

GIULIANA LORETO SARAIVA

EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR, FILOGENIA E FILOGEOGRAFIA DO
***Infectious bronchitis virus* EM UM PANORAMA GLOBAL**

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

VIÇOSA,
MINAS GERAIS - BRASIL
2015

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

T

S243e
2015 Saraiva, Giuliana Loreto, 1988-
Epidemiologia molecular, filogenia e filogeografia do
Infectious bronchitis virus em um panorama global / Giuliana
Loreto Saraiva. – Viçosa, MG, 2015.
xii, 110f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Márcia Rogéria de Almeida Lamêgo.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.
Inclui bibliografia.

1. Galinha - Doenças - Controle. 2. *Infectious bronchitis virus*. 3. Epidemiologia molecular. I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Medicina Veterinária. Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária. II. Título.

CDD 22. ed. 636.089691

GIULIANA LORETO SARAIVA

**EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR, FILOGENIA E FILOGEOGRAFIA DO
Infectious bronchitis virus EM UM PANORAMA GLOBAL**

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

APROVADA: 09 de julho de 2015.




Abelardo Silva Júnior
(Coorientador)



Luiz Orlando de Oliveira
(Coorientador)



Nelson Rodrigo da Silva Martins



Márcia Rogéria de Almeida Lamégo
(Orientadora)

Aquele que sempre esteve ao meu lado.
Quem me deu FÉ para nunca esquecer que
NÓS conseguiríamos.
Deus toda honra, glória e louvor;
Ofereço.

A minha primeira
professora, minha amada
MÃE. Pela sua força,
amor e compreensão;
Dedico.

AGRADECIMENTOS

“Os poucos professores que me impressionaram, não foram os que sabiam mais, mas aqueles que deram o máximo de si, que me olharam de frente, tal como eu era, com um humanismo que despertou e atraiu meu espírito inseguro e me chamou a assumir minha existência com minhas próprias mãos.”

Charles Chaplin

Ao professor Abelardo pela primeira oportunidade. Agradeço pelos ensinamentos e por mostrar-me novos horizontes para crescimento pessoal e profissional.

Aos meus co-orientadores, Gustavo, Juliana e Luiz Orlando pelo exemplo de profissionalismo. Meu respeito e admiração.

A professora Márcia Rogéria, minha querida orientadora. Agradeço pelo convívio, pelo aprendizado, pela amizade e, principalmente, pela confiança depositada sem garantias.

Ao Claiton Pereira por me “apresentar” o IBV, pelos valiosos ensinamentos e pelo tempo cedido para longas conversas. Grande professor e amigo!

Ao Pedro Marcus Vidigal pela orientação, convívio prazeroso e disponibilidade. Minha eterna gratidão, respeito e admiração pela pessoa e pelo profissional que és. Grande cientista e amigo!

AGRADECIMENTOS

Ao meu Deus que esteve sempre ao meu lado.

Aos meus pais, Dorinha e Leopoldo, pela educação, caráter, honestidade e lição de vida. Herança rica que herdei dos meus pais. Amo vocês!

A minha vovó, Diva, pela lição de vida, por me ensinar o significado do esforço e do equilíbrio da mente para alcançar nossos objetivos.

Aos meus amados irmãos, Ale, Dani, Paty e Tetei pelo incentivo e amor.

A toda minha família pelas orações.

As queridas amigas Ju, Lesllye, Tatisa e Lorena pela compreensão e torcida. Difícil pensar que algo findaria sem nossos momentos de descontração.

Aos colegas do LIMA e da Virologia Animal, pelos conhecimentos e risos compartilhados.

Ao Núcleo de Análises de Biomoléculas (NuBiomol – UFV), a Diretoria de Tecnologia da Informação (DTI) e a Divisão de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico (DCT) pela infraestrutura e serviço oferecido por meio de um Cluster de computadores de alto desempenho.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) pelo incentivo financeiro essencial para concretização deste mestrado.

Por fim, à Universidade Federal de Viçosa e ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, pela oportunidade que me foi concedida. Em especial a Rosi, secretária da pós-graduação em Medicina Veterinária, pela gentileza e colaboração.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS.....	vii
LISTA DE FIGURAS.....	viii
RESUMO.....	ix
ABSTRACT.....	xi
1. INTRODUÇÃO GERAL.....	1
2. OBJETIVOS.....	3
3. REVISÃO DE LITERATURA.....	4
3.1 A bioinformática e suas aplicações.....	5
3.2 História da avicultura industrial.....	9
3.3 Panorama do comércio internacional de material genético na indústria avícola.....	12
3.4 <i>Infectious bronchitis vírus</i> (IBV).....	17
3.4.1 Epidemiologia molecular.....	17
3.4.2 Características estruturais e organização do genoma.....	24
3.4.3 Replicação e patogênese.....	29
3.4.4 Transmissão e sinais clínicos.....	31
3.4.5 Diagnóstico, prevenção e controle.....	32
3.4.6 Evolução e diversidade.....	36
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	39
5. ARTIGO.....	53
5.1 INTRODUÇÃO.....	54
5.2 MATERIAIS E MÉTODOS.....	57
5.2.1 Preparação dos bancos de dados para as análises.....	57
5.2.2 Análise de recombinação.....	58
5.2.3 Estimativas da pressão de seleção.....	60
5.2.4 Árvores filogenéticas.....	60
5.2.5 Estimativas das taxas de mutação.....	62
5.2.6 Análise da dinâmica populacional.....	62
5.2.7 Análise da dispersão viral.....	63
5.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	65
5.3.1 Análises das fontes de diversidade genética.....	65
5.3.2 Análise de pressão de seleção.....	70

5.3.3	Agrupamentos das árvores filogenéticas.....	73
5.3.4	Dinâmica populacional.....	78
5.3.5	Dispersão viral.....	83
5.4	CONCLUSÕES.....	90
5.5	REFERÊNCIAS.....	91
5.6	MATERIAL SUPLEMENTAR.....	101
6.	CONCLUSÕES GERAIS.....	110

LISTA DE TABELAS

REVISÃO DE LITERATURA

Tabela 1 – Ranking dos maiores países importadores e exportadores de aves vivas no período de 1990 a 1994.....	15
Tabela 2 - Ranking dos maiores países importadores e exportadores de aves vivas no período de 2010 a 2014.....	16

ARTIGO

Tabela 1- Resumo do número de sequências parciais e completas do gene N e S1 e sua distribuição em relação aos países de origem.....	59
Tabela 2 - Sequências recombinantes do gene N, suas respectivas sequências parentais e a probabilidade obtida para cada método estatístico.....	67
Tabela 3 - Sequências recombinantes do gene S1, suas respectivas sequências parentais e a probabilidade obtida para cada método estatístico.....	68
Tabela 4 - Pressões seletivas sobre os códons das sequências completas de S1 e N. Significância estatística dos testes: $p < 0,01$	71
Tabela 5 - Sítios sob pressão de seleção e valores globais da estimativa da razão entre as taxas de substituição não sinônimas e sinônimas (dN/dS) para as proteínas S1 e N do IBV. Significância estatística dos testes: $p < 0,01$	72

MATERIAL SUPLEMENTAR

Tabela S1- Sequências completas de S1.....	101
Tabela S2 - Sequências completas de N.....	106

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO DE LITERATURA

Figura 1- Representação das duas principais vertentes da Bioinformática e suas respectivas aplicações.....	7
Figura 2 – Comportamento das exportações e importações de aves vivas de 1961 a 1991.....	14
Figura 3 - No Sentido 5'-3', esquema da organização do genoma do IBV.....	26

ARTIGO

Figura 1- Relações evolutivas entre cepas do IBV baseadas no gene N.....	76
Figura 2 - Relações evolutivas entre cepas do IBV baseadas no gene S1.....	77
Figura 3 - Dinâmica populacional do IBV reconstruída a partir das sequências completas de N e S1.....	80
Figura 4 - Dinâmica populacional do IBV reconstruída a partir das sequências completas dos dois grupos formados na árvore filogenética de S1 (S1-I e S1-II).....	81
Figura 5 – Resumo da dispersão espacial do IBV, com base em 142 sequências completas do gene N, obtida através da análise de <i>Relaxed Random Walk</i> (RRW).....	84
Figura 6 – Resumo da dispersão espacial do IBV, com base em 224 sequências completas do gene S1, obtida através da análise de <i>Relaxed Random Walk</i> (RRW).....	85
Figura 7 - Padrão de dispersão espacial do IBV por centro de dispersão ou região geográfica (China).....	86
Figura 8 - Padrão de dispersão espacial do IBV por centro de dispersão ou região geográfica (EUA).....	87
Figura 9 – Rotas de dispersão do IBV, incluindo pontos de origem e destino, na Europa para os genes N e S1.....	88
Figura 10- Rotas de dispersão do IBV, incluindo pontos de origem e destino, na Oceania para os genes N e S1.....	88
Figura 11 – Rotas de dispersão do IBV, incluindo pontos de origem e destino, em Taiwan e no Brasil para o gene S1.....	89

RESUMO

SARAIVA, Giuliana Loreto, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2015. **Epidemiologia molecular, filogenia e filogeografia do *Infectious bronchitis virus* em um panorama global.** Orientadora: Marcia Rogéria de Almeida Lamêgo. Coorientadores: Abelardo Silva Júnior, Gustavo Costa Bressan, Juliana Lopes Rangel Fietto e Luiz Orlando de Oliveira.

A criação de aves em sistemas industrializados vem adquirindo, mundialmente, características que envolvem uma elevada densidade animal, o que, conseqüentemente, leva ao surgimento de condições epidemiológicas capazes de predispor ao aparecimento de problemas sanitários. Diante deste contexto, aumenta-se a preocupação com as doenças infecciosas, dentre elas, a Bronquite Infecciosa das Galinhas (BIG), cujo agente etiológico é o *Infectious bronchitis virus* (IBV). O presente estudo teve como objetivo reconstruir a epidemiologia molecular do IBV, por meio de análises filogenéticas e filogeográficas dos genes estruturais N e S1, para estudo da evolução viral. Estas informações são importantes para estabelecer um padrão de dispersão em um contexto histórico geográfico, entender eventos biológicos no passado relacionados à dinâmica populacional e ajudar no desenvolvimento de estratégias efetivas de controle do IBV. Para isso, foram montados dois bancos de dados com seqüências moleculares completas e parciais dos genes N e S1 obtidos no *GenBank*. O primeiro banco de dados (IBV1) contemplou seqüências completas de S1 (N=256) e N (N=154) e o segundo banco de dados (IBV2) foi montado com seqüências parciais de S1 (N=390) e N (N=173). Importantes parâmetros para estudo da evolução viral foram analisados nesse trabalho para os genes S1 e N do IBV, incluindo estimativas de eventos de recombinação, taxa de mutação, pressão de seleção, dinâmica populacional e dispersão espacial. Os resultados apontam que, na ausência de uma elevada taxa de mutação e pelo fato da seleção purificadora ser a principal forma de seleção natural no IBV, o processo de recombinação tem um papel fundamental na evolução do IBV. As análises de dinâmica populacional sugerem que, até meados da década de 2000, os diferentes programas de vacinação, juntamente com os métodos de biossegurança, foram eficazes para controlar o crescimento do tamanho efetivo populacional do IBV. Contudo, a partir de 2007, o aumento da população de variantes do IBV, pode indicar que os protocolos vacinais, usados no presente, não estão sendo mais eficazes. Os resultados das análises de dispersão viral do gene S1 e N

foram analisados de forma conjunta, a fim de reconstruir um padrão de dispersão do IBV ao longo de sua história evolutiva. O ponto de origem de todas as cepas atuais do IBV foi a China que, após dispersão local, disseminou para os Estados Unidos e, por conseguinte, se dispersou para diferentes países e continentes até alcançar a ampla distribuição mundial encontrada nos dias atuais. Os principais centros de dispersão atuais do IBV foram a China, Estados Unidos, Brasil, Taiwan e Europa.

ABSTRACT

SARAIVA, Giuliana Loreto, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July, 2015. **Molecular epidemiology, phylogeny and phylogeography of *Infectious bronchitis virus* in global scene.** Advisor: Marcia Rogéria de Almeida Lamêgo. Co-advisors: Abelardo Silva Júnior, Gustavo Costa Bressan, Juliana Lopes Rangel Fietto and Luiz Orlando de Oliveira.

The intensification of poultry in industrial systems has acquired, worldwide, features that involve a high stock density, which, consequently, leads to the emergence of epidemiological conditions that may predispose to the appearance of health problems. Given this context, the concern with infectious diseases increases, among the diseases is the Avian Infectious Bronchitis (IB), whose etiologic agent is the *Infectious bronchitis virus* (IBV). This study aimed to reconstruct the molecular epidemiology of IBV through phylogenetic and phylogeographic analyzes of structural genes N and S1, to the study of viral evolution. These pieces of information are important to establish a pattern of dispersion in a geographical historical context, to understand biological events in the past related to population dynamics and to help develop effective strategies for control of IBV. To establish a better outlook for discussion of IBV molecular epidemiology, there were created two databases with complete and partial molecular sequences of genes N and S1 obtained from *GenBank*. The first database (IBV1) considered complete sequences of the S1 (N = 256) subunit and of the N (N = 154) gene of IBV. To increase the extension of countries from which sequences are available, a second database (IBV2) was created with partial sequences of the S1 (N = 390) gene and the N (N = 173) gene. Important parameters for the study of viral evolution were analyzed in this work for the S1 and N genes of the IBV, including estimates of recombination events, mutation rate, selection pressure, population dynamics and spatial dispersion. The results show that, in the absence of a high mutation rate and because of the purifying selection to be the main form of natural selection in IBV, the recombination process plays a key role in the evolution of IBV. The analysis of population dynamics suggest that, until the mid-2000s, the different vaccination programs, along with the biosecurity methods have been effective in controlling the growth of effective population size of the IBV. However, since 2007, the increase in the population of IBV variants may indicate that the vaccine protocols, used in the present, have not been effective anymore. The results of analyzes

of the viral spread of the gene S1 and N were analyzed together, in order to reconstruct a pattern of the IBV dispersion along its evolutionary history. The point of origin of all current strains of IBV was China, which after local dispersion spread to the United States of America and thus dispersed to different countries and continents until reaching the worldwide distribution found today. The current main scattering centers of the IBV were China, the United States, Brazil, Taiwan and Europe.

1. INTRODUÇÃO GERAL

A intensificação da criação de aves de produção em sistemas industrializados vem adquirindo, mundialmente, características que envolvem a produção avícola integrada, com elevada densidade animal e sob o sistema de confinamento, o que, conseqüentemente, leva ao surgimento de condições epidemiológicas capazes de predispor ao aparecimento de problemas de ordem sanitária.

A avicultura é um setor de grande dinamismo e de expressiva importância econômico-social, levando-se em conta que este setor movimenta diversas atividades correlatas, envolvendo não somente aspectos da produção, mas de comercialização, beneficiamento e prestação de serviços, com geração de empregos e divisas para os países produtores.

A produção mundial de carnes de aves totalizou, em 2014, cerca de 82 milhões de toneladas, sendo o EUA o maior produtor e o Brasil o maior exportador de carne de frango no mundo (ABPA, 2014). No Brasil, a avicultura industrial gerou o total de R\$ 64 bilhões, em 2013, com mais de 3,6 milhões de pessoas empregadas e respondendo por quase 1,5% do Produto Interno Bruto (PIB), conforme exposto pela FAOSTAT/FAO (2015) e ABPA (2015). Uma estimativa para a produção brasileira total de carnes deve passar de 26 milhões de toneladas, em 2014, para 33 milhões em 2024, um acréscimo de 30%. Entre as carnes, a que projeta maior taxa de crescimento da produção, no período 2014 a 2024, é a carne de frango, que deve crescer 3,1% ao ano (MAPA, 2014).

Esses dados ressaltam a importância da avicultura industrial no cenário econômico brasileiro, podendo ser ainda mais rentável dependendo da vigilância constante na sanidade das aves, pois controlando as enfermidades que geram perdas na

produção, bem como perdas por mortalidade, pode-se obter um incremento expressivo no desempenho desse setor.

Dentre as enfermidades, que podem levar à mortalidade de aves de diferentes idades, destaca-se a bronquite infecciosa das galinhas (BIG), que é uma síndrome infecto-contagiosa aguda que acomete frangos, matrizes e poedeiras da espécie *Gallus gallus domesticus*, sendo o seu agente etiológico o vírus da bronquite infecciosa aviária (IBV, *Infectious bronchitis virus*), que pode infectar não só tratos respiratório e reprodutivo, mas também o sistema excretor (renal) das aves (DHINAKAR; JONES, 1997). Também é associada ao IBV a etiologia de processos patológicos entéricos (VILLARREAL et al., 2007).

Segundo Schalk e Hawn (1931), o IBV, que hoje é distribuído mundialmente, foi descrito pela primeira vez na Dakota do Norte, Estados Unidos. Em 1936, estabeleceu-se a etiologia desta doença e, em 1941, teve início à prevenção da BIG em lotes de poedeiras, resultando no primeiro passo para o desenvolvimento do programa de imunização utilizado atualmente (VAN ROEKEL, 1951). Jungherr e colaboradores (1956) observaram que o vírus IBV isolado em Connecticut, em 1951, e o vírus isolado em Massachusetts, em 1941, causavam doenças similares, porém não havia proteção cruzada entre eles. Este estudo foi o primeiro a comprovar a existência de mais de um sorotipo para o IBV (CAVANAGH; NAQI, 2003).

O controle da BIG é realizado através de métodos de biossegurança e pelo uso de vacinas comerciais. Vacinas vivas e inativadas estão sendo amplamente utilizadas, contudo ainda persistem grandes entraves para se estabelecer uma condição de controle efetivo da infecção pelo IBV nos plantéis avícolas, que se encontram mais diretamente relacionados ao aparecimento de novos sorotipos e variantes do agente etiológico, que podem ser distintos das estirpes vacinais. Em decorrência disso, como expõe Montassier

(2008), no mundo todo tem sido crescente a identificação de variantes genéticas e antigênicas do IBV, tornando muito difícil o controle dessa enfermidade.

Os coronavírus, incluindo o IBV, possuem poucos estudos a respeito de sua evolução e dinâmica populacional, com exceção do coronavírus que causa doença respiratória grave em humanos (SARS-CoV) (JACKWOOD et al., 2012). Neste contexto, as abordagens filogenéticas e filogeográficas tornaram-se estratégias importantes para estudar a epidemiologia de patógenos para os quais sequências moleculares estão disponíveis, uma vez que estas abordagens podem elucidar a evolução, estabelecer o padrão de dispersão em um contexto histórico geográfico, entender eventos biológicos no passado relacionados à dinâmica populacional e ajudar no desenvolvimento de estratégias efetivas de controle (VIDIGAL et al., 2012; VERLI, 2014).

Considerando a potencial grande diversidade genética dos isolados de IBV e que pesquisas epidemiológicas são essenciais para entender a evolução de um vírus, o objetivo do trabalho em questão está centrado na reconstrução da epidemiologia molecular de isolados de IBV obtidos de diferentes continentes, por meio de abordagens utilizando bancos de dados de sequências de nucleotídeos e ferramentas de bioinformática.

2. OBJETIVOS

O objetivo geral da pesquisa em questão consistiu em analisar o panorama epidemiológico molecular de IBV, fazendo uso de abordagens filogenéticas e filogeográficas para estudo da evolução viral.

Especificamente, buscou-se:

- Organizar bancos de dados com sequências parciais e completas do gene S1 e do gene N já depositados no *GenBank*, abrangendo isolados brasileiros e mundiais;
- Identificar a presença de isolados virais recombinantes nos bancos de dados;
- Estimar e detectar resíduos de aminoácidos específicos em S1 e N sob pressão de seleção;
- Construir árvores filogenéticas para os bancos de dados;
- Estimar as taxas de mutações;
- Analisar as alterações no tamanho efetivo da população do IBV ao longo do tempo (dinâmica populacional);
- Reconstruir e visualizar os padrões de dispersão espacial do IBV ao longo de sua história evolutiva.

3. REVISÃO DE LITERATURA

Baseando-se nos objetivos propostos, a revisão de literatura enfatizou uma série de tópicos associados entre si, que fundamentam a discussão dos resultados apresentados no artigo desenvolvido nesta dissertação, titulado “Molecular epidemiology, phylogeny and phylogeography of *Infectious bronchitis virus* in global scene”.

Para tanto foram estruturados os seguintes itens:

- A bioinformática e suas aplicações;
- História da avicultura industrial;
- Panorama do comércio internacional de material genético na indústria avícola;
- *Infectious bronchitis virus* (IBV):
 - Epidemiologia molecular;
 - Características estruturais e organização do genoma;
 - Replicação e patogênese;
 - Transmissão e sinais clínicos;
 - Diagnóstico, prevenção e controle;
 - Evolução e diversidade.

3.1 A Bioinformática e suas aplicações

A bioinformática é uma ciência multidisciplinar que se refere ao emprego de ferramentas computacionais para estudo de problemas e questões biológicas. Esta ciência caminha de um simples alinhamento de sequências de nucleotídeos até a complexa modelagem de estruturas proteicas. Tradicionalmente, os ácidos nucleicos e as proteínas são os principais alvos da bioinformática, os primeiros como depósitos da informação biológica, enquanto que as últimas, como efetoras desta informação (XIONG, 2006; VERLI, 2014).

