAGAGCAACCTGTTGTTATGCTTACTCATATGGAGGTCCTTTGCTGTGTA
AAGGTGTTTATTCAGGTGAGTTAGATCATAAATTTGAATGTGGACTGTTAGTTTATGTTACTAAGAGCGGTGGCTCTCGTATACAAC
AGCCACTGAACCCAGTTATAACTCAACACAATTAATAATATTACTTTAAATACCTTGTGTTGATTATAATATATATGGCAGAAGT
GGCCAAGGTTTTTACTAATGTAACCGACTCAGCTGTAGTTATAATTTACTAGCAGACCGAGTTTGGCTATTTTATAGTACATCTG
GTTCCATAGACATCTTTGTCGTACAAGTGAATATGGTCTTAATTTATAAAGTTAAATCCTTGGGAAGATGTCAACCAGCAGTTTGT
AGTTTCTGGTGGTAAATTTAGTAGGTATTCTTACTTCACGTAATGAGACTGGTTCAGCTTCTTGAGAACCAGTTTACATCAAAATC
ACTAATGGAACACGTCGTTATAGACG

CCCTGGCTTATTTTGTAAATGGTACTGCACAAGATGTTATTTTGTGTGATGGGTCACCTAGAGGCTTGTAGCATGCCAGTATAATAC
TGGCAATTTTTCAGATGGCTTTTATCCTTTTACTAATAGTAGTTTAGTTAAGCAGAAGTTTATTGTCTATCGTGAATAAGTGTAA
TACTACTTTTACGTTACACAATTTCACTTTTTCATAATGAGACTGGCGCCAACCCAAATCCTAGTGGTGTCCAGAATATCAAACTTAC
CAACACAAACAGCTCAGAGTGGTTATTATAATTTTAAATTTTCTTTCTGAGTAGTTTGTGTTATAAGGAGTCTAATTTTATGTATG
GATCTTATCACCCAAGTTGTAATTTAGACTAGAACTATTAATAATGGTTTGTGGTTAATTCAGTTTCAATTGCTTACGG
TCCTCTTCAAGGTGGTGCAGCAATCTGTCTTTAGTGGTAGACCACTGTTGTTATGCTTACTCATATGGAGGCTCTTTGCTGTGT
AAAGGTGTTTATTCAGGTGAGTTAGATCATAATTTGAATGTGGACTGTTAGTTTATGTTACTAAGAGCGGGTGGCTCTCGTATACAAA
CAGCCACTGAACCGCCAGTTATAACTCAACACAATTATAATAATTTACTTTAAATACTTGTGTTGATTATAATATATATGGCAGAAC
TGGCCAAGGTTTATTACTAATGTAACCGACTCAGCTGTTAGTTATAATTTATCTAGCAGACGCAGGTTTGGCTATTTTATAGATACATCT
GGTTCATAGACATCTTTGTGTCACAAAGTGAATATGGTCTTAATTTATAAGGTTAACCTTGCAGAGATGTAACCCAGCAGTTT
TAGTTTCTGGTGGTAAATTAGTAGTATCTTACTTTCACGTAATGAGACTGGTTCACGCTTCTTGGAAATCAGTTTTCATCAAAA
CACTAATGGAACACGCTCGTTTATAGAC

Vacina D:

ATGTTGGTAAACACCTCTTTTACTAGTACTCTTTTGTGTGCACTATGAGTGTGCTTTGTATGACAGTAGTCTTACGTTACTACT
ACCAAAGTCCCTCAGACCACCTGATGGTTGGCATTGACATGGGGGTCTTATGCGGTAGTTAATATTTCTAGCGAATCAATAATGC
AGGCTCTTTCATCTGGGTGTACTGTTGGTACTATTCACTGGTGTCTGTTGTTAATGCTTCTTCTATAGCTATGACGGCACCCTCATCA
GGTATGGCTTGGCTAGCAGTCACTTTTACTGACACTGTAACCTTTTTCAGATACTACAGTGTGTTTACACATTGTTATAAACAATG
GTGGGTGTCCTATAACTGGCATGCTTCAACAGCATTATACGTTGTTCTGCTATGAAAAATGGCCAGCTTTTCTATAATTTAACA
TAGTGTAGCTAAGTACCCTACTTTTAAATCAATTCAGTGTGTTAATAATTTAACATCCGTATATTTAAATGGTGTCTTGTATACAC
TCTAATGAGACCACAGATGTTACATCTGCAGGTGTTTATTTTAAAGCTGGTGGACCTATAACTTATAAAGTTATGAGAGAAGTTAAAG
CTCGGGCTTATTTTGTAAATGGTACTGCACAAGATGTTATTTTGTGTGATGGACTACCTAGAGGCTTGTAGCATGCCAGTATAATA
CTGGCAATTTTTCAGATGGCTTTTATCCTTTTATTAATAGTAGTTAGTTAAGCAGAAGTTTATAGTCTATCGTGAATAAGTGTGTTAA
TACTACTTTTACGTTTACTACTATTTCAGTTTTCATAATGAGACTGGCGCCAACCCAAATCCTAGTGGTGTTCAGAATATCAAACTTAC
CAACACAAACAGCTCAGAGTGGTTATTATAATTTTAAATTTTCTTTCTGAGTAGTTTGTGTTATAAGGAGTCTAATTTTATGTATG
GATCTTATCACCAAGTTGTAATTTAGACTAGAACTATTAATAATGGCTTGTGGTTAATTCAGTTTCAATTTGCTTACGG
TCCTCTTCAAGGTGGTGCAGCAATCTGTCTTTAGTGGTAGAGCAACTGTTGTTATGCTTATTTCATATGAAGGTCCTTTGCTTTGT
AAAGGTGTTTATTCGGGTGAGTTAGACCATAATTTGAATGTGGACTGTTAGTTTATGTTACTAAGAGCGGTGGCTCTCGTATACAAA
CAGCCACTGAACCGCCAGTTATAACTCAACACAATTATAATAATTTACTTTAAATACTTGTGTTGATTATAATATATATGGCAGAAC
TGGCCAAGTGTTTTACTAATGTAACCGACTCAGCTGTTAGTTAATAATTTATCTAGCAGACGCAGGTTTGGCTATTTTATAGATACATCT
GGTTCATAGACATCTTTGTGTCACAAAGTGAATATGGTCTTAATTTATAAGGTTAATCCTTGCAGAGATGTAACCCAGCAGTTT
TAGTTTCTGGTGGTAAATTAGTAGTATCTTACTTTCACGTAATGAGACTGGTTCAGCTTCTTGGAAATCAGTTTTCATCAAAA
TCACTAATGGAACACGCTCGTTTATAGAC

Amostras clínicas:

Traqueia

CGTATGCGGTTGTTAATATTTCTAGTGAATCTAATAATGCAGGCTCTTCATCTGGGTGACTGTTGGTATTATTTCATGGTGGTCTGTT
TGTAAATGCTTCTTCTATAGCTATGACGGCACCCTCATCAGGTATGGCTTGGCTAGCAGTCACTTTTGTACTGCATACTGTAACCTTT
TCAGATACTACAGTGTGTTTACACATTGTTATAAACAATGGTGGGTGCTCTATAACTGGCATGCTTCAACAGCATCTTATACGTTGTT
CTGCTATGAAAAATGGCCAGCTTTTCTATAATTTAACAGTTAGTGTAGCTAAGTACCCTACTTTTAAATCAATTCAGTGTGTTAATAA
TTTAAACATCCGTATATTTAAATGGTGTATCTGTTTACACCTCTAATGCGACCACAGATGTTACATCTGCAGGTGTTTATTTTAAAGCT
GGTGGACCTATAACTTATAAAGTTATGAGAGAAGTTAGAGCCCTGGCTTATTTTGTAAATGGTACTGCACAAGATGTTATTTTGTGTG
ATGGGTCACTAGAGGCTTGTAGCATGCCAGTATAAATACTGGCAATTTTTCAGATGGCTTTTATCCTTTTACTAATAGTTATG