A partir do início da década de 1950, quando o trabalho clássico de Watson e Crick foi publicado sobre a estrutura em hélice da molécula de DNA, até os dias atuais, com o desenvolvimento de computadores pessoais mais poderosos, rápidos e baratos, diversos avanços foram feitos no uso de computadores para o estudo de questões

biológicas aumentando, assim, a vasta gama de potencialidades e aplicações da bioinformática (VERLI, 2014).

Segundo Verli (2014), a bioinformática pode ser separada em duas principais vertentes, a clássica e a estrutural (Figura 1). A vertente clássica aborda principalmente problemas relacionados a sequências de nucleotídeos e aminoácidos e tem como aplicações as comparações entre sequências e análise de polimorfismos, identificação de padrões ou assinaturas, caracterização de relações evolutivas ou filogenéticas, construção e estudo de genomas e a construção de redes de interação entre moléculas. Por outro lado, a vertente estrutural aborda as questões biológicas do ponto de vista tridimensional, abrangendo estudos para obtenção de modelos 3D para proteínas, identificação do modo de interação de moléculas (atracamento), seleção de compostos com maior potencial de inibição (atracamento), caracterização da flexibilidade molecular (dinâmica molecular) e avaliação do efeito de mudanças na estrutura e ambiente molecular na dinâmica e função de biomoléculas (dinâmica molecular). Xiong (2006) considerou três aspectos ou vertentes das análises de bioinformática, as análises de sequências, as estruturais e as funcionais. A vertente funcional inclui a verificação de perfis de expressão gênica, predição de interação proteica e reconstrução de vias metabólicas.

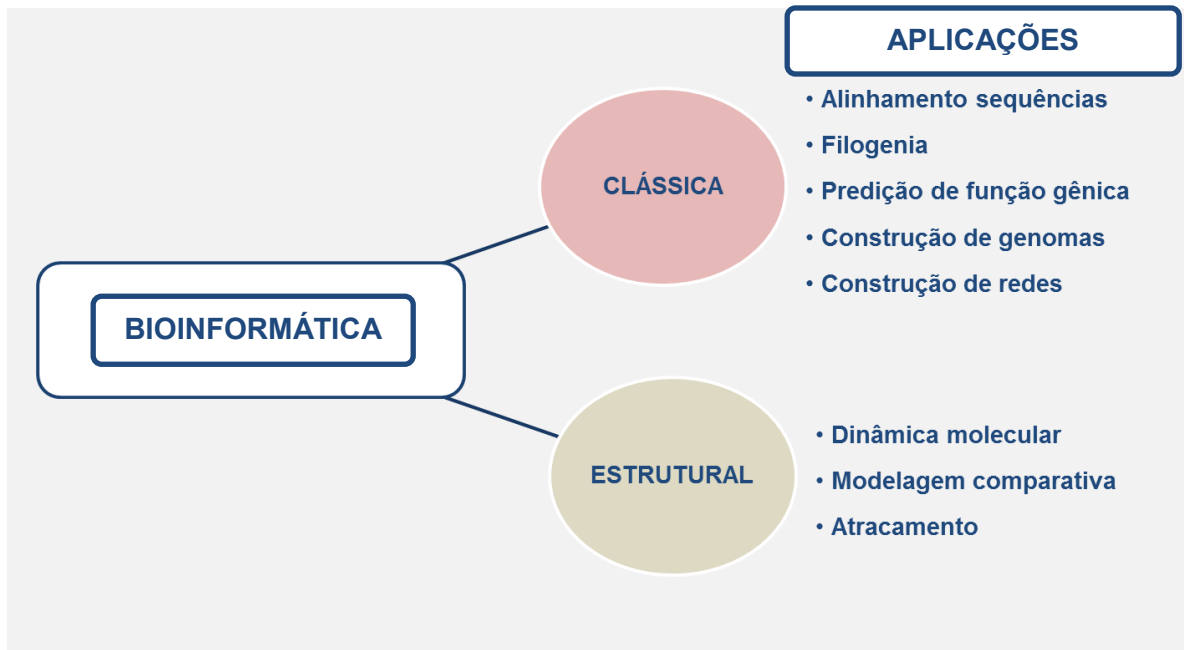


Figura 1: Representação das duas principais vertentes da bioinformática e suas respectivas aplicações. Fonte: Verli (2014) adaptado.

Estudos computacionais são frequentemente chamados de exclusivamente teóricos em oposição aos métodos ditos experimentais, porém não é incomum que um dado computacional apresente maior precisão e confiabilidade do que um dado obtido na bancada, visto que as condições nas quais os experimentos de bancada são realizados (temperatura, contaminantes, operador e outros) podem interferir no resultado final. Outro ponto relevante quanto ao uso de métodos computacionais é que, nem sempre há dados experimentais disponíveis para validar os cálculos e simulações realizadas, como é o caso dos estudos evolutivos, pois geralmente não existem fósseis ou outras evidências para validar antepassados evidenciados por estudos filogenéticos (VERLI, 2014).

Em 1859, Charles Darwin publicou a teoria evolutiva, na qual a classificação dos organismos passou a ter uma característica de ancestralidade comum; ou seja, os organismos são derivados uns dos outros desde o surgimento da vida na Terra. Darwin representou este padrão através de um esquema de ramificação, esquema que viria a ser

a primeira árvore filogenética (VERLI, 2014). Com o passar dos anos, a ciência passou de um ponto de vista macroscópico, baseada em métodos de caracterização fenotípica a um ponto de vista molecular, baseada em dados moleculares obtidos através do sequenciamento de nucleotídeos e aminoácidos. Atualmente, as filogenias podem ser utilizadas para diversas áreas, incluindo genética e evolução, epidemiologia, microbiologia, zoologia e botânica (XIONG, 2006; VERLI, 2014).

Ao decidir trabalhar com a Filogenia, propõe-se uma classificação e atribuição de uma história evolutiva aos organismos. Esta história evolutiva é, frequentemente, desconhecida e há somente uma filogenia verdadeira. Assim, o uso de abordagens filogenéticas permite a obtenção de dados capazes de fornecer a melhor estimativa para se alcançar a verdadeira história da evolução de um organismo, tentando obter uma imagem de como teria sido o passado.

Com o advento do relógio molecular, foi possível aplicar a estimativa de tempo às filogenias e, por conseguinte, evidenciar ancestrais comuns mais recentes, entender eventos biológicos no passado e trabalhar com dinâmica populacional. Além disso, a partir da Filogenia desenvolveu-se o campo da Filogeografia, com a qual foi possível aplicar a estimativa de espaço e, com isso, estudar a distribuição geográfica e a dispersão dos indivíduos (VERLI, 2014).

Como uma ciência complexa e dinâmica e em rápido desenvolvimento, a bioinformática exige de seu praticante uma constante atenção a novas tendências, métodos e abordagens nas análises de dados biológicos. Esta jovem ciência tornou-se uma ferramenta complementar para diversas áreas, por exemplo, no desenvolvimento de novos produtos biotecnológicos; além de ser indispensável para outras, como em análises filogenéticas e filogeográficas. A cada ano que passa é possível abordar problemas mais complexos e mais pesquisadores pode ingressar nesta área de pesquisa,

o que torna a bioinformática umas das áreas do conhecimento mais acessíveis para pesquisadores em início de carreira ou com pouco recurso financeiro.

3.2 História da avicultura industrial

A história da avicultura industrial teve início a partir da Segunda Guerra Mundial, que durou de 1939 a 1945. Até então, a avicultura era uma atividade predominantemente de subsistência e artesanal. A revolução no âmbito do melhoramento genético ainda estava por vir.

Com o decorrer da guerra mundial e a necessidade de aumentar a oferta de carne para os soldados em combate, foi preciso desenvolver a produção industrial de carnes alternativas em vez da carne vermelha, pois era preciso carnes que estivessem prontas para consumo em um curto espaço de tempo. Os EUA, então, começaram a investir em pesquisas, no sentido de obter novas linhagens com maior rendimento e menor consumo de ração, rações que atendessem aos requerimentos nutricionais das novas linhagens e medicamentos específicos para a avicultura industrial. O mesmo foi feito, no pós-guerra, nos países da Europa (LIMA et al., 1995).

A partir de então, a substituição das carnes vermelhas pelas brancas, principalmente a carne de ave, nos países desenvolvidos, decorreu de uma forte queda de seu preço no comércio, resultado da eficiência do seu sistema produtivo. Nos dias atuais, a carne branca tem sido valorizada com base na busca por uma alimentação saudável e equilibrada, bem como em função de valores culturais atrelados a um novo enfoque sobre corpo e estilos de vida.

Após a Segunda Guerra Mundial, com o passar dos anos, houve a expansão progressiva do complexo avícola. Essa expansão e sua consolidação podem ser explicadas, principalmente, pela difusão da avançada tecnologia nas áreas de genética, nutrição, manejo, equipamentos e sanidade, que transformou a avicultura industrial numa atividade bastante desenvolvida em diversos países.

Dentre as tecnologias absorvidas pela indústria avícola, a primordial foi a genética de melhoramento das aves, pelo desenvolvimento de linhagens híbridas, de maior potencial e resistência, por meio de cruzamentos consanguíneos e seleção genética. Esse salto genético possibilitou o desencadeamento de todo um processo de transformação no setor em direção à sua industrialização. O melhoramento genético tem como objetivo, a cada geração, aumentar o número de ovos e pintos por ave alojada, melhorar o índice de conversão alimentar, a taxa de crescimento, o rendimento de abate, o peso médio dos ovos comerciais e a redução da mortalidade (LIMA et al., 1995; MIELE et al., 2006).

Simultaneamente ao melhoramento genético, desenvolveram-se novas técnicas de nutrição animal, através da criação de processos modernos para compor rações adequadas às diferentes fases na produção das aves. Além disso, destaca-se a utilização de matérias-primas de boa qualidade na produção das rações, bem como a possibilidade de substituição de insumos caros por mais rentáveis (LIMA et al., 1995; MIELE et al., 2006).

Outro fator de grande relevância para o crescimento da avicultura industrial foi a adoção dos chamados sistemas integrados de produção, uma parceria entre a empresa e os produtores, atividade que viabilizou a consolidação da produção em cadeia. Essa integração consiste em um apoio permanente dos abatedouros aos avicultores, com o assessoramento de mão de obra especializada, fornecimento de ração, medicamentos e

pintos de um dia. Aos produtores cabe criar as aves de acordo com as melhores práticas de produção e de acordo com as mais rígidas normas de bem-estar animal, biossegurança e sanidade, garantindo a rastreabilidade do produto da granja à mesa do consumidor (MIELE et al., 2006; ABPA, 2015). No mesmo circuito de inovações tecnológicas, desenvolve-se a técnica de reprodução das aves via incubatório aumentando a velocidade de geração de pintos de um dia.

Desde os anos 50, com a introdução de equipamentos diversos e processos mecânicos automáticos, foi possível a formação da linha de produção em grande escala, nos moldes do modelo fordista. Nos anos 60 e 70, outras inovações foram introduzidas, tais como, cortes e remoções de vísceras, que permitiram aumentar a capacidade de produção. Posteriormente, nos anos 80, outros processos como o de aproveitamento de miúdos foram introduzidos (LIMA et al., 1995; MIELE et al., 2006).

No que diz respeito ao aspecto de sanidade, antes do setor avícola passar por uma revolução tecnológica, a transmissão de doenças se fazia de forma rápida e intensa, agravada pela falta de medicamentos (LIMA et al., 1995). Atualmente é grande a preocupação com as doenças infecciosas, evidenciada pela ativa elaboração de programas ou normas para prevenir ou controlar a introdução de agentes infecciosos no plantel avícola nacional e pela ampla disponibilidade de medicamentos destinados a tal setor.

No Brasil, a introdução de linhagens híbridas norte-americanas ocorreu por volta de 1959, inicialmente com a importação de matrizes e, depois, com a importação de avós. Na década de 70, a indústria de frangos brasileira continuou prosperando com excelentes índices de crescimento. A primeira metade dos anos 80 foi o único período de baixo crescimento da produção, compensado, entretanto, pelo crescimento das exportações. Na década de 90, o Brasil já exportava matrizes de corte e postura para

países como Chile, Argentina, Uruguai, Paraguai, Bolívia e Peru (RODRIGUES et al., 2014). Atualmente, devido ao alto nível tecnológico alcançado pela avicultura industrial, o Brasil se encontra em posição privilegiada em relação a outros países exportadores de carne de frango.

3.3 Panorama do comércio internacional de material genético na indústria avícola

A indústria avícola, atualmente, é considerada uma atividade econômica internacionalizada e uniforme, sem fronteiras geográficas de tecnologia e material genético. No entanto, essas características tornam o setor vulnerável a condições sanitárias de produção de cada país, visto que o comércio internacional de material genético pode acarretar em possíveis eventos de introdução de agentes infecciosos para o país importador (RODRIGUES, 2014). Considera-se material genético os ovos férteis e as aves vivas destinadas à reposição de plantéis avícolas, sendo ovos férteis aqueles destinados à incubação e aves vivas aquelas com idade não superior a 72 horas após a eclosão (BRASIL, 2008).

De acordo com Alves (2003), um pequeno grupo de países detém o fornecimento da tecnologia relacionada ao elo de material genético. Os Estados Unidos, Holanda, França, Escócia e Canadá são os principais gerenciadores do comércio internacional de material genético, por meio da atuação de poucas empresas. Estas empresas pertencem a grandes grupos multinacionais que mantem, em outros países, sedes para sua produção. Os principais grupos multinacionais são: Aviagen Internacional Group (Escócia), Tyson Foods Incorporated (EUA), Nutreco Company (Holanda) e Rhodia Merieux (França).

A integração econômica dos mercados mundiais, que ocorreu concomitantemente ao desenvolvimento do sistema intensivo de produção animal, aumentou a circulação de animais e de seus produtos entre os países. Vidigal et al. (2012), analisando as principais rotas de dispersão do Circovírus suíno-2 (PCV-2) entre os países produtores e as correlacionando com o comércio internacional de suínos vivos, encontrou uma forte correlação entre as rotas de dispersão viral, propostas nas análises filogenéticas e filogeográficas, e as estatísticas sobre o comércio internacional de suínos vivos. Portanto, o comércio de animais vivos pode estar contribuindo para a disseminação e o surgimento de agentes infecciosos de animais em diferentes regiões do mundo. Neste sentido, os países devem continuamente aprimorar estratégias de vigilância sanitária, por meio de barreiras sanitárias mais eficazes com relação à negociação de animais vivos.

A fiscalização agropecuária nos pontos de ingresso constitui a primeira barreira à entrada de doenças, que podem atingir as aves comerciais de produção industrial. Nessa fiscalização, o material genético importado deve ser inspecionado quanto à procedência e deve passar por exames laboratoriais. No caso de resultado positivo nos exames, as aves deverão ser sacrificadas e destruídas, assim como os ovos férteis. Além disso, devem ser exigidos que os países exportadores cumpram os procedimentos de higiene e segurança sanitária para aves reprodutoras, descritos no Código Sanitário para os Animais Terrestres da Organização Mundial de Saúde Animal - OIE (BRASIL, 2008).

Analisando o comércio internacional de aves vivas, a partir de dados disponíveis na Food and Agriculture Organization of the United Nations - FAO (<http://faostat3.fao.org/>) e na United Nations Comtrade Database (<http://comtrade.un.org/>), é possível obter estatísticas anuais sobre o comércio

internacional de aves vivas, a partir de 1961 pela FAO e de 1990 pelo Comtrade, para diferentes países ou continentes.

De acordo com os dados disponibilizados pela FAO é possível analisar uma série histórica entre 1961 a 1991 do comércio internacional de aves vivas. Através desses dados foi possível separar alguns países ou conjuntos de países em: predominantemente exportadores (China, Estados Unidos da América e Oceania) importadores (Brasil) ou ambos (Europa) (Figura 2).

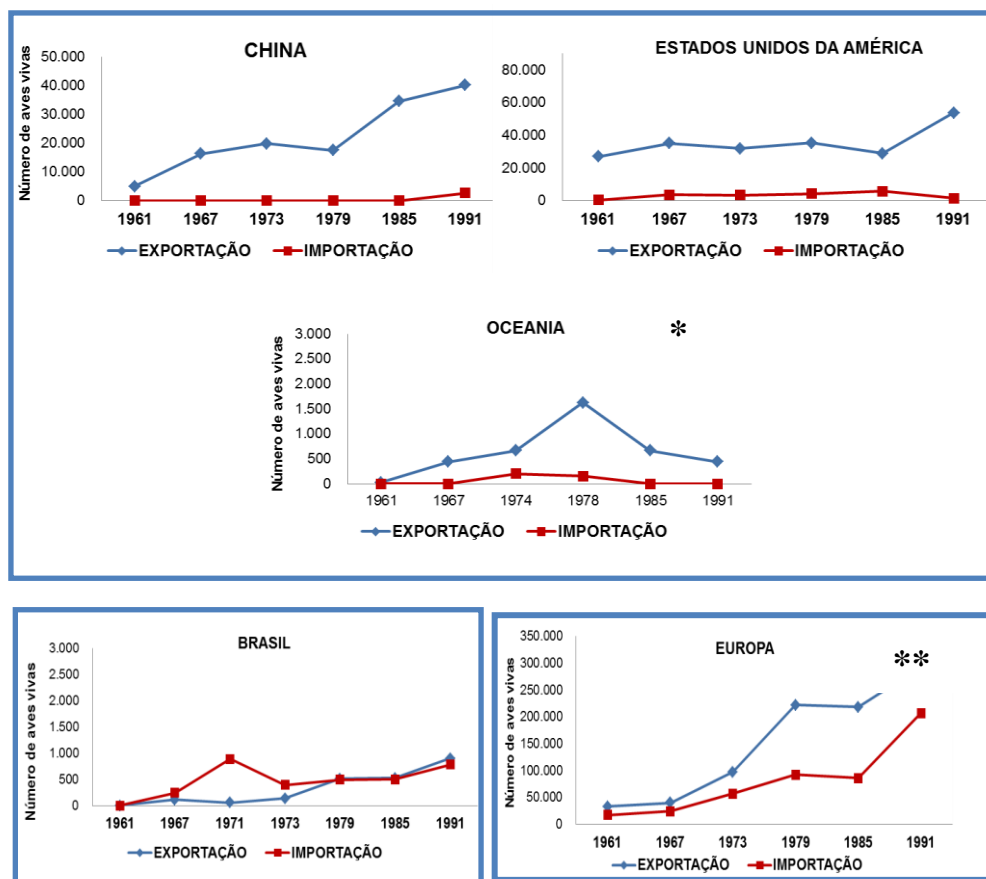


Figura 2: Comportamento das exportações e importações de aves vivas de 1961 a 1991. Fonte: FAOSTAT, 2015. * Representada pela Nova Zelândia e Austrália. Desde 1985, não importa nenhum material genético. ** Europa foi considerada tanto exportadora quanto importadora.

De acordo com a Tabela 1, dados obtidos da United Nations Comtrade, os EUA (\$ 474 milhões de dólares), a Malásia (\$ 374 milhões de dólares), a Holanda (\$ 350 milhões de dólares) e a China (\$ 288 milhões de dólares) foram os principais

exportadores de aves vivas entre 1990 e 1994 e podem ser considerados países predominantemente exportadores (valor exportação > valor importação) e, portanto menos susceptíveis à introdução de novos agentes infecciosos.

Tabela 1: Ranking dos maiores países importadores e exportadores de aves vivas no período de 1990 a 1994. O valor em dólares americanos foi considerado a variável de classificação. A seta vermelha indica que o país é predominantemente importador e seta verde indica que o país é predominantemente exportador. Fonte: Comtrade (2015).

	PAÍSES	IMPORTAÇÃO	PAÍSES	EXPORTAÇÃO
1	Singapura ←	\$ 498.948.248,00	EUA →	\$ 474.086.539,00
2	Holanda	\$ 249.608.520,00	Malásia →	\$ 374.794.364,00
3	Hong Kong ←	\$ 176.950.746,00	Holanda →	\$ 350.297.392,00
4	Canadá ←	\$ 146.385.236,00	China →	\$ 288.861.890,00
5	Alemanha	\$ 137.334.000,00	Alemanha →	\$ 230.873.000,00
6	Espanha ←	\$ 113.837.970,00	Inglaterra →	\$ 124.359.484,00
7	Brasil ←	\$ 62.873.731,00	França →	\$ 96.791.864,00
8	Tailândia ←	\$ 59.728.072,00	Canadá	\$ 78.031.842,00
9	Japão ←	\$ 56.060.417,00	Dinamarca →	\$ 56.448.384,00
10	México ←	\$ 50.390.682,00	Espanha	\$ 50.279.078,00
11	EUA	\$ 41.013.662,00	Brasil	\$ 28.161.582,00
12	Malásia	\$ 38.492.697,00	Tunísia →	\$ 26.081.419,00
13	China	\$ 38.461.339,00	República Checa →	\$ 20.423.181,00
14	Portugal ←	\$ 38.144.315,00	Hungria →	\$ 17.429.000,00
15	Argélia ←	\$ 34.973.859,00	Chile →	\$ 16.455.593,00

De acordo com a Tabela 2, considerando o período de 2010 a 2014, os principais países exportadores de material genético foram a Alemanha (\$ 2,6 bilhões de dólares), a Holanda (\$ 2,1 bilhões de dólares), os EUA (\$ 1 bilhão de dólares) e a França (\$ 993 milhões de dólares).

Entre 1990 e 1994, Singapura (\$ 498 milhões de dólares), Holanda (\$ 249 milhões de dólares), Hong Kong (\$ 176 milhões de dólares) e Canadá (\$ 146 milhões de dólares) foram os principais países importadores. Estes países podem ser incluídos no grupo de países majoritariamente importadores (valor importação > valor exportação) e, com isso, mais susceptíveis a entrada de agentes infecciosos no plantel avícola. Por

outro lado, no período mais recente, os quatro principais compradores de material genético são a Holanda (\$ 2,7 bilhões de dólares), Bélgica (\$ 1,7 bilhão de dólares), Alemanha (\$ 1,2 bilhão de dólares) e Singapura (\$ 786 milhões de dólares).

Tabela 2: Ranking dos maiores países importadores e exportadores de aves vivas no período de 2010 a 2014. O valor em dólares americanos foi considerado a variável de classificação. A seta vermelha indica que o país é predominantemente importador e seta verde indica que o país é predominantemente exportador. Fonte: Comtrade (2015).

	PAÍSES	IMPORTAÇÃO	PAÍSES	EXPORTAÇÃO
1	Holanda ←	\$ 2.712.995.591,00	Alemanha →	\$ 2.627.325.841,00
2	Bélgica ←	\$ 1.770.893.681,00	Holanda	\$ 2.161.618.491,00
3	Alemanha	\$ 1.215.730.255,00	EUA →	\$ 1.002.366.983,00
4	Singapura ←	\$ 786.212.192,00	França →	\$ 993.291.389,00
5	Polônia ←	\$ 622.899.379,00	Malásia →	\$ 769.843.793,00
6	Ucrânia ←	\$ 298.196.561,00	Inglaterra →	\$ 741.010.536,00
7	Espanha ←	\$ 258.618.489,00	Rep. Checa →	\$ 490.192.551,00
8	Rússia ←	\$ 233.443.819,00	Dinamarca →	\$ 484.021.713,00
9	Romênia ←	\$ 220.015.498,00	Bélgica	\$ 393.057.769,00
10	China ←	\$ 218.612.647,00	Hungria →	\$ 328.818.272,00
11	Canadá	\$ 198.718.419,00	Polônia	\$ 328.016.100,00
12	EUA	\$ 198.714.105,00	Eslovênia →	\$ 247.514.161,00
13	Hungria	\$ 172.694.127,00	Canadá →	\$ 234.719.527,00
14	Eslovênia	\$ 171.286.817,00	Brasil →	\$ 222.835.510,00
15	Portugal ←	\$ 168.585.720,00	Espanha	\$ 162.247.310,00

Comparando os períodos apresentados (1961-1991, 1990-1994 e 2010-2014) é possível evidenciar algumas diferenças no padrão do comércio internacional de material genético, como, por exemplo, a situação do Brasil. O Brasil, entre 1961 a 1994, foi o sétimo maior comprador de aves vivas do mundo e estava na décima primeira posição no ranking dos países fornecedores. Portanto, neste período, o Brasil apresentava maior dependência quanto à obtenção de material genético, sendo considerado um país predominantemente importador e, portanto, susceptível a introdução de novos agentes infecciosos no plantel avícola. Entre 2010 e 2014, este padrão se altera e o Brasil passa a

ser um país predominantemente exportador. Outro exemplo que se assemelha ao padrão de mudança brasileiro é o caso do Canadá.

A situação contrária do Brasil e do Canadá ocorreu com países, como a China e a Holanda, no qual, no primeiro momento, eram países predominantemente exportadores e se tornaram países majoritariamente importadores de material genético, aumentando a probabilidade de entrada de patógenos nesses países. Por outro lado, os Estados Unidos manteve seu padrão de país predominantemente exportador, limitando suas importações ao Canadá.

Considerando a União Europeia, não existe uma predominância quanto à exportação e importação, gerando um balanço no comércio total de material genético neste continente. Atualmente, a Holanda, Bélgica, Polônia, Ucrânia, Espanha, Romênia e Portugal são considerados países importadores e a Alemanha, França, Inglaterra, Dinamarca, Hungria e Eslovênia são predominantemente exportadores. Portanto, mesmo com os altos valores de exportação e devido ao alto valor de importação de material genético podemos considerar a Europa susceptível a entrada de patógenos, podendo também funcionar como disseminadora destes patógenos para outros continentes.

3.4 Infectious bronchitis virus (IBV)

3.4.1 Epidemiologia molecular

O IBV apresenta alta prevalência e alta incidência no sistema intensivo de produção, levando a perdas significativas no setor econômico da indústria avícola. A doença causada pelo IBV foi descrita pela primeira vez por Schalk e Hawn nos EUA,

em 1931, como uma doença respiratória que afetava aves jovens. Por muitos anos, foi predominante o isolamento de vírus do tipo Massachusetts, descrito no início de 1930, e do sorotipo Connecticut (Conn) isolado em 1951, nos Estados Unidos (JUNGHER et al., 1956; CAVANAGH, 2007; DHAMA et al., 2014).

Jungherr e colaboradores (1956), utilizando a metodologia de soroneutralização, observaram que o vírus isolado em Connecticut e em Massachussets causava doenças similares, porém não havia proteção cruzada entre eles. Este estudo foi o primeiro a comprovar que o IBV não é homogêneo e que existe mais de um sorotipo para esse vírus (CAVANAGH E NAQI, 2003; COOK et al., 2012).

Durante muitos anos, acreditava-se que a primeira variante do IBV tinha ocorrido somente em 1951 com a descoberta do sorotipo Connecticut; no entanto, um estudo retrospectivo realizado por Jia et al. (2002), utilizando anticorpos monoclonais e análises moleculares da subunidade S1 do gene da glicoproteína de espícula, indicou a presença de estirpes americanas, que não eram do tipo Mass, já no início da década de 1940. Atualmente, já se relata a existência de centenas de sorotipos e variantes do IBV, entre os quais há baixa ou nenhuma proteção cruzada (COOK et al., 1999; CAVANAGH, 2007). Dentre os sorotipos existentes, os mais conhecidos são: Massachusetts, Connecticut, Beaudette, Arkansas, 793B (4/91), D274, D1466, Italy-02 e QX (CAVANAGH, 2007; DHAMA et al., 2014).

O sorotipo Massachusetts, após seu primeiro relato em 1931, chegou a Europa em 1948, sendo primeiramente reportado na Inglaterra (DHAMA et al., 2014). A partir desses relatos da disseminação do IBV para outro continente, aumentou-se a preocupação com o desenvolvimento de novas estratégias de controle do vírus. A primeira tentativa de controle do IBV foi logo no começo de 1940, quando Van Roekel mostrou que era possível proteger as aves contra a infecção pelo IBV, durante o período

de postura, expondo-as previamente ao IBV atenuado por meio de sucessivas passagens em ovo embrionado. Esta abordagem consistia em infectar algumas aves com o vírus atenuado e deixá-lo espalhar naturalmente para o restante do plantel (VAN ROEKEL, 1951).

Esta primeira estratégia de controle deu impulso para o desenvolvimento de vacinas contra o IBV. No início de 1950, a primeira vacina foi desenvolvida nos EUA usando a estirpe M41 (Mass). No início de 1960, o IBV já tinha sido diagnosticado na Holanda e isso levou ao desenvolvimento de uma vacina utilizando um isolado do sorotipo Mass, conhecido pela letra “H”. As vacinas resultantes, conhecidas como H120 e H52, logo se tornaram amplamente utilizadas, sendo a H120, sem dúvida, a vacina mais utilizada no mundo até hoje (COOK et al., 2012).

A princípio a enfermidade causada pelo IBV foi descrita como exclusivamente respiratória, todavia uma doença foi relatada, na Austrália, no final da década de 40, causando uremia nas aves (DHAMA et al., 2014). A etiologia dessa doença foi elucidada em 1962, quando Cumming (1963) isolou uma estirpe de vírus a partir desse caso, denominando ela de “T” ou N1/62. Essa estirpe viral se tornaria o protótipo das estirpes nefropatogênicas do IBV.

Cumming (1963) também mostrou que os fatores que predisõem as aves aos danos renais incluem: linhagem genética, a fonte de proteína da dieta e fatores de estresse, especulou ainda, que a nefrite é uma condição que talvez todas as estirpes do IBV sejam capazes de induzir na presença dos fatores indutores. Essa teoria foi fundamentada na década de 70, quando pesquisadores comprovaram a morte de pintos, que foram acidentalmente expostos em estresse pelo frio, devido a danos renais gerados após infecção com um vírus não nefropatogênico do IBV (COOK et al., 2012).

Na década de 50, ficou bem esclarecido o papel negativo do IBV na produção e na qualidade dos ovos. Em 1950, nos Estados Unidos, Van Roekel e colaboradores publicaram um estudo de cerca de 10 anos sobre os efeitos do IBV sobre aves de postura. Nesse estudo foi constatado que a queda na produção de ovos provocada pelo IBV varia entre 2 e 70%, e que os ovos produzidos possuíam casca fraca, rachada, deformada e com albúmen aquoso (COOK et al., 2012). Além disso, nessa mesma década, o sorotipo Massachusetts do IBV começou a ser relatado em diferentes países e continentes, como no Brasil, no Egito e na Tailândia (HIPÓLITO, 1957; SHEBLE et al., 1986; EID, 1998; de WIT et al., 2011).

Entre 1960 e 1970, foram retomados os estudos sobre os efeitos do IBV no trato reprodutivo das aves. Pesquisas encontraram quantidades significativas de vírus no oviduto, após infecção das aves com o IBV, abrindo a questão de se o vírus era transmitido ou não pelo ovo. Pesquisadores encontraram evidências dessa transmissão quando o vírus foi isolado diretamente de pintos nascidos de galinhas infectadas. No entanto, dada a redução significativa no número de ovos por galinha infectada pelo IBV e por não existir relatos de surtos no campo relacionados a esse fenômeno, considera-se que seja um evento de pouca importância ou esporádico (COOK et al., 2012). Na década de 60, o IBV foi isolado no Japão, Taiwan, Nova Zelândia e Malásia (DOI et al., 1982; WANG; TSAI, 1996; HUANG, 2000; MASE et al., 2008; WANG; HUANG et al., 2004; WIT et al., 2011), fato que evidencia a rápida dispersão desse vírus por diferentes países.

No final da década de 60, pela primeira vez, foi demonstrado interesse no papel do trato gastrointestinal na patogênese do vírus. Diversos trabalhos na década de 1970 mencionaram a excreção do IBV pelas fezes, algumas vezes associada com aparente persistência do vírus em indivíduos no plantel infectado (COOK et al., 2012). A

significância da excreção e a sobrevivência do IBV nas fezes não foi totalmente esclarecido até o momento.

Entre o primeiro relato do IBV até o final da década de 60, os estudos estavam voltados, principalmente, para elucidar a patogênese do vírus, seus mecanismos de transmissão, as diferentes manifestações clínicas e no desenvolvimento de estratégias de controle. Entretanto, no início da década de 70, vários estudos foram publicados relatando o isolamento de novas variantes do IBV pelo mundo, entre as quais inclui estirpes dos Estados Unidos, Inglaterra, França, Bélgica, Itália, Polônia, Espanha, Brasil, Chile, Malásia e Rússia (de WIT et al., 2011).

À medida que o número de variantes identificadas nos EUA aumentava, na década de 70, algumas se mostraram amplamente distribuídas e, portanto, de grande importância econômica, como, por exemplo, as estirpes Florida, Clark 333 e Arkansas. Provavelmente, conforme Fields (1973), a estirpe mais significativa delas é a variante Arkansas (Ark), visto que essa variante continua sendo uma das mais predominantes nos EUA até hoje. Todavia, o interessante é que esta variante, mesmo aparecendo esporadicamente em outros países, ainda é considerada uma estirpe autóctone dos Estados Unidos e de baixa dispersão.

Na Europa surgiram as estirpes D207 (também conhecido como D274), D212 (conhecida como D1466), D3896 e D3128. Dados experimentais mostraram que as vacinas já existentes contra o IBV não produziam proteção suficiente contra as novas variantes que estavam aparecendo pelo mundo (de WIT et al., 2011; COOK et al., 2012; JACKWOOD, 2012; DHAMA et al., 2014).

Até o início dos anos 1970, a vacinação contra o IBV foi amplamente praticada e as vacinas vivas atenuadas, H120 e H52, foram universalmente utilizadas, exceto nos EUA, onde vacinas do tipo Massachusetts, com base na estirpe M41, foram

desenvolvidas. No entanto, a incapacidade dessas vacinas em proteger contra todas as novas variantes do IBV deu um impulso para o desenvolvimento de vacinas contra algumas dessas novas variantes. Além disso, percebeu-se que muitos dos novos vírus variantes identificados em aves comerciais desapareciam rapidamente. Portanto, o desafio na década de 70 foi decidir qual variante seria de importância suficiente para justificar o desenvolvimento de uma vacina específica. As vacinas desenvolvidas nos EUA nessa altura eram dos sorotipos Flórida, Arkansas e Massachusetts (COOK et al., 2012).

A década de 80 foi, sem dúvida, a década das novas variantes do IBV. Diferentes estirpes do IBV tornaram-se um grande problema em todos os continentes (de WIT et al., 2011; COOK et al., 2012; JACKWOOD, 2012; DHAMA et al., 2014). De acordo com Cook et al. (2012), na Europa, um grande número de variantes (com prefixo " D ") foram descritas associadas com a doença em plantéis vacinados. Por sua vez, na Austrália foi constatada uma mudança na predominância das estirpes nefropatogênicas para novas variantes causando manifestações clínicas respiratórias (COOK et al., 2012; JACKWOOD, 2012). Neste país, o IBV sempre evoluiu de forma independente devido ao seu isolamento geográfico e por não importar nenhum material genético desde 1985.

No final da década de 1980, pesquisadores evidenciaram que a incidência e a distribuição das variantes do IBV eram eventos complexos, pois alguns vírus, como o Mass, ocorriam em todo o mundo, o vírus Arkansas parecia estar restrito a determinadas regiões dos EUA, enquanto que outros, tais como o D274, foram encontrados na Europa, mas não nos EUA. Além disso, nos anos 80, percebeu-se que as vacinas vivas atenuadas não forneciam proteção adequada durante toda a vida das aves poedeiras e matrizes. Esta constatação levou ao desenvolvimento das primeiras vacinas inativadas associadas a adjuvantes oleosos contra o IBV (COOK et al., 2012).

Com o desenvolvimento de testes de diagnóstico baseados em dados moleculares, a partir de 1990, a identificação de uma nova variante do IBV tornou-se possível em poucos dias em vez de semanas. Consequentemente, novos genótipos foram rapidamente sendo identificados em todo o mundo, incluindo nos EUA, América do Sul, América Central, Europa, Austrália e, particularmente, na China, Japão, Taiwan e Coreia (COOK et al., 2012). Essa explosão de sequências de nucleotídeos do IBV foi, em grande parte, submetida ao *GenBank* (banco de dados online de nucleotídeos), possibilitando qualquer pesquisador comparar suas sequências com as de outros países. Logo, o aumento repentino no surgimento de novas variantes, provavelmente, é devido ao fato de a comunidade científica conseguir descrever muitos mais variantes em curto período de tempo.

Ao longo dos últimos 25 anos, muitas variantes do IBV têm surgido e desaparecido, mas poucas têm persistido na indústria avícola até os dias atuais e, algumas destas, têm grande importância devido a sua elevada capacidade de dispersão como, por exemplo, a estirpe 4/91 e a estirpe QX.

De acordo com Jackwood (2012), em 1991, um vírus peculiar, designado 793B ou 4/91 emergiu na Inglaterra e França e, rapidamente, se espalhou para várias partes do mundo, incluindo Europa Oriental, Rússia, Turquia, Oriente Médio, China, Japão, Marrocos e América do Sul, com exceção dos EUA. Esta variante é peculiar, pois sua patologia não é típica de outras infecções pelo IBV, visto que está associada com alta mortalidade em matrizes, e, possivelmente, miopatia muscular sobre condições de campo (COOK et al., 2012). Uma vacina com base na estirpe 4/91 foi desenvolvida na época e encontra-se comercialmente disponível em muitos países (JACKWOOD, 2012).

Por volta de 1996, um novo vírus foi identificado e descrito na China como pertencente ao tipo LX4. Esse vírus, denominado como QX, foi associado à traqueíte,

nefrite grave, perdas na produção de ovos e proventriculite. A morbidade era de 100% e a mortalidade era elevada devido à natureza nefropatogênica do vírus. A partir de 2001, vírus semelhantes ao QX foram relatados na Europa Oriental, nos Países Baixos, Europa Ocidental e em vários países da Ásia. Devido à sua alta patogenicidade e sua ampla disseminação, a variante QX é considerada a estirpe mais importante na Europa nos dias atuais (JACKWOOD, 2012).

Em 2002, o surto na China da síndrome respiratória aguda grave (SARS ou pneumonia Asiática), causada por um coronavírus que afeta humanos, foi significativa para os avanços nas pesquisas com o IBV, pois um grande número de laboratórios e consideráveis recursos foram, imediatamente, direcionados para a investigação dos coronavírus, o que inclui o IBV. Assim, como exposto por Cook et al. (2012), foram estudadas as características moleculares do vírus, os eventos de transcrição e replicação, a síntese de proteínas e sua estrutura, a montagem do vírion, taxas de mutação, recombinação, diversidade genética e epidemiologia.

Apesar dos muitos avanços no campo da biologia molecular e a maior compreensão do vírus, as vacinas contra o IBV ainda são produzidas por meio da tecnologia que tem sido empregada por mais de 60 anos; ou seja, a passagem do vírus em ovos embrionados para sua atenuação. Na última década, pesquisas utilizando biotecnologia visam o desenvolvimento de novas vacinas como a de subunidades, vacinas de DNA, vetoriais e recombinantes, porém poucos resultados existem na validação dessas vacinas no campo (de WIT et al., 2011; COOK et al., 2012; JACKWOOD, 2012; DHAMA et al., 2014).

3.4.2 Características estruturais e organização do genoma

IBV pertence à ordem *Nidovirales*, família *Coronaviridae*, subfamília *Coronavirinae* e ao gênero *Gammacoronavirus* e é o agente etiológico da bronquite infecciosa das galinhas (BIG). A família *Coronaviridae* é dividida em duas subfamílias *Coronavirinae* e *Torovirinae*. A subfamília *Coronavirinae* é subdividida nos gêneros *Alphacoronavirus*, *Betacoronavirus*, *Deltacoronavirus* e *Gammacoronavirus*, com base na análise genética dos domínios conservados da replicase pp1ab e nas proteínas estruturais de espícula (S), do envelope (E), da membrana (M) e do nucleocapsídeo (N) (ICTV, 2015; JACKWOOD et al., 2012). Os dois primeiros gêneros incluem coronavírus de mamíferos, enquanto que os gêneros *Deltacoronavirus* e *Gammacoronavirus* reúnem isolados de aves. O gênero *Gammacoronavirus* engloba o IBV e outros vírus geneticamente semelhantes como coronavírus dos perus (TCoV), coronavírus de faisões (pHCoV), coronavírus de gansos, coronavírus de marrecos, coronavírus de pombos e outros que ainda estão sendo estudados (CAVANAGH et al., 1994,1995; CAVANAGH, 2005, 2007).

IBV é um vírus de RNA fita simples, não segmentado, de polaridade positiva, com aproximadamente 120 nm de diâmetro envolto por um envelope lipoproteico provido de projeções, ou espículas, bem demarcadas e distribuídas por toda a superfície do vírion (BOURSNELL et al., 1987; CAVANAGH et al., 1997).

De acordo com Lai & Cavanagh (1997), o IBV foi o primeiro coronavírus a ser completamente sequenciado e o seu genoma é um dos maiores entre os vírus de RNA, com aproximadamente 27,6 Kb de comprimento. O genoma é estruturado em um conjunto de mRNAs subgenômicos de forma que cada um leve a tradução de uma ou mais sequências de leitura (*Open Reading Frame*, ORF).

Os genes do IBV se distribuem no genoma do vírus em seis diferentes mRNAs subgenômicos (mRNA1 – mRNA6), conforme Figura 3:

- **mRNA1**: Gene 1 codificador da RNA polimerase, ocupando 2/3 de todo genoma viral e com duas ORFs sobrepostas (ORF1a e ORF1ab);
- **mRNA2**: Gene codificador da glicoproteína S;
- **mRNA3**: Gene 3 que é constituído por três ORFs, as quais codificam pequenas proteínas não estruturais 3a, 3b e uma proteína estrutural, a 3c, também chamada de proteína E;
- **mRNA4**: Gene codificador da glicoproteína M;
- **mRNA5**: Gene 5 que é a região codificadora de duas proteínas não estruturais, 5a e 5b;
- **mRNA6**: Gene codificador da nucleoproteína N.