Pulmão

TATGCGGTTGTTAATATTTCTAGTGAATCTAATAATGCAGGCTCTTCATCTGGGTGACTGTTGGTATTATTTCATGGTGGTCTGTTG
TTAATGCTTCTTCTATAGCTATGACGGCACCCTCATCAGGTATGGCTTGGTCTAGCAGTCACTTTTGTACTGCATACTGTAACCTTTT
AGATACTACAGTGTGTTTACACATTGTTATAAACAATGGTGGGTGCTCTATAACTGGCATGCTTCAACAGCATCTTATACGTTGTTCT
GCTATGAAAAATGGCCAGCTTTTCTATAATTTAACAGTTAGTGTAGCTAAGTACCCTACTTTTAAATCAATTCAGTGTGTTAATAAT
TAAACATCCGTATATTTAAATGGTGTATCTGTTTACACCTCTAATGCGACCACAGATGTTACATCTGCAGGTGTTTATTTTAAAGCTGG
TGGACCTATAACTTATAAAGTTATGAGAGAAGTTAGAGCCCTGGCTTATTTTGTAAATGGTACTGCACAAGATGTTATTTTGTGTGAT
GGGTCACTAGAGGCTTGTAGCATGCCAGTATAAATACTGGCAATTTTTCAGATGGCTTTTATCCTTTTACTAATAG

Rim

AAAAAAAATTCAAAGCTCAGGGGGGGCGTATGCGGTAGTTAATATTTCTAGCGAATCTAATAATGCAGGCTCTTCATCTGGGTG
ACTGTTGGTACTATTTCATGGTGTGCTGTTGTTAATGCTTCTTCTATAGCTATGACGGCACCCTCATCAGGTATGGCTTGGTCTAGCA
GTCAGTTTGTACTGCACACTGTAACCTTTTCAGATACTACAGTGTGTTTACACATTGTTATAAACAATGGTGGGTGCTCTATAACTGG
CATGCTTCAACAGCATTTTATACGTTGTTCTGCTATGAAAAATGGCCAGCTTTTCTATAATTTAACAGTTAGTGTAGCTAAGTACCCTA
ACTTTTAAATCAATTCAGTGTGTTAATAATTTAACATCCGTATATTTAAATGGTGTATCTGTTTACACCTCTAATGAGACCACAGATG
TTACATCTGCAGGTGTTTATTTTAAAGCTGGTGGACCTATAACTTATAAAGTTATGAGAGAAGTTAAAGCCCTGGCTTATTTTGTGTTAA
TGGTACTGCACAAGATGTTATTTTGTGTGATGGATCACCTAGAGGCTTGTAGCATGCCAATACAAACCCGGAATTCGAGA

Intestino delgado

CGTATGCGGTTGTTAATATTTCTAGTGAATCTAATAATGCAGGCTCTTCATCTGGGTGACTGTTGGTATTATTTCATGGTGGTCTGTT
TGTAAATGCTTCTTCTATAGCTATGACGGCACCCTCATCAGGTATGGCTTGGCTAGCAGTCACTTTTGTACTGCATACTGTAACCTTT
TCAGATACTACAGTGTGTTTACACATTGTTATAAACAATGGTGGGTGCTCTATAACTGGCATGCTTCAACAGCATCTTATACGTTGTT
CTGCTATGAAAAATGGCCAGCTTTTCTATAATTTAACAGTTAGTGTAGCTAAGTACCCTACTTTTAAATCAATTCAGTGTGTTAATAA
TTTAAACATCCGTATATTTAAATGGTGTATCTGTTTACACCTCTAATGCGACCACAGATGTTACATCTGCAGGTGTTTATTTTAAAGCT
GGTGGACCTATAACTTATAAAGTTATGAGAGAAGTTAGAGCCCTGGCTTATTTTGTAAATGGTACTGCACAAGATGTTATTTTGTGTG
ATGGGTCACTAGAGGCTTGTAGCATGCCAGTATAAATACTGGCAATTTTTCAGATGGCTTTTATCCTTTTACTAATAGTA