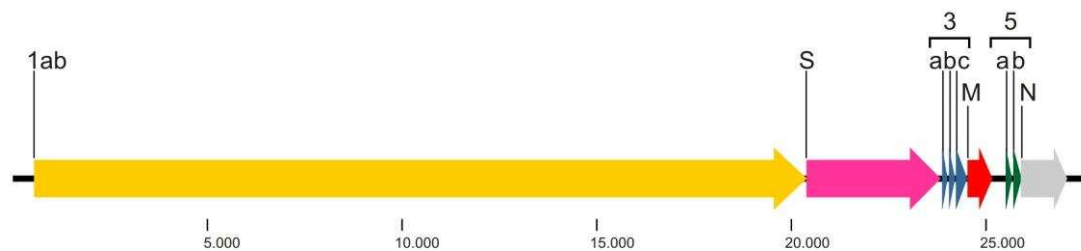


Figura 3: No Sentido 5'-3', esquema da organização do genoma do IBV. Fonte: Figura elaborada pela autora.

Junto a cada uma das extremidades 5' e 3' encontram-se duas regiões não traduzidas (*Untranslated region- UTR*), com cerca de 500 nucleotídeos cada uma delas. Essas UTRs desempenham um papel chave na transcrição e replicação do RNA viral. Além disso, as ORFs 1a e 1ab codificam poliproteínas que são pós-traducionalmente clivadas em 15 proteínas não estruturais (nsp2 a nsp16) por duas proteases virais, uma protease papaína-like (PLP) e uma protease 3C-like (JACKWOOD et al., 2012). As proteínas não estruturais estão associadas a replicação e transcrição do RNA do vírus (LAI; CAVANAGH, 1997; CAVANAGH, 2007; MONTASSIER, 2008).

O IBV codifica quatro proteínas estruturais denominadas: glicoproteína de espícula (S), glicoproteína integral de membrana (M), proteína pequena de membrana (E) e a proteína fosforilada do nucleocapsídeo (N). O envelope viral é formado por uma camada dupla de lipídeos composto por três proteínas estruturais (M, E, S), resultando no aspecto de uma coroa (do latim *corona*), como pontua Cavanagh (2007).

O autor supracitado acrescenta que a principal proteína estrutural de envelope dos coronavírus é a proteína de espícula S. Esta proteína forma projeções de cerca de 20 nm de comprimento e é a proteína mais polimórfica entre os coronavírus, podendo ser organizada como dímeros ou trímeros. A poliproteína S possui duas funções bem conhecidas que são a de fixar e ativar a fusão do envelope viral com a membrana da célula do hospedeiro, o que contribui para a liberação do genoma viral para o interior da célula.

A poliproteína S tem cerca de 1160 aminoácidos (176 KDa) e é clivada pós-tradução em duas subunidades: amino-terminal S1 e carboxi-terminal S2, com cerca de 500 e 600 aminoácidos cada uma delas, respectivamente. A proteína S é ancorada pela porção carboxi-terminal da subunidade S2 no envelope viral através de um pequeno segmento transmembrana hidrofóbico, formando o suporte da espícula, enquanto a subunidade S1 é globular e forma a parte do bulbo presente no ectodomínio dessa proteína (KANT et al., 1992; CAVANAGH, 2007).

Além das características anteriormente mencionadas, a subunidade S1 contém os principais epítomos que são alvo para a combinação com anticorpos neutralizantes, os quais são constituídos por determinadas sequências de aminoácidos que conferem a especificidade de sorotipo a cada estirpe do IBV (CAVANAGH, 1995; LAI;CAVANAGH, 1997; MONTASSIER, 2008). Comparando as sequências de aminoácidos do gene S1 de diferentes sorotipos, determinados por testes de

neutralização, a maioria varia em torno de 20 a 25%, podendo chegar até a 50% de variação entre um sorotipo e outro. Entretanto, como observa Cavanagh (2007), diferenças de 2 a 3 % de resíduos de aminoácidos (10 a 15 resíduos) também podem resultar em uma mudança de sorotipo, o que contribui para a diminuição da proteção cruzada.

Outra característica da glicoproteína S1 é que ela possui determinadas sequências de aminoácidos em sua estrutura que apresentam grande variabilidade. Tais sequências são denominadas: região hipervariável 1 (HVR I), delimitada pelos resíduos de aminoácidos 38 a 69; região hipervariável 2 (HVR II), delimitada pelos resíduos de aminoácidos 91 a 141; e a região hipervariável 3 (HVR III) que compreende do resíduo de aminoácido 250 ao 387 (ALVARADO et al., 2005). Estudos têm demonstrado a importância dessas três regiões hipervariáveis na interação direta com anticorpos neutralizantes e, por conseguinte, constituem os determinantes sorotipo-específicos apresentados pelas diversas estirpes do vírus da bronquite infecciosa das galinhas (CAVANAGH et al., 1988; MOORE et al. 1998; CAVANAGH, 2007).

Intimamente associada ao RNA viral está a proteína do nucleocapsídeo (N), com aproximadamente 400 aminoácidos. A proteína N liga-se ao genoma viral desempenhando um papel importante na replicação e na montagem do vírus e, devido à sua função intrínseca, acumula menos eventos de mutação comparativamente a proteína S (CAVANAGH, 2007; MONTASSIER, 2008; JACKWOOD et al., 2012). Além disso, a proteína N está envolvida na indução de respostas imunes cito-mediadas, uma vez que contem em sua estrutura epítomos para a interação com células T citotóxicas específicas, as quais contribuem decisivamente para a restrição da disseminação da infecção pelo IBV dentro do hospedeiro (SEO, et al., 1997; SEAH et al., 2000; MONTASSIER, 2008).

Além das proteínas estruturais S e N, todos os coronavírus têm um grande número de cópias de uma proteína pequena integral de membrana, a proteína M (cerca de 230 aminoácidos) e pequenas quantidades de uma proteína muito pequena, associada à membrana e não glicosilada, a proteína E (cerca de 100 aminoácidos). Ambas as proteínas são necessárias para a formação de novas partículas virais (CAVANAGH, 2007).

Intercalados entre os genes estruturais, existem dois genes não estruturais chamados 3 e 5. O Gene 3 tem três ORFs, que codificam as proteínas 3a, 3b e 3c, onde 3C é a proteína E. O Gene 5 codifica duas proteínas, 5a e 5b. Estes pequenos genes codificam proteínas não estruturais, cuja função é desconhecida, porém já se sabe que eles não são importantes para a replicação viral (CAVANAGH, 2007).

3.4.3 Replicação e patogênese

IBV infecta, primariamente, o trato respiratório superior das aves, sendo considerado um vírus epiteliotrópico. Além de afetar o tecido epitelial respiratório, causando tosse, espirros e estertores traqueais, IBV é replicado em outras células epiteliais, incluindo células dos rins, causando nefrite intersticial; do oviduto, prejudicando a produção de ovos e sua qualidade; dos testículos, podendo levar a infertilidade e do trato gastrointestinal (esôfago, proventrículo, duodeno, jejuno, bolsa de Fabricius, tonsilas cecais, reto e cloaca) (CAVANAGH, 2007; JACKWOOD et al., 2012). A replicação no tecido entérico não resulta, normalmente, em doença clínica, mas pode levar a excreção do vírus pelas fezes (CAVANAGH, 2007).

Após um curto período de incubação, entre 18 a 36 horas, IBV é replicado nas células ciladas e secretoras de muco das narinas e traqueia (DHINAKAR; JONES,

1997). Para dar início a sua replicação, o vírus adere e funde-se através da subunidade S1 da proteína S aos receptores específicos da membrana citoplasmática das células alvo e, após sua penetração no citoplasma, o ciclo de replicação do vírus ocorre inteiramente neste compartimento celular.

No processo de replicação, o RNA viral, que possui o mesmo sentido que o RNA mensageiro celular (RNA senso positivo), pode ser traduzido imediatamente após infecção da célula alvo. Logo, o RNA viral se liga imediatamente aos ribossomos para sintetizar a enzima RNA polimerase, a qual fará a transcrição do RNA do vírus em uma fita negativa complementar. Esta fita negativa de RNA complementar serve como molde para a síntese de um novo RNA do vírus e dos RNAs mensageiros subgenômicos (mRNAs). Os mRNAs subgenômicos são produzidos por um mecanismo de transcrição descontínua (leader-priming), os quais passam a funcionar como replicons, podendo gerar genomas recombinantes. A produção desses mRNAs constitui uma das características marcantes da família *Coronaviridae* (LAI; CAVANAGH, 1997).

O título infectante viral atinge valores máximos nas mucosas do nariz e da traqueia aos três dias pós-infecção e permanece por mais dois a cinco dias (AMBALI; JONES, 1990; HOFSTAD; YODER, 1996). Títulos semelhantes ocorrem nos pulmões e sacos aéreos. Após a infecção de tecidos e órgãos do aparelho respiratório (incluindo narinas, traqueia, pulmões e sacos aéreos), o IBV segue para uma fase de viremia, possibilitando a sua distribuição para outros tecidos do hospedeiro. A infecção é comumente seguida por infecção bacteriana secundária, que pode levar a quadros clínicos mais severos da doença, incluindo casos com elevada mortalidade (VANDEKERCHOVE et al., 2004).

Curiosamente, o IBV pode estabelecer infecções persistentes em galinhas. Em experimentos envolvendo a inoculação de pintos, após a fase aguda da doença, o vírus

não foi mais excretado. No entanto, a excreção do vírus retornou quando a fase de produção de ovos iniciou, com aproximadamente 19 semanas de idade, provavelmente, pois o início da postura mostrou-se como um fator estressante para as aves, o que possibilitou novamente a excreção do vírus (JONES; AMBALI, 1987; CAVANAGH, 2007).

3.4.4 Transmissão e sinais clínicos

Após a replicação inicial do IBV no trato respiratório, o vírus pode ser excretado por um período superior a quatro semanas via secreção nasal e conjuntival. As fezes também se caracterizam como uma fonte de transmissão do agente, sendo que o vírus já foi isolado de fezes 20 semanas após a infecção (KING; CAVANAGH, 1991). A transmissão pelo ovo pode ser descartada, uma vez que, embora possam existir altos títulos virais no oviduto após a infecção pelo IBV, não há relato desse fenômeno sendo responsável por novos surtos a campo (COOK et al., 2012).

A transmissão do IBV de aves infectadas para aves susceptíveis pode se dar de forma direta, pelo contato da ave susceptível com secreções contaminadas, ou de forma indireta, através do contato com pessoas, equipamentos e objetos contaminados. Em geral, os animais infectados podem transmitir o vírus por até dois meses após a infecção inicial (KING; CAVANAGH, 1991; DI FÁBIO, 1993; ROSSINI; MONTEIRO, 2004).

A respeito da estreita associação do IBV com aves da espécie *Gallus gallus*, tem sido cada vez maior o número de notificações sobre o isolamento de coronavírus geneticamente similares ao IBV, em outras espécies de aves, galiformes ou não. Dessa forma, de acordo com o *International Committee on Taxonomy of Viruses* (ICTV, 2015), já estão caracterizadas novas espécies dentro do gênero *Gammacoronavirus*,

geneticamente similares ao IBV, isoladas de perus (*Turkey coronavirus*), de faisões (*Pheasant coronavirus*), de patos (*Duck coronavirus*), de gansos (*Goose coronavirus*) e de pombos (*Pigeon coronavirus*). Além disso, Ito e colaboradores (1991) isolaram um coronavírus com características antigênicas muito similares as do IBV, obtido a partir de amostras de galinhas de angola criadas no Brasil que apresentavam enterite e alta mortalidade.

Mesmo com o crescente relato do IBV ou de vírus semelhantes ao IBV em aves selvagens, não há comprovação de nenhuma ave selvagem que possa ser reservatório do IBV, e que, portanto, poderia transmitir o IBV através de longas distâncias, tal como ocorre com o vírus da influenza aviária e as aves aquáticas migratórias. Logo, é possível suspeitar que a dispersão do IBV, entre diferentes países e continentes, é altamente influenciada por fatores não virais como o comércio legal ou ilegal de aves vivas e vacinas vivas atenuadas.

As aves acometidas pelo vírus da bronquite infecciosa das galinhas podem apresentar sinais clínicos respiratórios como, tosse, espirros, estertores traqueais, descargas nasais, lacrimejamento, edema de barbela, sinusite e conjuntivite; sinais renais como incremento no consumo de água, fezes aquosas e urolitíase (formação de cálculos renais) e sinais reprodutivos como queda severa na produção de ovos, deterioração da casca, ovos com baixa qualidade (clara muito aquosa ou em quantidade reduzida) e queda na fertilidade de machos reprodutores (DI FÁBIO; VILLARREAL, 2009). A replicação no tecido entérico não resulta, normalmente, em doença clínica, mas leva a excreção do vírus nas fezes (CAVANAGH, 2007).

3.4.5 Diagnóstico, prevenção e controle

Apesar de transcorridos mais de 80 anos desde a primeira descrição do IBV, a doença continua a ser um dos principais agravos para a avicultura industrial em várias partes do mundo. A variabilidade antigênica do vírus, juntamente com os diferentes tropismos demonstrados pelas estirpes virais dificultam o diagnóstico e controle da infecção (VILLEGAS, 1997).

O primeiro passo para o desenvolvimento de um programa de controle efetivo para a bronquite infecciosa das galinhas (BIG) inclui a correta identificação e caracterização do agente etiológico. A adoção de métodos rápidos, específicos e sensíveis de detecção e classificação de estirpes virais tem sido recomendada por muitos pesquisadores, dentre estes métodos pode-se incluir o uso de anticorpos monoclonais e técnicas moleculares (WENTZ, 1992; DI FÁBIO, 1993; FALCONE et al., 1997; CARDOZO, 1998; COOK, 1999; HOERR, 1999; ROCHA, 2000; SOUZA et al., 2001; RESENDE, 2003; DI FÁBIO, 2004) citado por Pena et al. (2005).

Na avicultura industrial mundial, as medidas de controle que têm sido mais amplamente adotadas baseiam-se na combinação de medidas de biossegurança (isolamento, higiene, lotes com idade única, controle de trânsito de veículos e pessoas e vazio sanitário) e programas de vacinação desenvolvidos de acordo com a necessidade de cada região ou país (VILLEGAS, 1997; HOERR et al., 1999; RESENDE, 2003; BERNARDINO, 2004).

As vacinas vivas do IBV são fabricadas a partir do vírus vivo, porém atenuado por meio de múltiplas e seriadas passagens em ovos embrionados de galinha, podendo ou não ser clonados em cultivo primário de células de embrião de galinha. Já as vacinas inativadas contêm o vírus inativado com agente químico e acrescidas de adjuvantes (emulsões oleosas). De acordo com Cavanagh (2007), as vacinas inativadas oleosas contra o IBV, desenvolvidas durante a década de 80, tinham como principal objetivo

alcançar uma imunidade duradoura nas aves de vida longa, já que a proteção conferida pelas vacinas vivas é de curta duração, até nove semanas após vacinação.

Não obstante, a prática comum é vacinar galinhas de vida longa (matrizes e galinhas de postura), durante os períodos de cria e recria (até aproximadamente 18-20 semanas de vida), contemplando a administração de vacinas vivas seguidas de vacina inativada antes da fase de produção. A vacinação durante a fase de produção é uma prática adotada por várias empresas em todo o mundo (VILLEGAS, 1997; RESENDE, 2003). Em aves de vida curta (frangos de corte), a vacinação no primeiro dia de vida por meio de aerossol é uma prática estabelecida por várias empresas. A necessidade de revacinação deve ser analisada cuidadosamente e deve ser feita se a área estiver passando por um alto desafio pelo IBV (VILLEGAS, 1997; CAVANAGH, 2007).

Comparado a outros coronavírus, múltiplos sorotipos e variantes do IBV continuam emergindo. Esse padrão de evolução parece ser único ao IBV e, por isso, o diagnóstico e controle de IBV é extremamente desafiador. Como somente alguns tipos de vacinas, e, em muitos países, apenas um sorotipo (tipo Mass) pode ser usado, vírus variantes persistem e surtos continuam a ocorrer (JACKWOOD et al., 2005, 2009, 2012).

No Brasil, a vacinação contra a BIG tem sido feita desde 1980 e o único sorotipo liberado pelo Ministério da Agricultura e Abastecimento (MAPA), conforme Portaria Ministerial número 24/80, de 17 de janeiro de 1980, é o sorotipo Massachusetts. Dentre as estirpes permitidas para entrarem na composição de vacinas vivas atenuadas, pertencentes ao sorotipo Massachusetts, são a H120, a H90 e a H52, ou, alternativamente, estirpes naturalmente apatogênicas e clonadas, como a Ma5. Tem-se demonstrado que as vacinas contra BIG preparadas com estirpes pertencentes ao sorotipo Massachusetts proporcionam um amplo espectro antigênico. Por essa razão, como ressalta Villegas (1997), a maioria dos programas vacinais inclui esse sorotipo

como base principal. Entretanto, apesar da vacinação cuidadosa, existem situações em que as vacinas licenciadas existentes podem não proporcionar proteção adequada contra desafios de novas variantes virais.

É importante ressaltar que alguns países, em seu programa nacional de vacinação, permitem a fabricação e uso de vacinas vivas atenuadas com diferentes sorotipos, tais como Massachusetts, Connecticut, Arkansas, 4/91 (793/B), dentre outros, o que pode levar a um processo de recombinação entre esses diferentes sorotipos vacinais, ou até mesmo de seus genomas com outros IBVs circulantes no campo, contribuindo assim, para a emergência de novas estirpes variantes do IBV (CAVANAGH; NAQI, 2003; MONTASSIER, 2008).

Para diferenciar e caracterizar as estirpes virais do IBV foi proposto um sistema de classificação baseada na abordagem de procedimentos/análises. As análises podem ser funcionais, as quais procuram avaliar importantes propriedades e funções biológicas de uma estirpe, ou podem ser não-funcionais, que buscam investigar e caracterizar o genoma viral. A classificação realizada através de análises funcionais resulta na identificação de diferentes patotipos, protectotipos e sorotipos do IBV. Já as análises não-funcionais resultam em uma classificação de genótipos virais (De WIT, 2000; CAVANAGH, 2005).

Quando as estirpes do IBV são agrupadas em protectotipos, são obtidos dados a respeito da eficiência de uma determinada formulação vacinal desse mesmo vírus e também se consegue determinar qual é a estirpe com melhor capacidade de induzir proteção cruzada. O patotipo é definido pelo tropismo de uma estirpe do IBV por um tipo particular de células ou tecidos e pelas lesões predominantes que são induzidas pelo vírus no hospedeiro (MONTASSIER, 2008).

Alguns dos métodos utilizados para o diagnóstico e caracterização do IBV, incluem a passagem em ovo embrionado e observação de nanismo e enrolamento do embrião; soroneutralização após isolamento do vírus em ovo embrionado; estudos de imunização cruzada para definir o prototipo; reações de imunofluorescência; imunodifusão em gel de ágar e ensaios imunoenzimáticos (de WIT, 2000; CANAVAGH; NAQI, 2003; DHAMA et al., 2014). Todavia, todos esses procedimentos acima descritos são onerosos e demandam muito tempo, o que gera a necessidade do desenvolvimento de métodos de diagnóstico mais rápidos e baratos para a identificação precisa dos isolados virais.

Para fazer frente a essas dificuldades, os métodos de biologia molecular têm sido desenvolvidos e aprimorados, servindo, em síntese, para fazer o diagnóstico direto e, ou, genotipagem do IBV. Dentre esses métodos, destacam-se a reação da transcriptase reversa seguida da reação em cadeia da polimerase (RT-PCR), a análise de fragmentos genômicos gerados por enzimas de restrição (RFLP) e também o sequenciamento genético.

3.4.6 Evolução e diversidade

A maioria das doenças infecciosas emergentes é causada por vírus de RNA. Uma significativa taxa de mutação, eventos de recombinação, tempo de geração curto e geração de uma grande progênie são fatores que conduzem a uma rápida evolução do IBV e, conseqüentemente, a uma grande diversidade genética e antigênica (JACKWOOD et al., 2012; TORO et al., 2012). Todavia, conforme Toro et al. (2012), o mecanismo de evolução do IBV não depende somente da geração de diversidade genética, mas também do processo de seleção natural que ocorre dentro do hospedeiro,

em concordância com os postulados de Charles Darwin de 1859. Evidências sugerem que vários fatores dentro do hospedeiro, incluindo a resposta imune, afinidade com os receptores celulares, bem como as condições físicas e bioquímicas de cada tecido, são responsáveis pelo processo de seleção do IBV.

As taxas evolutivas do IBV são tão rápidas que, mesmo vacinas vivas atenuadas, passam por seleção e mutação depois de uma única passagem no hospedeiro. Um estudo comparou o vírus original da vacina e o vírus re-isolado após vacinação das aves e descobriu que há seleção de subpopulações e que mutações ocorreram no gene S (MCKINLEY et al., 2011). Outro estudo descobriu distintas subpopulações virais que foram selecionadas quando as aves foram vacinadas com a estirpe Ark-DPI (VAN SANTEN; TORO, 2008). Uma análise posterior constatou que as subpopulações do vírus eram diferentes no microambiente de diferentes tecidos no hospedeiro (GALLARDO et al., 2010). Estes dados sugerem que os microambientes de diferentes tecidos do hospedeiro exercem diferentes pressões de seleção durante a replicação do IBV.

A diversidade genética é definida como uma medida de todos os genótipos encontrados em uma população, bem como a frequência desses genótipos. A diversidade é criada por mutações, que incluem eventos de substituição, inserção e deleção e por eventos de recombinação que ocorrem quando o genoma viral é replicado. Mutações são causadas, principalmente, pela alta taxa de erro e limitada capacidade de correção da RNA polimerase (JACKWOOD et al., 2012).

A recombinação ocorre se uma célula é infectada por duas estirpes distintas do IBV, gerando uma progênie com sequências derivadas de ambas as estirpes parentais. Regiões do genoma viral com maior incidência de eventos de recombinação foram relatados para o IBV no gene da glicoproteína S, bem como em nsp 2, nsp 3, e nsp 16

(HAGEMEIJER et al., 2010; THOR et al., 2011). Pelo fato do gene S estar envolvido na ligação do vírus com a célula hospedeira e por conter epítomos neutralizantes, eventos de mutação ou recombinação no gene S podem resultar no aparecimento de novos sorotipos do IBV, aumentando, assim, sua diversidade antigênica (JACKWOOD et al., 2012).

Outra característica da evolução dos coronavírus, inclusive o IBV, é o fenômeno de *quasispecies*. Este fenômeno está relacionado com a geração de uma ampla progênie durante a replicação desses vírus, resultando em um processo seletivo no qual o resultado não é a seleção de um genótipo único, mas sim de uma população heterogênea de variantes geradas por erros na replicação de uma estirpe parental. Todo esse processo pode levar a formação de um conjunto de genomas, sendo que um deles pode conter as mutações necessárias para promover o escape do sistema imune do hospedeiro (BARIC et al., 1997; ROTTIER, 1999; MOYA et al., 2000). Por outro lado, o processo de formação de *quasispecies* nos coronavírus possuem algumas limitações, como, por exemplo, o fato desse fenômeno exigir que o vírus tenha uma alta taxa de mutação, porém os coronavírus possuem um domínio de exoribonuclease associado à RNA polimerase que reduz as taxas de erro dessa proteína (TORO et al., 2012).

Com exceção do SARS-CoV (coronavírus humano), os coronavírus, incluindo o IBV, possuem poucos estudos a respeito de sua evolução e dinâmica populacional (JACKWOOD et al., 2012). As abordagens filogenéticas e filogeográficas tornaram-se estratégias importantes para estudar a epidemiologia de patógenos para os quais sequências moleculares estão disponíveis, uma vez que estas abordagens podem elucidar a evolução, estabelecer o padrão de dispersão em um contexto histórico geográfico e ajudar no desenvolvimento de estratégias efetivas para o controle de agentes infecciosos (VIDIGAL et al., 2012).

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVARADO, I. R. P.; VILLEGAS, N. M.; JACKWOOD, M. W. Molecular Characterization of Avian Infectious Bronchitis Virus Strains Isolated in Colombia During 2003. **Avian Diseases**, v. 49, n.4, p. 494-499, 2005.

ALVES, J. M. S. **Análise de Patentes a Indústria Avícola Internacional**. 2003. 133f. Dissertação (Mestrado em Agronegócio), Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2003.

AMBALI, A. G.; JONES, R. C. Early pathogenesis in chicks of infection with an enterotropic strain of infectious bronchitis virus. **Avian Dis.**, v.34, p.809–817, 1990.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE PROTEÍNA ANIMAL – ABPA. **Relatório Anual 2014**. São Paulo, 2014, p.55. Disponível em: <<http://www.ubabef.com.br/files/publicacoes/8ca705e70f0cb110ae3aed67d29c8842.pdf>>. Acesso em: maio de 2015.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE PROTEÍNA ANIMAL – ABPA (2015). **A Avicultura Brasileira**. Disponível em: <<http://www.ubabef.com.br/>>. Acesso em: maio de 2015.

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

BERNARDINO, A. Programas de vacinação. In: MENDES, A.A; NAAS, I.A.; MACARI, M. (Eds.). **Produção de frangos de corte**. Campinas: FACTA, 2004, p.179-199.

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

BRASIL. Instrução Normativa nº 46, de 2 de setembro de 2008. Dispõe sobre os procedimentos para importação de material genético destinado à reposição de plantéis avícolas e os requisitos zoossanitários para importação de ovos incubáveis e aves de um dia. **Diário Oficial da União**, Brasília, 2008, p. 3-4.

CARDOZO, R.M. **Produção e caracterização de anticorpos monoclonais contra o vírus da bronquite infecciosa das galinhas**. 1998. 69f. Tese (Doutorado) - Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 1998.

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, p. 141–150, 1988.

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

CAVANAGH D. Coronaviruses Surface glycoprotein. In: Cavanagh, D. (E.d). **The Coronaviridae**. New York: Plenum, 1995, p. 73-133.

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

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

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

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

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

COOK, J. K. A. Diagnostico de la bronchitis infecciosa. In: **Congreso latino americano de avicultura**. Lima. Anais...1999, p.25-27.

COOK, J.K.A; SARAH, J.O.; MARTYN, A.W.; MICHAEL, B.H. Breadth of protection of the respiratory tract provided by different live-attenuated infectious bronchitis viruses of heterologous serotypes. **Avian Pathology**, v.28, p.477-485, 1999.

COOK, J. K. A.; JACKWOOD, M. W.; JONES, R. C. The long view: 40 years of infectious bronchitis research. **Avian Pathology**, v.41, p. 239-250, 2012.

COMTRADE – **United Nations Comtrade Database**. Disponível em: <<http://comtrade.un.org/>>. Acesso em: maio de 2015.

CUMMING, R.B. Infectious avian nephrosis (uraemia) in Australia. **Australian Journal Veterinary**, v. 39, p. 145-147, 1963.

de WIT J.J. Detection of infectious bronchitis virus. **Avian Pathol.**, v.29, p.71–93, 2000.

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

DI FÁBIO, J. Aspectos clínicos e controle da BIG no Brasil. In: **Conferência Apinco de Ciência e Tecnologia Avícolas**. Santos. Anais...1993, p.1-8.

DI FÁBIO, J. Classificação viral x variantes brasileiras. **Ave world**, v.2, n.12, p.20-25, 2004.

DI FÁBIO, J.; VILLARREAL, L. Y. B. Bronquite Infecciosa das Galinhas. In: BERCHIERI, JR. A.; SILVA, E. N.; DI FÁBIO, J.; SESTI, L.; ZUANAZE, M. A. F. **Doença das aves**. 2. Ed. Campinas: FACTA, 2009, p. 631-648.

DHAMA, K.; SINGH, S. D.; BARATHIDASAN, R.; DESINGU, P.A.; CHAKRABORTY, S.; TIWARI, R.; KUMAR, M. A. Emergence of Avian Infectious bronchitis virus and its variants need better diagnosis, prevention and control strategies: a global perspective. **Pakistan Journal of Biological Sciences**, v.17, p. 751-767, 2014.

DHINAKER R. G.; JONES R.C. Infectious bronchitis virus: immunopathogenesis of infection in the chicken. **Avian Pathol.**, v.26, p. 677–706, 1997.

DOI, M.; YAMAKAMI, T.; KOIMARU, H.; YOSHIMURA, M.; MASU, S.; SHIRAI, J.; KAWAMURA, H. Serotypes of avian infectious bronchitis virus isolates from field cases in Japan. **Avian Diseases**, v. 26, p. 946-956, 1982.

EID, A.A.M. Infectious bronchitis virus infection in Egypt. In: E.F. Kaleta & U. Heffels-Redmann (Eds.). **International Symposium on Infectious Bronchitis and Pneumovirus Infections in Poultry**, Germany, 1998, p. 145-156.

FALCONE, E.; D'AMORE, E.; TRANI, D.L.; SILI, A.; TOLLIS, M. Rapid diagnosis of avian infectious bronchitis virus by the polymerase chain reaction. **Journal of Virological Methods**, v.64, n.2, p.125-130, 1997.

FAOSTAT - **The Statistics Division of Food and Agriculture Organization of the United Nations**. Disponível em: <<http://faostat3.fao.org/home/E>>. Acesso em: maio de 2015.

FIELDS, D.B. Arkansas 99, a new infectious bronchitis serotype. **Avian Diseases**, v.17, p. 659-661, 1973.

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

HAGEMEIJER, M.C.; VERHEIJE, M.H.; ULASLI, M.; SHALTIEL, I.A.; DE VRIES, L.A.; REGGIORI, F.; ROTTIER, P.J.; DE HAAN, C.A. Dynamics of coronavirus replication–transcription complexes. **J. Virol.**, v. 84, p. 2134–2149, 2010.

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

HOERR, F. J. Aspectos clínicos y programa de prevención em bronquitis infecciosa. In: **Congreso latino americano de avicultura**. Lima. Anais...1999, p. 47-51.

HOFSTAD, M. S.; YODER, H. W. JR. Avian infectious bronchitis – virus distribution in tissues of chicks. **Avian Dis.**, v.10, p.230– 239, 1996.

HUANG, Y.P.; LEE, H.C.; CHENG, M.C.; WANG, C.H. S1 and N gene analysis of avian infectious bronchitis viruses in Taiwan. **Avian Diseases**, v. 48, p. 581-589, 2004.

INTERNATIONAL COMMITTEE ON TAXONOMY OF VIRUSES (ICTV). **Virus Taxonomy: 2015 Release**. Disponível em: < <http://ictvonline.org/virustaxonomy.asp>>. Acesso em: Maio de 2015.

JACKWOOD, M.W.; HILT, D.A.; LEE, C.W.; KWON, H.M.; CALLISON, S.A.; MOORE, K.M. Data from 11 years of molecular typing infectious bronchitis virus field isolates. **Avian Diseases**, v. 49, p. 614-618, 2005.

JACKWOOD, M.W.; HILT, D.A.; MCCALL, A.W.; POLIZZI, C.N.; MCKINLEY, E.T.; WILLIAMS, S.M. Infectious bronchitis virus field vaccination coverage and persistence of Arkansas-type viruses in commercial broilers. **Avian Diseases**, v. 53, p. 175-183, 2009.

JACKWOOD, M. W. Review of Infectious Bronchitis Virus Around the World. **Avian Diseases**, v.56, p. 634-641, 2012.

JACKWOOD, M.W.; HALL, D.; HANDEL, A. Molecular evolution and emergence of avian gammacoronaviruses. **Infection, Genetics and Evolution**, v.12, p. 1305–1311, 2012.

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

JONES, R.C.; 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.617–620, 1987.

JUNGHER, E.L., CHOMIAK, T.W.; LUGINBUHL, R.E. Immunologic differences in strains of infectious bronchitis virus. In: **Proceedings of 60th Annual Meeting of the United States Livestock Sanitary Association**. Chicago. Anais...1956, p. 203-209.

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 neutralising monoclonal antibodies on the S1 avian infectious bronchitis virus glycopolypeptide. **J. Gen. Virol.**, v. 73, p. 591–596, 1992.

KING, D. J.; CAVANAGH, D. Infectious Bronchitis. In: CALNEK, B.W.; BARNES, H.J.; BEARD, C.W.; REID, W.M.; YODER JUNIOR, H.W. (Eds.). **Diseases of poultry**. 9.ed. Ames: Iowa State University Press, 1991, p.471-484.

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

LIMA, J. F.; SIQUEIRA, S. H. G.; ARAÚJO, D. V.; PEREIRA, A. P. G.; FILHO, G. A. S.; MIRANDA, H. AVICULTURA – **Relatório Setorial BNDES**. p.42, 1995.

Disponível

em:

<

http://www.bndes.gov.br/SiteBNDES/export/sites/default/bndes_pt/Galerias/Arquivos/conhecimento/relato/rsfrango.pdf> Acesso em: Abril de 2015.

MASE, M.; INOUE, T.; YAMAGUCHI, S.; IMADA, T. Existence of avian infectious bronchitis virus with a European-prevalent 4/91 genotype in Japan. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 70, p. 1341-1344, 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, p.225–234, 2011.

MIELE, M.; GIROTTO, A. F. **Análise da Situação Atual e Perspectivas da Avicultura de Corte – EMBRAPA Suínos e Aves**. Concórdia, 2006, p.8. Disponível em: http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/Repositorio/análise_situacao_atual_perspectivas_avicultura_de_corte_000fzpf3ufi02wx5ok0cpoo6a551x8he.pdf>. Acesso em: maio de 2015.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO – MAPA. **Projeções do Agronegócio 2013/14 a 2023/24**. Brasília, 2014, p.100. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br>>. Acesso em: maio de 2015.

MONTASSIER, Maria de Fatima Silva. **Diversidade genética de amostras brasileiras do vírus da bronquite infecciosa determinada pelo sequenciamento de nucleotídeos dos genes N e S1**. 2008. 100f. Tese (Doutorado em Microbiologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

MOORE, K. M.; BENNETT, J. D.; SEAL, B. S.; JACKWOOD, M. W. Sequence comparison of avian infectious bronchitis virus S1 glycoproteins of the Florida serotype and five variant isolates from Georgia and California. **Virus Genes**, v.17, n1, p. 63-83, 1998.

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

PENA, L.J.; SANTOS, B.M.; ROBERTI, R.P.; MARIN, S.Y. Bronquite infecciosa das galinhas. **Arq. Inst. Biol.**, v.72, n.3, p.397-404, 2005.

RESENDE, J. S. **Genotipificação e filogenia de isolados de vírus oriundos de surtos de bronquite infecciosa das galinhas na avicultura industrial do Estado de Minas Gerais, Brasil, no período entre 1972 e 1989. 2003.** 163f. Tese (Doutorado) - Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2003.

ROCHA, F. R. T. **Produção e caracterização de anticorpos monoclonais contra a glicoproteína S1 do vírus da bronquite infecciosa das galinhas.** 2000. 61f. Dissertação (Mestrado) - Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2000.

RODRIGUES, W. O. P.; GARCIA, R. G.; NÄÄS, I. A.; ROSA, C. O.; CALDARELLI, C.E. Evolução da Avicultura de Corte do Brasil. **ENCICLOPÉDIA BIOSFERA, Centro Científico Conhecer - Goiânia**, v.10, n.18, p.1666-1684, 2014.

ROSSINI, L.I.; MONTEIRO, M.C.B. Problemas respiratórios em frangos de corte. In: MENDES, A.A; NAAS, I.A.; MACARI, M.(Eds.). **Produção de frangos de corte**. Campinas: FACTA, 2004, p.269-270.

ROTTIER, P. J. M. The molecular dynamics of feline coronavirus. **Vet Microbiol.**, v.69, p. 117-125, 1999.

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

SEAH, J. N.; YU, J.; KWANG, J. Localization of linear B-cell epitopes on infectious bronchitis virus nucleocapsid protein. **Veterinary Microbiology**, v.75, p. 11-16, 2000.

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

SHEBLE, A.; SABRY, M.Z.; DAVELAAR, F.G.; BURGER, A.G.; KHAFAGY, A.R.; MOUSTAFA, M.M.; HENNA, M. Present status of infectious bronchitis in Egypt. **Journal of the Egyptian Veterinary Medical Association**, v.46, p. 393-411, 1986.

SOUZA, C. M.; ROCHA, F. R. T.; MARTINS, N. R. S.; RESENDE, J. S.; JORGE, M. A. RAMPINELLI, A. P. Production of monoclonal antibodies against conserved

components of *Infectious bronchitis virus*. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.53, n.5, 2001.

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, p. 1777–1799, 2011.

TORO, H., D.; PENNINGTON, R. A.; GALLARDO, V. L.; VAN SANTEN, F. W.; VAN GINKEL, J. F.; ZHANG, K.; JOINER, S. Infectious bronchitis virus subpopulations in vaccinated chickens after challenge. **Avian Dis.**, v. 56, p. 501–508, 2012.

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

VAN ROEKEL, H.; CLARKE, M.K; BULLIS, K.L.; OLESIUK, O. M.; SPERLING, F. G. Infectious Bronchitis. **American Journal of Veterinary Research**, v 43, p. 140-146, 1951.

VAN SANTEN, V. L.; TORO, H. Rapid selection in chickens of subpopulations within ArkDPI-derived infectious bronchitis virus vaccines. **Avian Pathol.**, v. 37, p. 293–306, 2008.

VERLI, H. **Bioinformática da Biologia a Flexibilidade molecular**. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2014.

VIDIGAL, P. M. P.; MAFRA, C. L.; SILVA, F. M. F.; FIETTO, J. L. R.; JR, A. S.; ALMEIDA, M. R. Tripping over emerging pathogens around the world: a phylogeographical approach for determining the epidemiology of Porcine circovirus-2 (PCV-2), considering global trading. **Virus Research**, v.163, p.320-327, 2012.

VILLARREAL, L. Y. B.; BRANDÃO, P. E.; CHACON, J. L. V.; SAIDENBERG, A.B.S.; ASSAYAG, M.S.; JONES, R.C.; FERREIRA, A.J.P. Molecular Characterization of Infectious bronchitis virus strains isolated from enteric content of Brazilian laying hens and broilers. **Avian Diseases**, v.51, n.4, p. 974-978, 2007.

VILLEGAS, P. Control de reacciones respiratorias. In: **Congresso latino americano de avicultura. México**. Anais...1997, p.388-391.

XIONG, J. **Essential Bioinformatics**. Cambridge: Cambridge University Press, 2006.

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

WANG, C.H.; TSAI, C.T. Genetic grouping for the isolates of avian infectious bronchitis virus in Taiwan. **Archives of Virology**, v. 141, p. 1677-1688, 1996.

WENTZ, I. Bronquite infecciosa: Que estirpe vacinal usar? In: Conferência Apinco de Ciência e Tecnologia Avícolas. Santos. Anais...1992, p.165-167.

5. ARTIGO

MOLECULAR EPIDEMIOLOGY, PHYLOGENY AND PHYLOGEOGRAPHY OF *Infectious bronchitis virus* IN GLOBAL SCENE

Saraiva, G. L.; Vidigal, P. M .P.; Pereira, C. G.; Fietto, J.L.R.; Bressan, G.C.; Silva
Júnior, A.; Oliveira, L. O.; Almeida, M. R.

Manuscrito em preparação

5.1 INTRODUÇÃO

Em 1931, Schalk e Hawn descreveram uma nova doença respiratória em aves, cuja etiologia só foi elucidada em 1936. Esse novo patógeno foi denominado *Infectious bronchitis virus* (IBV) e é, atualmente, considerado um dos mais importantes agentes infecciosos da indústria avícola.

O IBV é o agente etiológico da Bronquite Infecciosa das Galinhas, doença altamente contagiosa que afeta, primariamente, o trato respiratório superior de aves da espécie *Gallus gallus*, causando enormes prejuízos econômicos em vários países. Além de afetar o tecido epitelial respiratório causando tosse, espirros e estertores traqueais, o IBV replica em outras células epiteliais, incluindo células dos rins, causando nefrite intersticial; do oviduto, prejudicando a produção de ovos e sua qualidade; dos testículos, levando a infertilidade e do trato gastrointestinal (esôfago, proventrículo, duodeno, jejuno, bolsa de Fabricius, tonsilas cecais, reto e cloaca) (CAVANAGH, 2007; JACKWOOD et al., 2012). A replicação no tecido entérico não resulta, normalmente, em doença clínica, mas leva a excreção do vírus nas fezes (CAVANAGH, 2007).

O IBV é, por definição, o coronavírus das galinhas domésticas (espécie *Gallus gallus domesticus*) (CAVANAGH, 2007). Em geral, os coronavírus são vírus de RNA, fita simples, sentido positivo e envoltos por um envelope lipídico composto de projeções, ou espículas, bem demarcadas e distribuídas por toda a superfície do vírion (BOURSNELL et al., 1987; CAVANAGH et al., 1997; JACKWOOD et al., 2012). O genoma viral é de 27 a 31 kb de comprimento (27,6 kb no caso do IBV), sendo considerado o maior vírus de RNA de fita simples e senso positivo.

O genoma do IBV é organizado em seis principais regiões, cada uma delas contendo uma ou mais ORFs (*open reading frames*). A primeira região codifica a RNA

polimerase e possui duas ORFs sobrepostas (ORF1a e ORF1ab). As ORFs 1a e 1ab codificam poliproteínas que são pós-traducionalmente clivadas em 15 proteínas não estruturais (nsp2 a nsp16). Essas proteínas não estruturais estão associadas à replicação e transcrição do RNA do vírus (CAVANAGH, 2007; JACKWOOD et al., 2012). A segunda região codifica a glicoproteína de espícula (S); a terceira é constituída por três ORFs, as quais codificam pequenas proteínas não estruturais 3a, 3b e uma proteína estrutural, a 3c, também chamada de proteína E; a quarta região dá origem a glicoproteína M; a quinta é codificadora de duas proteínas não estruturais, 5a e 5b e a sexta região é codificadora da proteína do nucleocapsídeo (N) (LAI; CAVANAGH,1997).

A glicoproteína S é pós-traducionalmente clivada nas subunidades S1 e S2. A subunidade S1 é responsável pela fixação do vírus às células hospedeiras e a subunidade S2 ancora a glicoproteína de espícula ao envelope viral. A glicoproteína S1 também está envolvida na indução de anticorpos neutralizantes e, portanto, é uma proteína susceptível a mutações, acarretando nos variados tipos genéticos e antigênicos do IBV (CAVANAGH, 2007; JACKWOOD et al., 2012). Intimamente associada ao RNA viral está a proteína do nucleocapsídeo (N). A proteína N liga-se ao genoma viral desempenhando um papel importante na replicação e na montagem do vírus (CAVANAGH, 2007; JACKWOOD et al., 2012).