Bolsa cloacal

TTCTCGAATTTCCGGTGTGTTATGGCATGCTAACAAGCCTCTAGGTGACCCATCACACAAAATAACATCTTGTGCAGTACCATTAAC
AAAAAAGCCAGGGCTCTAATCTCTCATAACTTTATAAGTTATAGGTCCACCAGCTTTAAATAAACACCTGCAGATGTAACATCT

GTGGTGTTCATTAGAGGTGTAACAAGATCACCATTTAAATATACGGATGTTAAATTATTAACACACTGAAATGATTTAAAAGTAGGGT
ACTTAGCTACACTAACTGTTAAATATAGAAAAGCTGGCCATTTTTTCATAGCAGAAAACCGTATAGAAATGCTGTTGAAGCATGCCAGT
TATAGGACACCCATCATGTTTATAACAATGTGTAAACAACACTGTAGTATCTGAAAAGTTACAGTATGCAGTACAAAACACTGACTGCTA
GACCAAGCCATACCTGATGACGGTCCGCTCATAGCTATAGAAGAAGCATTAACAACACGACCACCCATGAATAATACCAACAGTACACC
CAGATGAAGAGCCCTGCATTATTAGATTCACTAGAAAATTAACAACCCGCATACGCCCCCCCTGAAAGCTTTGAAA

Isolado de amostras clínicas de rins (1ª passagem):

TTTCAAAGCCCTTCAGGGGGGGCGTATGCGGTTGTTAAATTTCTAGTGAATCTAATAATGCAGGCTCTTCATCTGGGTGTACTGTT
GGTATTATTCATGGTGGTTCGTTGTTAAATGCTTCTTCTATAGCTATGACGGCACCGTCATCAGGTATGGCTTGGTCTAGCAGTCAGT
TTTGTACTGCATACTGTAACTTTTCAGATACTACAGTGTGTTGTTACACATGTTATAAACATGGTGGGTGCTCTATAACTGGCATGCT
TCAACAGCATTCTATACGTGTTCTGCTATGAAAAATGGCCAGCTTTTCTATAATTTAACAGTTAGTGTAGCTAAGTACCCTACTTTT
AAATCATTTACAGTGTGTTAAATAATTTAACATCCGTATATTTAAATGTTGATCTTGTGTTACACCTCTAATGCGACCACAGATGTTACAT
CTGACAGTGTGTTATTTTAAAGCTGGTGGACCTATAACTATAAAGTTATGAGAGAAGTTAGAGCCCTGGCTTATTTGTTAATGGTAC
TGCACAAGATGTTATTTTGTGTGATGGGTACCTAGAGGCTTGTAGCATGCCAATACAACACCCGGAATTCGAGAA

Isolado de amostras clínicas de rins (3ª passagem):

TCGTGTTGATTGGCATGCTAACAAGCCCTCTAGGTGACCCATCACACAAAATAACATCTTGTGCAGTACCATTAAACAAAATAAGCCAG
GGCTCTAACTTCTCTCATAACTTTATAAGTTATAGGTCCACCAGCTTTAAAATAAACACCTGCAGATGTAACATCTGTGGTCTCATT
GAGGTGTAACAAGATCACCATTTAAATATACGGATGTTAAATTTAACACACTGAAATGATTTAAAAGTAGGGTACTTTAGCTACAC
TAACTGTTAAATTAATAAAAAGCTGGCCATTTTTTCATAGCAGAAAACCGTATAGAATGCTGTTGAAGCATGCCAGTTATAGGACACCC
AACATGTTTGTAAACAATGTGTAAACAACACTGTAGTATCTGAAAAGTTACAGTATGCAGTACAAAACACTGACTGCTAGACCAGCCATA
CCTGATGACGGTCCGCTATAGCTATAGAAGAAGCATTAACAACACGACCACCCATGAATAATACCAACAGTACACCAGATGAAGAGC
CTGCATTATTAGATTCACTAGAAAATTAACAACCCGCATACGCCCCCCCTGAAAGCTTTGAAA

Amostras de órgãos de galinha em final de produção:

Rins

TGGGGGTGCGTATGCGGTTGTTAAATTTCTAGTGAATCTAATAATGCAGGCTCTTCATCTGGGTGTACTGTTGGTATTATTCATGGT
GGTTCGTTGTTAAATGCTTCTTCTATAGCTATGACGGCACCGTCATCAGGTATGGCTTGGTCTAGCAGTCAGTTTGTACTGCATACT
GTAACTTTTCAGATACTACAGTGTGTTTACACATGTTATAAACATGGTGGGTGCTCTATAACTGGCATGCTTCAACAGCATTCTAT
ACGTGTTTCTGCTATGAAAAATGGCCAGCTTTTCTATAATTTAACAGTTAGTGTAGCTAAGTACCCTACTTTTAAATCATTTACAGTGT
GTTAATAATTTAACATCCGTATATTTAAATGTTGATCTTGTGTTACACCTCTAATGCGACCACAGATGTTACATCTGCAGGTGTTTATT
TTAAAGCTGGTGGACCTATAACTTATAAAGTTATGAGAGAAGTTAGAGCCCTGGCTTATTTGTTAATGGTACTGCACAAGATGTTAT
TTTGTGTGATGGGTACCTAGAGGCTTGTAGCATGCCAGTATAAATCTGGCAATTTTTTCAGATGGCTTTTATCCTTTTACTAATAGT
AGTTTAGT

Intestino delgado

GCGGTTGTTAAATTTCTAGTGAATCTAATAATGCAGGCTCTTCATCTGGGTGTACTGTTGGTATTATTTCATGGTGGTTCGTTGTTA
ATGCTTCTTCTATAGCTATGACGGCACCGTCATCAGGTATGGCTTGGTCTAGCAGTCAGTTTGTACTGCATACTGTAACTTTTCAGA
TACTACAGTGTGTTTACACATTTGTTATAAACATGGTGGGTGCTCTATAACTGGCATGCTTCAACAGCATTCTATACGTGTTTCTGCT
ATGAAAAATGGCCAGCTTTTCTATAATTTAACAGTTAGTGTAGCTAAGTACCCTACTTTTAAATCATTTACAGTGTGTTAAATTTAA
CATCCGTATATTTAAATGTTGATCTTGTGTTACACCTCTAATGCGACCACAGATGTTACATCTGCAGGTGTTTATTTTAAAGCTGGTGG
ACCTATAACTTATAAAGTTATGAGAGAAGTTAGAGCCCTGGCTTATTTGTTAATGGTACTGCACAAGATGTTATTTTGTGTGATGGG
TCACCTAGAGGCTTGTAGCATGCCAGTATAAATCTGGCAATTTTTTCAGATGGCTTTTATCCTTTTACTAATAGTAGT

Oviduto

GTATGCGGTTGTTAAATTTCTAGTGAATCTAATAATGCAGGCTCTTCATCTGGGTGTACTGTTGGTATTATTTCATGGTGGTTCGTTGTT
GTTAATGCTTCTTCTATAGCTATGACGGCACCGTCATCAGGTATGGCTTGGTCTAGCAGTCAGTTTGTACTGCATACTGTAACTTT
CAGATACTACAGTGTGTTGTTACACATGTTATAAACATGGTGGGTGCTCTATAACTGGCATGCTTCAACAGCATTCTATACGTGTTT
TGCTATGAAAAATGGCCAGCTTTTCTATAATTTAACAGTTAGTGTAGCTAAGTACCCTACTTTTAAATCATTTACAGTGTGTTAAAT
TTAACATCCGTATATTTAAATGTTGATCTTGTGTTACACCTCTAATGCGACCACAGATGTTACATCTGCAGGTGTTTATTTTAAAGCTG
GTGGACCTATAACTTATAAAGTTATGAGAGAAGTTAGAGCCCTGGCTTATTTGTTAATGGTACTGCACAAGATGTTATTTTGTGTGA
TGGGTCACCTAGAGGCTTGTAGCATGCCAGTATAAATCTGGCAATTTTTTCAGATGGCTTTTATCCTTTTACTAATAGTAGT