Na maioria dos casos, os coronavírus que afetam mamíferos possuem apenas um ou poucos sorotipos descritos, todavia centenas de sorotipos do IBV já foram relatados em todo o mundo, tornando-o peculiar entre todos os outros coronavírus (JACKWOOD, 2012). Mutações em todo o genoma, eventos de recombinação, tempo de geração curto e geração de uma grande progênie são fatores que conduzem a uma rápida evolução do IBV e, conseqüentemente, a uma grande diversidade genética, tornando o seu controle

extremamente desafiador (JACKWOOD et al., 2012; TORO et al., 2012). Todavia, o mecanismo de evolução do IBV não depende somente da geração de diversidade genética, mas também do processo de seleção natural que ocorre dentro do hospedeiro, em concordância com os postulados de Charles Darwin (TORO et al., 2012).

A diversidade genética é criada por mutações, que incluem eventos de substituição, inserção e deleção e por eventos de recombinação, que ocorrem quando o genoma viral é replicado. Mutações são causadas, principalmente, pela alta taxa de erro e limitada capacidade de correção da RNA polimerase (JACKWOOD et al., 2012). A recombinação pode ocorrer se uma célula do hospedeiro for infectada por duas estirpes distintas do IBV, gerando uma progênie com sequências derivadas de ambas as estirpes parentais (CAVANAGH, 2007).

Evidências sugerem que vários fatores intrínsecos do hospedeiro são responsáveis pelo processo de seleção do IBV, incluindo a resposta imune, variações na afinidade com os receptores celulares e as diferenças no microambiente de diferentes tecidos como, por exemplo, temperatura, nível de oxigênio e concentração de enzimas (TORO et al., 2012).

Com exceção do SARS-CoV, os coronavírus, incluindo o IBV, possuem poucos estudos a respeito de sua evolução e dinâmica populacional. As abordagens filogenéticas e filogeográficas tornaram-se estratégias importantes para estudar a epidemiologia de patógenos para os quais sequências moleculares estão disponíveis, uma vez que estas abordagens podem elucidar a evolução, estabelecer o padrão de dispersão em um contexto histórico geográfico, entender eventos biológicos no passado relacionados à dinâmica populacional e ajudar no desenvolvimento de estratégias efetivas de controle (VIDIGAL et al., 2012).

Considerando a grande diversidade genética dos isolados do IBV e que pesquisas epidemiológicas são essenciais para entender a evolução de um vírus, este trabalho propõe reconstruir, através de abordagens filogenéticas e filogeográficas, a epidemiologia molecular de isolados de IBV sob um ponto de vista global.

5.2 MATERIAIS E MÉTODOS

5.2.1 Preparação dos bancos de dados para as análises

Para estabelecer um melhor panorama para discussão da epidemiologia molecular do *Infectious bronchitis virus*, foram montados bancos de dados com sequências de nucleotídeos do IBV. As sequências foram organizadas de acordo com o país de origem do isolado viral e com sua respectiva data de isolamento, formando os bancos de dados para as análises filogenéticas e filogeográficas. O primeiro banco de dados (IBV1) contemplou sequências completas da subunidade S1 (N=256) e do gene N (N=154) do IBV. Para aumentar a cobertura dos países das quais as sequências estão disponíveis, um segundo banco de dados (IBV2) foi montado com sequências parciais do gene S1 (N=390) e do gene N (N=173). O banco de dados IBV2 foi utilizado somente para montagem das árvores filogenéticas. As sequências de S1 e N foram baixadas do *GenBank* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank>). Esta amostragem abrangeu cepas do IBV de 24 países, de todos os continentes e no período de 1937 a 2013 (tabela 1 e material suplementar).

As 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 bancos de dados. Todas as ferramentas utilizadas apresentaram o mesmo resultado e, por convenção, foi escolhido o algoritmo MUSCLE para o alinhamento das sequências. Os gaps foram retirados dos alinhamentos utilizando o aplicativo GBlocks v.0.91b (CASTRESANA, 2000). A retirada dos gaps foi de 13,04% e 2,74% do total de bases nas sequências completas de S1 e N, respectivamente. A retirada dos gaps foi de 88,26% do total de bases de S1 e 74,59% de N para as análises das sequências parciais dos genes.

5.2.2 Análise de recombinação

A presença de isolados virais recombinantes podem induzir interpretações errôneas na genealogia do IBV. Evidências filogenéticas de recombinação foram testadas para as sequências completas de S1 e N e os pontos de recombinação (breakpoints) foram preditos utilizando vários métodos ($P < 0,01$) disponíveis na versão RDP versão 4.50 (MARTIN et al., 2010), incluindo RDP (MARTIN; RYBICKI, 2000), GENECONV (PADIDAM, et al., 1999), Chimaera (POSADA; CRANDALL, 2001), MaxChi (SMITH, 1992), 3Seq (BONI et al., 2007) e BootScan / SiSscan (POSADA; CRANDALL, 2001). Apenas aqueles eventos de recombinação, preditos por todos os métodos e que apresentavam informações completas das sequências parentais (sequências que originaram o recombinante), foram considerados válidos. As sequências recombinantes foram removidas do banco de dados das sequências completas de S1 e N (IBV1) para todas as análises subsequentes.

Tabela 1: Resumo do número de sequências parciais e completas do gene N e S1 e sua distribuição em relação aos países de origem

REGIÃO GEOGRÁFICA	PAÍS	SIGLA	SEQUÊNCIAS COMPLETAS IBV1		SEQUÊNCIAS PARCIAIS IBV2	
			N	S1	N	S1
ÁFRICA	NIGER	NER	-	1	-	1
	NIGÉRIA	NGA	1	1	1	1
	EGITO	EGY	-	1	-	1
AMÉRICA DO NORTE	ESTADOS UNIDOS	USA	38	63	38	67
	CANADÁ	CAN	-	2	-	2
ÁSIA	CHINA	CHN	70	77	71	78
	CORÉIA DO SUL	KOR	17	37	17	38
	ÍNDIA	IND	-	1	-	1
	ISRAEL	ISR	-	1	-	2
	JAPÃO	JPN	1	4	1	4
	TAIWAN	TWN	7	13	10	13
	AMÉRICA DO SUL	BRASIL	BRA	-	12	15
EUROPA	BÉLGICA	BEL	-	-	-	1
	ESPAÑA	ESP	-	2	-	2
	FRANÇA	FRA	-	2	-	1
	HOLANDA	NLD	1	2	1	2
	INGLATERRA	GBR	-	3	-	3
	IRLANDA	IRN	-	1	-	1
	ITÁLIA	ITA	1	1	1	2
	RÚSSIA	RUS	-	2	-	2
	SUÉCIA	SWE	1	14	1	18
	UCRÂNIA	UKR	1	1	1	1
	OCEANIA	AUSTRÁLIA	AUS	16	14	16
NOVA ZELÂNDIA		NZL	-	1	-	1
TOTAL			154	256	173	390

5.2.3 Estimativas da pressão de seleção

Substituições de nucleotídeos, nos genes que codificam proteínas, podem ser tanto sinônimas (não alteram o aminoácido), também conhecidas como substituições silenciosas, ou não-sinônimas (alteram o aminoácido). As estimativas das pressões de seleção nas sequências completas de S1 e N (IBV1), foram calculadas através da razão entre as taxas de substituição não sinônimas e sinônimas (dN/dS) na plataforma online SNAP (<http://hiv-web.lanl.gov/content/hiv-db/SNAP/WEBSNAP/SNAP.html>) (KORBER, 2000). Valores de dN/dS < 1, = 1, > 1 indicam que a proteína está sob seleção purificadora, neutra ou diversificadora, respectivamente.

Além disso, a fim de detectar resíduos específicos em S1 e N sob pressão seletiva, foi calculada a diferença entre a taxa de substituição não sinônima e sinônima (dN - dS) para cada códon usando os métodos *single-likelihood ancestor counting* (SLAC), *fixed-effects likelihood* (FEL) e *internal branches fixed-effects likelihood* (IFEL), implementados no DataMonkey (<http://www.datamonkey.org/>). Valores dN - dS < 0, = 0, > 0 indicam seleção negativa, neutra e positiva, respectivamente. As estimativas das diferenças das taxas de substituição foram realizadas a partir de uma árvore filogenética inferida pelo algoritmo de Neighbor-Joining, com distâncias corrigidas sob o melhor modelo de substituição selecionado pelo DataMonkey.

5.2.4 Árvores filogenéticas

As hipóteses filogenéticas foram inferidas por Inferência Bayesiana (IB) usando o programa MrBayes versão 3.2.5 (HUELSENBECK; RONQUIST, 2001). Para agilizar a construção das árvores filogenéticas, um modelo de substituição de nucleotídeos foi

estimado usando o programa jModeltest versão 2.1.7 (DARRIBA et al., 2007). Essa ferramenta fornece ao MrBayes os parâmetros que deverão ser estimados, para evitar o excesso de parâmetros dos modelos a serem utilizados na estimativa das topologias e tamanhos de ramos. As árvores filogenéticas foram calculadas usando o método Bayesian Markov Chain Monte Carlo (MCMC) em quatro corridas com 100.000.000 de gerações e a frequência de amostragem de 10.000.

Para enraizar as árvores filogenéticas, um grupo externo foi selecionado e adicionado às sequências de S1, o *Turkey coronavirus* (GenBank ID: EU022526). O *Turkey coronavirus* é do mesmo gênero do IBV (*Gammacoronavirus*) e foi isolado de perus. Pelo fato do gene N ser mais conservado que o gene S1, não foi possível utilizar o mesmo grupo externo para as sequências de N. Foram testados outros grupos externos para o gene N, porém nenhum resultado se mostrou satisfatório.

O modelo de substituição GTR + I + G foi escolhido como o melhor modelo de evolução para todos os conjuntos de dados de S1. Para os conjuntos de dados de N, o melhor modelo de evolução para as sequências parciais foi o GTR+G e para as sequências completas foi o GTR+I+G, de acordo com os critérios BIC (*Bayesian information criterion*), AIC (*Akaike information criterion*) e AICc (*AIC com uma correção para amostras finitas*).

No final de cada análise, os desvios padrão médio das cadeias calculadas foram 0,011425 (N – IBV1), 0,007802 (N – IBV2), 0,017470 (S1 – IBV1) e 0,007631 (S1 – IBV2). A convergência dos parâmetros foi analisada no TRACER versão 1.8.2 (DRUMMOND et al., 2012), e as cadeias atingiram uma distribuição estacionária depois de 1.000.000 gerações para ambos os conjuntos de sequências. Então, um total de 1% das árvores geradas foram descartadas para produzir as árvores filogenéticas consensos.

5.2.5 Estimativas das taxas de mutação

As estimativas das taxas de mutação dos conjuntos de dados foram realizadas no *Bayesian Evolutionary Analysis Sampling Trees* (BEAST) versão 1.8.2 (DRUMMOND et al., 2012). Os conjuntos de dados das sequências completas de S1 e N (IBV1) foram divididos de acordo com os grupos formados nas suas respectivas árvores filogenéticas, formando os grupos N-I, N-II, S1-I e S1-II. Portanto, foram preditas taxas de mutação para seis conjuntos de dados: S1 total, N total, N-I, N-II, S1-I e S1-II.

Modelos de substituição de nucleotídeos foram estimados para cada conjunto de dados usando o programa jModeltest (DARRIBA et al., 2007). O GTR + I + G foi o modelo de substituição selecionado para os conjuntos de sequências de S1, N, S1-I e N-II. O modelo GTR+G foi selecionado para os conjuntos de dados N-I e S1-II.

Para rodar as análises foi utilizado o modelo exponencial de relógio molecular (*Bayesian-relaxed exponential molecular clock*), o modelo de população Coalescente Constante, distribuição gama para o parâmetro de taxa de substituição (shape=0,001/Scale=1000/Offset=0), conforme tutorial (SUCHARD; LEMEY, 2014). Nestes testes, MCMC foi executado com 500.000.00 de gerações e frequência de amostragem de 1.000. Para cada conjunto de sequências, a convergência dos parâmetros foi analisada no TRACER versão 1.8.2 (DRUMMOND et al., 2012).

5.2.6 Análise da dinâmica populacional

A dinâmica da população dos isolados não recombinantes do IBV foi reconstruída usando o *Bayesian Skyline Plot* (BSP), que estima alterações no tamanho efetivo da população ao longo do tempo (Drummond, et al., 2005). A primeira análise

foi realizada com todas as sequências completas do conjunto de dados de S1 e N (IBV1). O BSP foi conduzido no BEAST versão 1.8.2 (DRUMMOND et al., 2012), configurando uma corrida MCMC com 100.000.000 gerações e frequência de amostragem de 1.000. Para o parâmetro de taxa de substituição foi escolhido a distribuição gamma (shape=0,001/ Scale=1000/ Offset=0), conforme tutorial (SUCHARD; LEMEY, 2014). A taxa de mutação foi fixada de acordo com o resultado do item 2.5.

A convergência dos parâmetros foi analisada usando TRACER versão 1.8.2 (DRUMMOND et al., 2012), e as cadeias atingiram uma distribuição estacionária após 1.000.000 gerações. Em seguida, 1% das árvores geradas foram descartadas para produzir a árvore consenso utilizando o TreeAnnotator versão 1.8.2 (DRUMMOND et al., 2012).

Além disso, uma segunda análise com o *Bayesian Skyline Plot* (BSP) foi conduzida, separadamente, para os dois principais grupos formados na árvore filogenética das sequências completas de S1 (S1-I e S1-II). Os modelos de substituição GTR + I + G e GTR+G foram selecionados para os conjuntos de dados de S1-I e S1-II, respectivamente. As taxas de mutações de S1-I e S1-II foram obtidas dos resultados do item 2.5 e inseridas nas configurações das análises. A análise BSP foi realizada no BEAST versão 1.8.2 (DRUMMOND et al., 2012), com uma corrida MCMC com 500.000.000 gerações e frequência de amostragem igual a 10.000.

5.2.7 Análise da dispersão viral

Em epidemiologia molecular, a inferência espacial é muitas vezes limitada aos locais de amostragem dos agentes infecciosos nas interpretações das histórias

evolutivas. Para testar hipóteses sobre os padrões de dispersão espacial do IBV, foi utilizado o método *Relaxed Random Walk* (RRW). O RRW é um método que utiliza a Inferência Bayesiana para inferir, visualizar e reconstruir os padrões de dispersão de um organismo ao longo de sua história evolutiva. As informações geradas podem elucidar os fatores chave da dispersão e auxiliar no aprimoramento de estratégias de controle para diferentes patógenos (LEMEY et al., 2009).

A análise de RRW foi conduzida para o gene S1 e N usando o BEAST versão 2.2.1 (BOUCKAERT, et al., 2014) com 50.000.000 de gerações e frequência de amostragem de 1.000, conforme o tutorial *Ancestral Reconstruction/Discrete Phylogeography*. Para a análise de RRW de S1, foi adotada a distribuição normal para o parâmetro “*NonZero.S1:location*” para evitar a geração de números infinitos na simulação.

A convergência dos parâmetros foi analisada usando TRACER versão 2.2.1 (BOUCKAERT, et al., 2014), e 10% das árvores geradas foram queimadas para produzir a árvore consenso utilizando o TreeAnnotator versão 2.2.1 (BOUCKAERT, et al., 2014). O arquivo gerado da árvore consenso foi carregado no aplicativo SPREAD (<https://github.com/phylogeography/SPREAD>), segundo tutorial *Spatial Phylogenetic Reconstruction of Evolutionary Dynamics*, para gerar um arquivo de formato kml que, em seguida, foi lido pelo Google Earth (<https://earth.google.com/>) para obtenção dos gráficos dos padrões de dispersão ao longo do tempo.

Para estabelecer um contexto epidemiológico, consideramos todas as informações sobre as sequências que foram selecionadas no *GenBank*, incluindo artigos publicados e nas estatísticas do comércio internacional de aves vivas (código 0105) disponíveis no *United Nations Commodity Trade Statistics Database* DESA/UNSD, UN

Comtrade (<http://comtrade.un.org/>; acesso em: abril, 2015, seguindo as abordagens sugeridas por Vidigal et al. (2012).

5.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.3.1 Análises das fontes de diversidade genética

A recombinação tem sido relatada em muitos coronavírus (BROOKS, et al., 2004; LEE; JACKWOOD, 2000; MAGIORKINIS, et al., 2004; THOR, et al., 2011). Os eventos de recombinação em IBV têm sido demonstrados tanto experimentalmente, como também em condições a campo. Diversos relatos de recombinação natural têm gerado evidências convincentes que muitas, talvez todas, as estirpes de IBV sofrem recombinação em alguma parte do seu genoma (WANG et al., 1993; JIA et al., 1995; KOTTIER, et al., 1995; CAVANAGH, et al., 1992, 2005; CAVANAGH, 2007).

As sequências recombinantes, suas respectivas sequências parentais e a probabilidade obtida para cada método estatístico estão representadas nas tabelas 2 e 3 para os genes N e S1, respectivamente. Para o conjunto de dados do gene N, quatro eventos de recombinação e doze sequências recombinantes (7,6%) foram preditos por todos os métodos estatísticos oferecidos pelo RDP 4.50. Para as sequências de S1, um número maior de eventos de recombinação e sequências recombinantes foram encontrados. Considerando todos os métodos estatísticos, foram preditos seis eventos de recombinação e um total de 32 sequências recombinantes para S1 (12,5%).

Pelo fato do gene S estar envolvido na ligação do vírus com a célula hospedeira e por conter epítomos neutralizantes, eventos de mutação ou recombinação no gene S podem resultar no aparecimento de novos sorotipos do IBV, aumentando, assim, sua

diversidade (JACKWOOD et al., 2010; 2012). Recombinações em proteínas relacionadas com a replicação e montagem viral, como a proteína N, podem alterar a eficiência da replicação e, por conseguinte, alterar a infectividade do vírus.

Os resultados obtidos evidenciam uma alta incidência de eventos de recombinação para o IBV, demonstrando que a recombinação é um processo importante na evolução do IBV. De acordo com Liu et al. (2013), a alta frequência de recombinação na evolução natural do IBV é uma característica única desse vírus. Silva et al. (2013), estudando a epidemiologia molecular do *Infectious bursal disease virus* (IBDV), vírus de RNA segmentado que afeta aves domésticas, descreveu duas estirpes recombinantes em um total de 68 sequências da proteína VP1 (2,9%) sugerindo, portanto, uma baixa frequência de recombinação homóloga entre estirpes do IBDV.

Um número considerável de estudos tem sugerido que eventos de recombinação podem ocorrer entre diferentes estirpes de campo, como também entre estirpes de campo e estirpes vacinais, contribuindo para o surgimento de novas variantes do IBV e, conseqüentemente, tornando o controle mais desafiador (KUSTERS et al., 1989; WANG et al., 1993; MASTERS, 2006; LIM et al., 2011; LIU et al., 2013, 2014).

Taxas de substituição são parâmetros críticos para a compreensão da evolução de um vírus, dado que restrições na frequência de mutações de um vírus podem conduzir a uma baixa capacidade de geração de diversidade genética (DENISON et al., 2011). Taxas de substituição foram estimadas para vírus de RNA e estes valores variam tipicamente de 10^{-2} a 10^{-5} substituições/sítio/ano, com a maioria dos vírus exibindo taxas de 1×10^{-3} substituições/sítio/ano (DUFFY et al., 2008; HANADA et al., 2004). A taxa média de mutação para todos os coronavírus é de aproximadamente $1,2 \times 10^{-3}$ substituições /sítio /ano (HANADA et al., 2004; HOLMES, 2009; HOLMES; RAMBAUT, 2004).

Tabela 2: Sequências recombinantes do gene N, suas respectivas sequências parentais e a probabilidade obtida para cada método estatístico

Eventos de Recombinação	Sequência Recombinante	Sequência Parental	Sequência Parental	RDP	GENECONV	Maxchi	Chimaera	SiSscan	3Seq
1	AY790354	KJ435283	HQ850618	3,21E-09	8,54E-07	3,36E-12	4,35E-11	1,20E-29	2,02E-24
1	KC008600	KC013541	HQ848267	3,21E-09	8,54E-07	3,36E-12	4,35E-11	1,20E-29	2,02E-24
1	KC136209	KF574761	JF893452	3,21E-09	8,54E-07	3,36E-12	4,35E-11	1,20E-29	2,02E-24
1	KF411041	KJ425496	HM245924	3,21E-09	8,54E-07	3,36E-12	4,35E-11	1,20E-29	2,02E-24
1	KF574761	KF663561	KF663560	3,21E-09	8,54E-07	3,36E-12	4,35E-11	1,20E-29	2,02E-24
1	KF663559	JX195176	KF66860	3,21E-09	8,54E-07	3,36E-12	4,35E-11	1,20E-29	2,02E-24
1	KJ435283	KJ128295	FJ807653	3,21E-09	8,54E-07	3,36E-12	4,35E-11	1,20E-29	2,02E-24
2	DQ646405	JQ964077	JF330898	6,94E-11	3,31E-09	1,39E-06	4,28E-07	3,09E-05	9,86E-14
2	EU822337	JQ977697	DQ646404	6,94E-11	3,31E-09	1,39E-06	4,28E-07	3,09E-05	9,86E-14
2	EU822340	FN430415	DQ646406	6,94E-11	3,31E-09	1,39E-06	4,28E-07	3,09E-05	9,86E-14
3	JX840411	HQ850618	HQ014604	6,72E-05	3,14E-04	9,90E-08	2,27E-07	4,47E-14	8,78E-12
4	FJ904714	FJ904715	JQ964077	7,10E-05	8,12E-04	1,88E-07	5,80E-04	1,72E-08	3,82E-08

Tabela 3: Sequências recombinantes do gene S1, suas respectivas sequências parentais e a probabilidade obtida para cada método estatístico

Eventos de Recombinação	Sequência Recombinante	Sequência Parental	Sequência Parental	RDP	GENECONV	Maxchi	Chimaera	SiScan	3Seq
1	KJ135013	FJ829876	KF377577	1,24E-32	4,16E-31	4,89E-13	1,22E-12	6,25E-13	1,11E-46
2	JQ920384	FJ807929	AY790362	4,57E-19	3,32E-18	2,03E-14	4,64E-14	1,15E-13	9,28E-36
2	JQ920390	AF193423	AY257061	4,57E-19	3,32E-18	2,03E-14	4,64E-14	1,15E-13	9,28E-36
2	JQ920391	AY180958	AY257064	4,57E-19	3,32E-18	2,03E-14	4,64E-14	1,15E-13	9,28E-36
2	JQ920395	AY189157	AY257065	4,57E-19	3,32E-18	2,03E-14	4,64E-14	1,15E-13	9,28E-36
3	AY135205	AY257062	AY846836	1,18E-17	1,79E-16	1,39E-16	1,08E-16	3,40E-39	1,25E-31
3	AY257063	AY257068	FJ888351	1,18E-17	1,79E-16	1,39E-16	1,08E-16	3,40E-39	1,25E-31
3	AY319302	JQ977697	JN022555	1,18E-17	1,79E-16	1,39E-16	1,08E-16	3,40E-39	1,25E-31
3	JQ920405	AY790368	JN022539	1,18E-17	1,79E-16	1,39E-16	1,08E-16	3,40E-39	1,25E-31
4	AY296745	DQ646406	AY296746	1,88E-11	9,71E-06	1,46E-12	9,90E-13	2,31E-11	1,94E-23
5	AY257061	AF193423	AIU49858	2,58E-16	6,95E-22	4,05E-18	1,00E-13	4,01E-25	1,97E-10
5	AY257064	AY180958	AJ441314	2,58E-16	6,95E-22	4,05E-18	1,00E-13	4,01E-25	1,97E-10
5	AY257065	AY189157	AY514485	2,58E-16	6,95E-22	4,05E-18	1,00E-13	4,01E-25	1,97E-10
5	AY646283	AY277632	DQ458217	2,58E-16	6,95E-22	4,05E-18	1,00E-13	4,01E-25	1,97E-10
5	AY790358	AY278246	EU359645	2,58E-16	6,95E-22	4,05E-18	1,00E-13	4,01E-25	1,97E-10
5	AY790359	DQ400359	FJ008695	2,58E-16	6,95E-22	4,05E-18	1,00E-13	4,01E-25	1,97E-10
5	AY790360	EF079117	FJ904715	2,58E-16	6,95E-22	4,05E-18	1,00E-13	4,01E-25	1,97E-10
5	AY790361	FJ807929	GU361607	2,58E-16	6,95E-22	4,05E-18	1,00E-13	4,01E-25	1,97E-10
5	AY790362	FJ829872	GU361608	2,58E-16	6,95E-22	4,05E-18	1,00E-13	4,01E-25	1,97E-10
5	AY790365	FN430414	GU393334	2,58E-16	6,95E-22	4,05E-18	1,00E-13	4,01E-25	1,97E-10
5	DQ070839	HM245923	GU393336	2,58E-16	6,95E-22	4,05E-18	1,00E-13	4,01E-25	1,97E-10
5	EU637854	JF732903	GU393337	2,58E-16	6,95E-22	4,05E-18	1,00E-13	4,01E-25	1,97E-10
5	FJ807934	JF951368	JN022555	2,58E-16	6,95E-22	4,05E-18	1,00E-13	4,01E-25	1,97E-10
5	FJ807936	EF079118	GU393338	2,58E-16	6,95E-22	4,05E-18	1,00E-13	4,01E-25	1,97E-10
5	FJ807937	JF951370	JQ964061	2,58E-16	6,95E-22	4,05E-18	1,00E-13	4,01E-25	1,97E-10
5	FJ807938	JN022546	JQ964066	2,58E-16	6,95E-22	4,05E-18	1,00E-13	4,01E-25	1,97E-10
5	FJ807941	JN022547	JQ964067	2,58E-16	6,95E-22	4,05E-18	1,00E-13	4,01E-25	1,97E-10
5	FJ807945	JN022549	JQ964070	2,58E-16	6,95E-22	4,05E-18	1,00E-13	4,01E-25	1,97E-10
5	FJ807946	JN022551	JQ964071	2,58E-16	6,95E-22	4,05E-18	1,00E-13	4,01E-25	1,97E-10
5	JF951372	JN022552	L18989	2,58E-16	6,95E-22	4,05E-18	1,00E-13	4,01E-25	1,97E-10
5	JQ920378	JN022553	X15832	2,58E-16	6,95E-22	4,05E-18	1,00E-13	4,01E-25	1,97E-10
6	GQ229232	AY606322	EU822336	7,59E-07	2,15E-07	1,57E-08	4,64E-08	1,98E-05	6,56E-11

A estimativa das taxas de mutações foi de $1,7633 \times 10^{-4}$ para S1 e $1,7293 \times 10^{-5}$ para N. Estas estimativas das taxas de substituição estão de acordo com o que é esperado para vírus de RNA. Além disso, verifica-se que a frequência de mutação em S1 foi maior que em N. Esse resultado é condizente, visto que S1 é a proteína mais externa do envelope viral e, portanto, está mais susceptível à pressão imunológica. Por outro lado, devido à ampla diversidade genética do IBV, se esperava um valor mais elevado da taxa de mutação para S1, sugerindo que o processo de mutação gerado pela alta taxa de erro da RNA polimerase, não é a fonte primária de diversidade genética do IBV. Este fato pode ser explicado, em parte, pela presença de um domínio de exoribonuclease associado a RNA polimerase do IBV, reduzindo a taxa de erro dessa proteína e, por conseguinte, os eventos de mutações (TORO et al., 2012).

As estimativas das taxas mutações para os grupos S1-I, S1-II e N-II foram $8,66 \times 10^{-4}$, $8,01 \times 10^{-5}$ e $2,41 \times 10^{-6}$, respectivamente. A taxa de mutação do grupo N-I não foi possível calcular pelo pequeno número de isolados disponíveis. Cavanagh et al. (1998) demonstraram que na ausência de uma vacina específica e pouca, ou nenhuma, pressão de seleção do sistema imune, a taxa de mutação para a região hipervariável no gene S1 (estirpe 4/91) foi estimada em 3×10^{-3} substituições/sítio/ano. Por outro lado, McKinley et al. (2011) avaliaram 11 genomas completos do IBV do tipo Mass e Conn, isolados ao longo de um período de 41 e 25 anos, respectivamente, e demonstraram que as taxas de mutações variaram de 10^{-4} a 10^{-6} substituições/sítio/ano em locais onde vacinas vivas atenuadas, do tipo Mass e Conn, são rotineiramente usadas para controlar a doença. Esses resultados sugerem que uma resposta imune bem montada para o IBV, proveniente do uso correto de vacinas específicas, limita a replicação do vírus e, deste modo, também restringe as mutações e a geração de estirpes variantes. Portanto, pode-se sugerir que a presença do domínio de exoribonuclease associado a RNA polimerase do

IBV, juntamente com uma resposta imune satisfatória, conferida por protocolos vacinais eficazes, são fatores que podem explicar o baixo valor de taxa de mutação encontrado nesse trabalho para o IBV.

5.3.2 Análise de Pressão de Seleção

De acordo com Kilbourne (1994), os vírus são parasitas celulares obrigatórios, ou seja, sua própria existência depende de substratos do hospedeiro, sendo assim, parece óbvio que fatores intrínsecos do hospedeiro possuem papel fundamental na seleção e evolução dos vírus.

A relevância do processo de seleção tem sido mais bem compreendida nos últimos anos através da identificação de diferenças genéticas e fenotípicas entre subpopulações do IBV antes, e durante, a replicação do vírus no hospedeiro natural ou em ovos embrionados (AMMAYAPPAN, et al., 2009; GALLARDO, et al., 2010, 2012; TORO et al., 2012a, 2006; VAN SANTEN, et al., 2008). Evidências sugerem que múltiplos fatores dentro do hospedeiro são responsáveis pelo processo de seleção, tais como a resposta imune, afinidade com os receptores celulares e as condições físicas e bioquímicas dos diferentes tecidos do hospedeiro (TORO et al., 2012b).

Aproximadamente 33% dos códons de S1 parecem evoluir sob seleção purificadora, com uma estimativa global dN/dS de 0,2186. Na análise de N, 30,7% dos códons parecem estar evoluindo sob seleção purificadora, com uma estimativa global de dN/dS de 0,1014 (tabelas 4 e 5).

Esses resultados reforçam a hipótese de que o gene S1 e N estão sujeitos a uma forte seleção purificadora favorecendo, portanto, a eliminação de mutações deletérias. Considerando a razão da taxa substituição não-sinônima e sinônima (dN/dS), seu valor

foi maior no gene S1 comparado ao gene N. Com isso, pode-se sugerir que a seleção purificadora parece ser menos rigorosa no gene S1 do que no gene N, provavelmente devido às características funcionais e estruturais de cada gene (tabela 5).

O cálculo das mutações sinônimas é o índice mais confiável para a estimativa da taxa de mutação em genes que codificam proteínas, visto que essas mutações têm maior probabilidade de serem neutras quando comparadas às substituições não sinônimas (HUGHES, 1999). Desse modo, valores elevados de taxa de substituição sinônima sugerem uma alta taxa de mutação e valores baixos são indicativos de uma baixa taxa de mutação. Avaliando a taxa de substituição sinônima, o valor médio para o gene S1 ($dS = 0,5538$) foi maior, porém muito semelhante ao valor médio de dS para o gene N ($dS = 0,3833$) (tabela 3). Esta afirmação está de acordo com o resultado encontrado para as taxas de mutações de N e S1 (item 3.1), no qual a taxa de mutação de S1 apresentou valor mais elevado que N, porém essa diferença não foi muito significativa.

Tabela 4: Pressões seletivas sobre os códons das sequências completas de S1 e N. Significância estatística dos testes: $P < 0,01$

	Número sequências	Número códon	Sítios neutros	Sítios negativamente selecionados	Sítios positivamente selecionados	Valor médio dN	Valor médio dS
N	142	406	278	125	3	0,0389	0,3833
S1	223	526	341	177	8	0,1211	0,5538

Tabela 5: Sítios sob pressão de seleção e valores globais da estimativa da razão entre as taxas de substituição não sinônimas e sinônimas (dN/dS) para as proteínas S1 e N do IBV. Significância estatística dos testes: $P < 0,01$

Proteína	Sítios positivamente selecionados	Códons	Sítios negativamente selecionados	Códons	dN/dS
S1	1,52%	24, 38, 71, 107, 277, 366, 378, 455	33,6%	18, 26, 27, 28, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 39, 41, 42, 44, 45, 49, 50, 65, 68, 72, 78, 80, 82, 84, 86, 89, 93, 97, 98, 99, 100, 102, 103, 104, 109, 122, 126, 127, 143, 146, 153, 154, 158, 159, 161, 165, 167, 169, 170, 171, 173, 175, 177, 180, 182, 190, 205, 209, 215, 216, 220, 222, 223, 224, 225, 227, 229, 231, 232, 233, 234, 236, 238, 239, 240, 242, 243, 244, 259, 262, 266, 271, 282, 284, 285, 289, 292, 295, 297, 299, 303, 309, 315, 325, 326, 327, 328, 336, 342, 345, 346, 347, 349, 350, 353, 354, 355, 358, 359, 360, 361, 362, 363, 364, 369, 370, 374, 375, 376, 377, 379, 380, 384, 386, 387, 396, 398, 399, 400, 406, 408, 409, 413, 421, 427, 428, 439, 440, 443, 445, 447, 449, 451, 459, 460, 462, 464, 469, 470, 471, 476, 477, 484, 488, 489, 491, 492, 493, 498, 499, 502, 503, 504, 505, 508, 509, 511, 512, 513, 519, 520, 523, 524, 526, 527	0,2186
N	0,73%	7, 46, 347	30,7%	2, 5, 8, 9, 11, 13, 21, 23, 25, 26, 28, 29, 30, 31, 36, 37, 40, 43, 44, 54, 59, 62, 67, 69, 70, 82, 87, 88, 89, 91, 92, 93, 94, 99, 109, 125, 126, 127, 130, 131, 132, 134, 139, 140, 143, 144, 145, 146, 149, 155, 156, 157, 163, 164, 168, 171, 172, 177, 178, 181, 182, 184, 186, 187, 193, 194, 196, 197, 200, 201, 203, 205, 208, 212, 213, 216, 218, 221, 223, 225, 227, 231, 238, 240, 248, 250, 258, 264, 271, 278, 280, 282, 283, 285, 286, 303, 307, 308, 314, 315, 320, 321, 325, 326, 329, 330, 344, 350, 356, 361, 370, 372, 385, 386, 389, 390, 391, 392, 394, 396, 399, 400, 401, 402, 404	0,1014

Na proteína N, somente os códons 7, 46, e 347 foram identificados sob influência de seleção positiva. Todos os códons selecionados positivamente em N estão localizados em regiões previamente descritas como imunogênicas ou de interação com células do sistema imune do hospedeiro. Seah et al. (2000), avaliando a conservação e localização de regiões antigênicas na proteína do nucleocapsídeo, evidenciaram que os epítomos lineares imunodominantes estão distribuídos em três principais regiões na proteína N. A primeira região encontra-se do aminoácido 1 ao 50, a segunda região abrange do aminoácido 175 ao 240 e a última região do aminoácido 310 ao 409. Além disso, Seo et al. (1997) identificaram epítomos para a interação com células T citotóxicas nos últimos 120 aminoácidos da porção carboxi-terminal da proteína N.

Códons selecionados positivamente foram identificados em oito regiões de S1, incluindo os códons 24, 38, 71, 107, 277, 366, 378 e 455. Dentre os códons positivamente selecionados, cinco estão localizados nas três regiões hipervariáveis de S1, onde estão situados os principais epítomos neutralizantes do IBV. O códon 38 está localizado na região hipervariável I (aminoácido 38-69), o códon 107 na região hipervariável II (aminoácido 91-141) e os códons 277, 366 e 378 na região hipervariável III (aminoácido 250-387) (ALVARADO et al., 2005). Os códons 24, 71 e 455 não estão localizados nas regiões dos principais epítomos neutralizantes, mas podem estar relacionados com outros processos de seleção, tais como sítios de afinidade com os receptores celulares.

5.3.3 Agrupamentos das árvores filogenéticas

Análises filogenéticas foram construídas, baseadas nos genes S1 e N, a fim de avaliar a relação genética de diferentes estirpes do IBV e propor agrupamentos nas árvores filogenéticas para estudo da história evolutiva do IBV.

Após alinhamento dos conjuntos de dados, foram observadas diferenças no nível de polimorfismos no gene N e S1, 53% dos loci do gene N e 75% dos loci do gene S1 apresentaram polimorfismos. O gene S1 é usado com frequência para monitorar a diversidade genética do IBV, devido à sua alta variabilidade e por possuir correlação com agrupamentos sorológicos ou antigênicos. Por outro lado, o gene N possui menor variabilidade nas sequências e pode acarretar em agrupamentos diferentes do gene S1. Contudo, o estudo integrado das análises filogenéticas do gene N e S1, é uma ferramenta útil para a análise da história evolutiva do IBV.

Na árvore filogenética de N (figura 1), os 145 isolados foram agrupados em dois principais grupos, aqui denominados N-I e N-II. O grupo N-I contém 16 estirpes asiáticas e 3 europeias, isoladas de 2003 a 2013. As estirpes asiáticas foram isoladas na China e Taiwan, enquanto as estirpes europeias foram isoladas na Itália, Suécia e Ucrânia. O grupo N-II contém 123 sequências de diferentes países, incluindo Austrália, China, Taiwan, Coreia do Sul, Japão, Inglaterra, Holanda, Nigéria e Estados Unidos da América. No grupo N-II existe um componente geográfico bem evidente, já que isolados estão agrupados, principalmente, pelo seu país de origem ou próximos de países vizinhos.

O agrupamento das sequências do gene S1 foi diferente do agrupamento proposto para N. Na árvore filogenética de S1 (figura 2), os 224 isolados (1937 a 2013) foram agrupados em dois principais grupos, chamados S1-I e S1-II, e este agrupamento mostrou estar correlacionado com a classificação dos diferentes sorotipos do IBV. No grupo S1-I foram agrupados 58% (N=130) dos isolados, abrangendo estirpes que não

são do sorotipo Massachusetts (Mass) e Connecticut (Conn), aqui denominadas variantes. Da mesma forma que ocorreu no grupo N-II, as estirpes variantes do grupo S1-I possuem um componente geográfico bem definido. Por outro lado, o grupo S1-II agrupou 42% (N=94) dos isolados e somente estirpes do sorotipo Mass e Conn foram identificadas neste grupo, incluindo 10 isolados vacinais desses dois sorotipos.

Para testar a reprodutibilidade dos dois principais agrupamentos encontrados nas árvores filogenéticas das sequências completas dos genes S1 e N (IBV1), árvores filogenéticas dos conjuntos de sequências parciais dos genes S1 e N (IBV2) também foram inferidas. Os resultados mostram que os mesmos agrupamentos obtidos nas árvores filogenéticas das sequências completas do gene N e S1 foram encontrados nos conjuntos de dados das sequências parciais, conforme figuras 1 e 2.

Através dos resultados, pode-se sugerir que o gene N e S1 contam histórias evolutivas distintas, baseado nas características dos agrupamentos obtidos nas árvores filogenéticas. A menor variabilidade do gene N pode evidenciar os eventos de dispersão mais antigos do IBV. Por outro lado, a maior variabilidade de S1 pode refletir os eventos de dispersão mais recentes. A partir dessas hipóteses filogenéticas, referentes às histórias evolutivas de cada gene, foram realizadas análises de dinâmica populacional para compreender as alterações na população viral ao longo do tempo e análises para elucidar possíveis rotas de dispersão do IBV ao longo de sua história evolutiva.

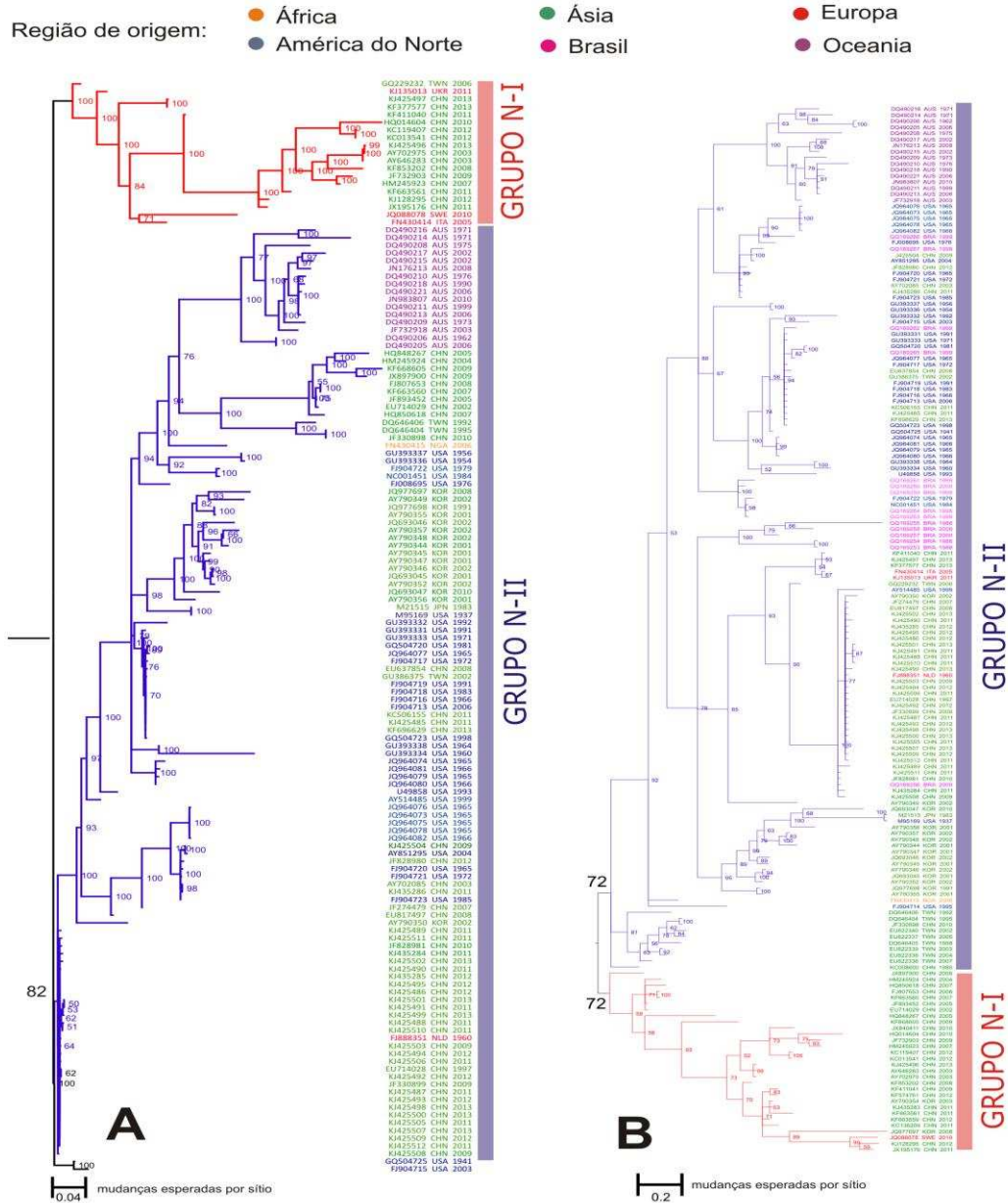


Figura 1: Relações evolutivas entre estirpes do IBV baseadas no gene N. As árvores filogenéticas consensos foram obtidas por análise de Inferência Bayesiana de 142 sequências completas e 173 sequências parciais de N. Os valores de probabilidade posterior são mostrados ao lado de cada nó e foram calculados utilizando as melhores árvores geradas pelo aplicativo MrBayes. **(A)** Árvore filogenética das sequências completas de N com seus respectivos grupos, N-I (vermelho) e N-II (azul). **(B)** Árvore filogenética das sequências parciais de N ilustrando os mesmos grupos, N-I (vermelho) e N-II (azul).