Líquido corio-alantoide

CGTATGCGGTTGTTAAATTTCTAGTGAATCTAATAATGCAGGCTCTTCATCTGGGTGTACTGTTGGTATTATTTCATGGTGGTTCGTTGTT
GTTAATGCTTCTTCTATAGCTATGACGGCACCGTCATCAGGTATGGCTTGGTCTAGCAGTCAGTTTGTACTGCATACTGTAACTTT
TCAGATACTACAGTGTGTTGTTACACATGTTATAAACATGGTGGGTGCTCTATAACTGGCATGCTTCAACAGCATTCTATACGTGTTT
CTGCTATGAAAAATGGCCAGCTTTTCTATAATTTAACAGTTAGTGTAGCTAAGTACCCTACTTTTAAATCATTTACAGTGTGTTAAATA
TTAACATCCGTATATTTAAATGTTGATCTTGTGTTACACCTCTAATGCGACCACAGATGTTACATCTGCAGGTGTTTATTTTAAAGCT
GGTGGACCTATAACTTATAAAGTTATGAGAGAAGTTAGAGCCCTGGCTTATTTGTTAATGGTACTGCACAAGATGTTATTTTGTGTG
ATGGGTCACCTAGAGGCTTGTAGCATGCCAGTATAAATCTGGCAATTTTTTCAGATGGCTTTTATCCTTTTACTAATAGTAGT

Tonsilas cecais

TTTCAAAGCTTTTCAGGGGGGGCGTATGACAGTATGTTAATGTTTCTCAGGAATATGCAAAATGCAGGTCCTTCCACATCTTGTACAGCTGG
CGTATCTATTGGAGTAAGAATTTTACTGCATCTTCTAGTATGATGACAGCACCCGTACAAGGTATGCAATGGTCTACTAATCAATTT
TGTACAGCCCATGTAATTTTACTGATATTGTTGATTTGTTACTCATTTGTTTAAAAGCGGGTCGAAAAGTATGCCCTTTAACAGGTC
TCATTTCCACAGAATAATTCGATTTCTGCTATGAAACAAGGAAATACTGGTCTTAGTGGTTGTTTATAATTTAACAGTTCCTGT
GACTAAGTATTCTAAGTTTAAAGTTCGCTTCAATGTTTAAATAATCAAACATCTGTGACCTAAATGGTGTATTTAGTTTTTACTTCTAAT
GAGACAAAAGATTAGTGGCGCAGGTGTTTATTTACAGCCGGAGGCCATAACTTATAAAGTTATGAGAGAAGTTAAAGCTCTAG
CTTATTTTGTAAATGGTACCACATGATGTTATTTGTCGACGGTTCACCTAGAGGTTTGTAGCATGCCAATACAACACCCGAAATTCGAGAA
TTCGAGAA

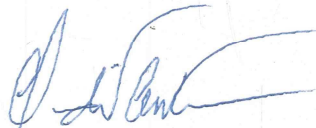
ANEXO II

CERTIFICADO

A Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA/UFV certifica que o processo nº 74/2013, intitulado “*Caracterização e comparação molecular entre isolados de campo e estirpes vacinais do vírus da bronquite infecciosa*”. Coordenado pelo professor Abelardo Silva Júnior do Departamento de Veterinária, está de acordo com o Código de Ética Profissional do Médico Veterinário, com os Princípios Éticos na Experimentação Animal, adotados pela Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL), e com a legislação vigente, tendo sido aprovado por esta Comissão em 15/10/2013, com validade de 12 meses.

CERTIFICATE

The Ethic Committee in Animal Use/UFV certify that the process number 74/2013, named “*Characterization and molecular comparasion between field isolates and vaccine strains of infectious bronchitis virus*”, is in agreement with the Medical Veterinary Professional Ethics Code, with the Ethical Principles for Animal Research established by the Brazilian Society of Science in Laboratory of Animals (SBCAL) and with actual Brazilian legislation. This Institutional Commission on October 15, 2013 approved this process. This certificate expire in 12 months.



Prof. Cláudio César Fonseca
Coordenador

Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA/UFV