Região de origem:

- África
- América do Norte
- Ásia
- Brasil
- Europa
- Oceania

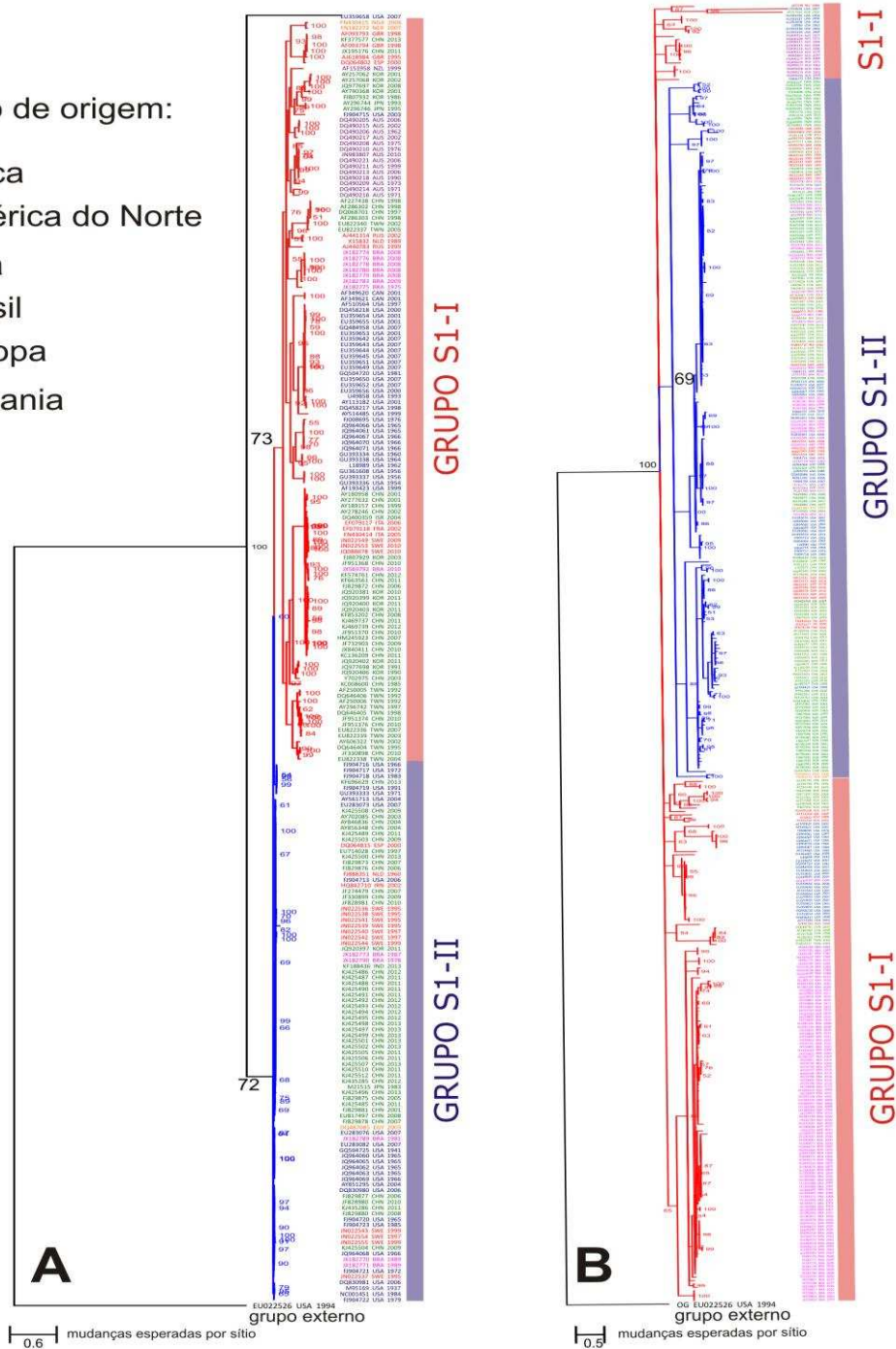


Figura 2: Relações evolutivas entre cepas do IBV baseadas no gene S1. As árvores filogenéticas consensos foram obtidas por análise de Inferência Bayesiana de 225 sequências completas e 390 sequências parciais de S1. Os valores de probabilidade posterior são mostrados ao lado de cada nó e foram calculados utilizando as melhores árvores geradas pelo aplicativo MrBayes. **(A)** Árvore filogenética das sequências completas de S1 com seus respectivos grupos, S1-I (vermelho) S1-II (azul). **(B)** Árvore filogenética das sequências parciais de S1 ilustrando os mesmos grupos, S1-I (vermelho) e S1-II (azul). O grupo externo é um isolado do *Turkey Coronavirus* (GenBank ID: EU022526).

5.3.4 Dinâmica populacional

A análise *Bayesian Skyline Plot* (BSP) mostra as mudanças previstas no tamanho efetivo da população do IBV ao longo do tempo para o gene S1 e N (figura 3). Devido às características, relacionadas à antigenicidade dos dois agrupamentos formados na árvore filogenética de S1, análises independentes foram realizadas para cada grupo, S1-I e S1-II. (figura 4).

A doença causada pelo IBV foi descrita pela primeira vez em 1931, nos Estados Unidos da América (SCHALK; HAWN, 1931). Em 1936, estabeleceu-se a etiologia desta doença e o primeiro sorotipo do IBV foi classificado como Massachusetts (Mass). Durante alguns anos, foi predominante o isolamento do vírus tipo Mass, porém, em 1951, ficou comprovada a existência de mais de um sorotipo desse vírus, o Connecticut (JUNGHERR et al., 1956). A partir de 1940, com a expansão da avicultura industrial e aumento da preocupação com as doenças infecciosas, iniciou-se a prevenção da doença causada pelo IBV, por meio do desenvolvimento de programas de vacinação. No primeiro momento, de 1940 a 1970, as vacinas produzidas com estirpes do sorotipo Mass eram as únicas utilizadas pelo mundo. A partir de 1970, com o aumento do isolamento de novas variantes do IBV, surgiu a necessidade do desenvolvimento de vacinas específicas para essas novas estirpes variantes.

Com isso, é possível destacar dois principais marcos na história epidemiológica do IBV: em 1931, o seu primeiro relato, e 1941, ano que marca o início dos programas de vacinação. Esses marcos foram plotados nos gráficos do BSP para avaliar seus possíveis efeitos sobre o tamanho efetivo da população do IBV.

Os dois gráficos globais do gene N e S1 (figura 3) mostram uma diminuição do tamanho efetivo populacional do IBV, contudo, com uma diferença na escala de tempo, no qual o gene S1 remete a uma história mais recente e, portanto, mais contextualizada com as mudanças no cenário da indústria avícola. Outra diferença entre os gráficos de N e S1 está no período após 1941, ou seja, após início dos programas de vacinação contra o IBV, evidenciada por um ligeiro aumento do tamanho efetivo da população no gráfico global de S1 (seta vermelha, figura 3). Esse aumento pode ser atribuído a uma maior pressão de seleção, devido a um controle mais intenso do IBV através da vacinação.

Os gráficos independentes dos grupos filogenéticos do gene S1, S1-I e S1-II (figura 4), mostram importantes mudanças na dinâmica populacional do IBV. O gráfico S1-I, grupo filogenético das s variantes do IBV, evidencia uma diminuição progressiva no tamanho efetivo da população do IBV após 1941. Essa diminuição pode ser atribuída a programas de vacinação adequados contra o IBV, mostrando que as vacinas do tipo Mass foram eficazes para diminuir a população de variantes.

Por outro lado, a partir de 2007, o gráfico de S1-I mostra um pequeno aumento no tamanho efetivo da população de variantes do IBV (seta vermelha, figura 4). Esta mudança pode ser devida à uma pressão imunológica pelo aumento do uso de vacinas com estirpes variantes, recombinação como resultado de infecções mistas ou uma diminuição da prevalência de sorotipos dominantes, como o Mass, consequência do evento de gargalo genético, permitindo essa mudança no padrão populacional do IBV.

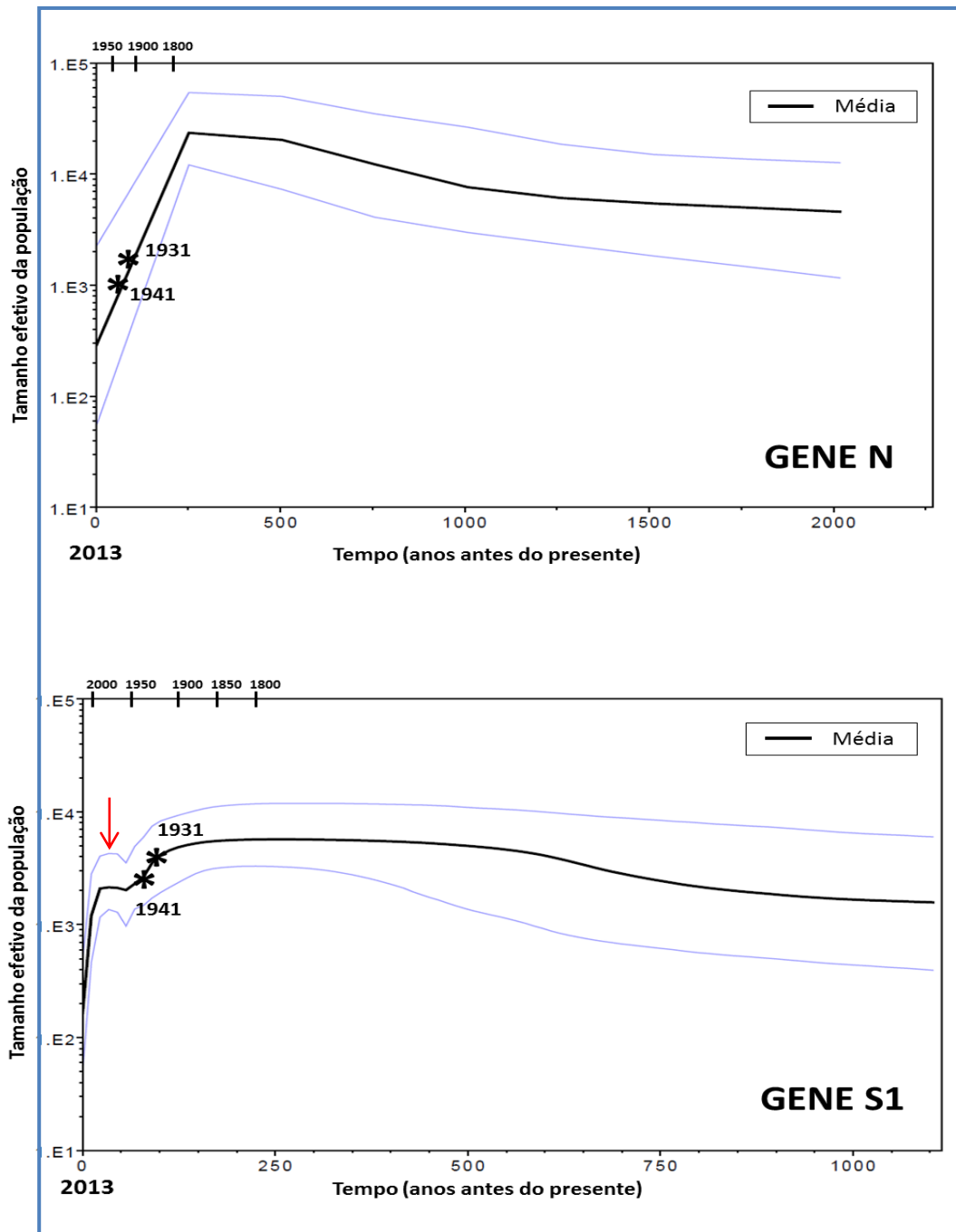


Figura 3: Dinâmica populacional do IBV reconstruída a partir das sequências completas de N e S1. A análise *Bayesian Skyline Plot* (BSP) mostra as mudanças previstas no tamanho efetivo da população (eixo y) ao longo do tempo (eixo x). A média (linha preta) é apresentada com intervalos de 95% de credibilidade (linhas azuis). A seta vermelha indica ligeiro aumento do tamanho efetivo da população no gráfico de S1 após 1941.

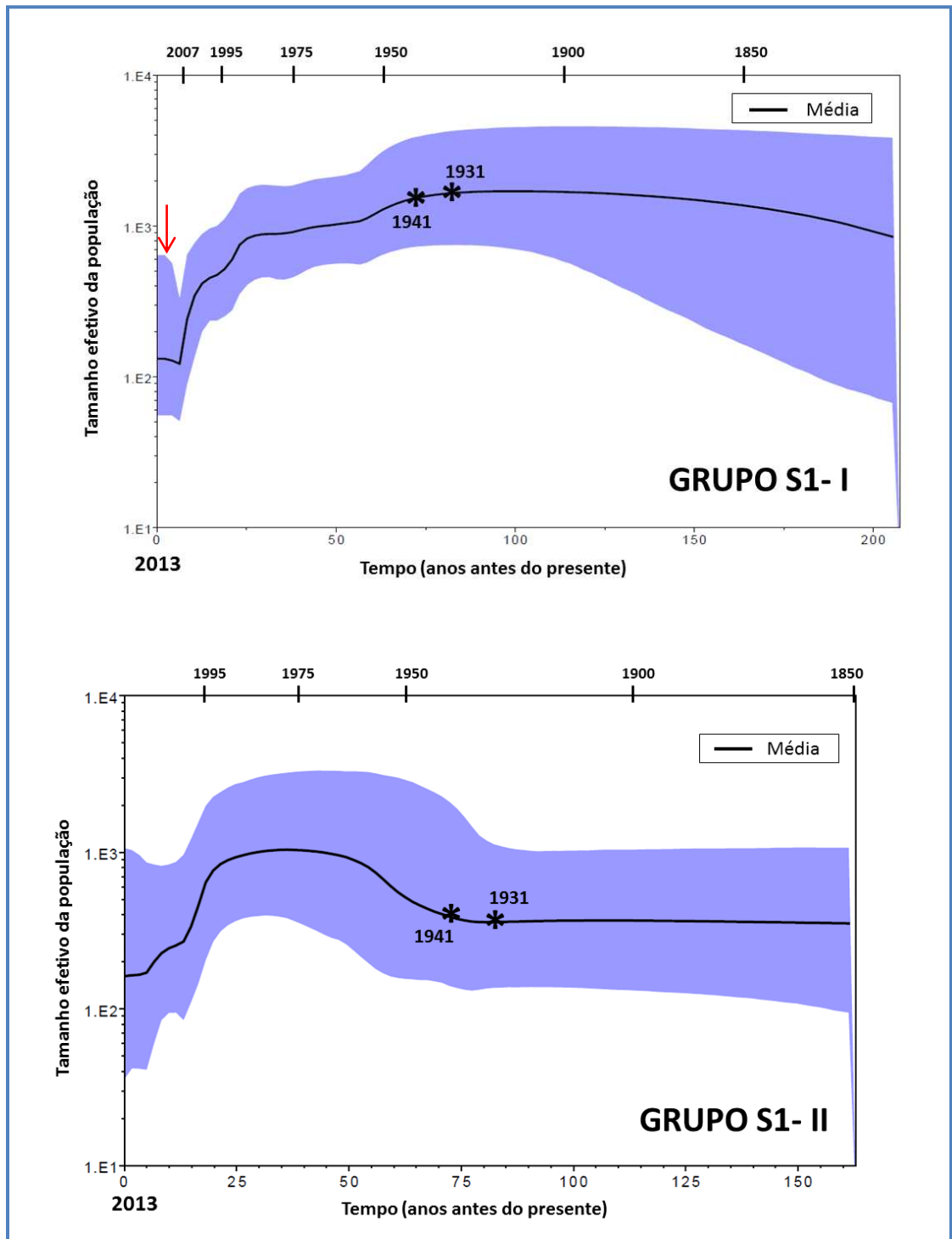


Figura 4: Dinâmica populacional do IBV reconstruída a partir das sequências completas dos dois grupos formados na árvore filogenética de S1 (S1-I e S1-II). A análise *Bayesian Skyline Plot* (BSP) mostra as mudanças previstas no tamanho efetivo da população (eixo y) ao longo do tempo (eixo x). A média (linha preta) é apresentada com intervalos de 95% de credibilidade (área azul). A seta vermelha indica ligeiro aumento do tamanho efetivo da população no gráfico de S1-I, grupo das estirpes variantes do IBV, a partir de 2007.

Estudos de prevalência dos tipos virais do IBV já mostram essa mudança no padrão populacional. Análises filogenéticas do gene S1 de 220 isolados chineses mostraram que 54,1% desses isolados pertenciam o tipo LX4 e QX e somente 8,6% eram do sorotipo Mass (HAN, et al., 2011). Outro estudo realizado por Dolz et al. (2008), mostrou que 78% dos isolados investigados na Espanha eram variantes e somente 11,5% eram do tipo Mass. No Brasil, um estudo recente, revelou que a maioria dos planteis estão infectados pelo genótipo brasileiro variante, o BR. As regiões brasileiras Nordeste, Sul e Centro-Oeste apresentaram, respectivamente, 70.9%, 60%, 68.2% de prevalência do tipo variante BR (BALESTRIN et al., 2014).

Esses resultados, possivelmente, indicam que os protocolos vacinais, usados no presente, não estão sendo mais eficazes e que medidas diferentes de controle devem ser planejadas para impedir que a população de variantes do IBV continue a crescer.

O gráfico de S1-II, grupo filogenético das estirpes tipo Mass, evidencia um aumento do tamanho populacional do IBV de 1941 até 1995. Esse aumento da população tipo Mass pode ser atribuído a eventos de re-isolamento de estirpes vacinais ou por pressão imunológica pelo amplo uso de vacinas do tipo Mass. A partir de meados da década de 90, o gráfico torna-se semelhante ao gráfico de S1-I, evidenciando uma queda brusca no tamanho efetivo da população. A década de 90 foi marcada pela expansão das técnicas moleculares de diagnóstico viral, aumentando o isolamento de estirpes do IBV e, por conseguinte, levando ao aprimoramento dos métodos de controle do IBV no mundo.

5.3.5 Dispersão viral

Para reconstruir as rotas de dispersão espacial do IBV, foram analisados os bancos de dados de sequências completas do gene N e S1 das estirpes descritas anteriormente, entre 1937 a 2013. Pelo fato do gene N ser menos variável que o gene S1, a raiz da árvore de N encontra-se consideravelmente mais profunda que a árvore de S1, demonstrado por uma escala de tempo que se estende mais no passado para o gene N (N: 7.000 anos; S1: 4.000 anos). Com isso, a localização da raiz das árvores mostrou-se diferente nos resultados obtidos para cada gene. Para o gene N, a China foi o local de onde todas as estirpes atuais do IBV se originaram. Por outro lado, o gene S1 mostrou que a raiz de todos os isolados atuais do IBV originou nos Estados Unidos (figuras 5 e 6).

Apesar das diferentes escalas de tempo para S1 e N, foi possível demonstrar os principais centros de dispersão do IBV no mundo. Esses principais centros de dispersão incluem a China, Estados Unidos, Brasil, Taiwan e Europa. A África, Oceania, Japão, Coréia do Sul e Canadá não se apresentaram como centros de dispersão, pois não foi evidenciada mais de uma linha de conexão originada nesses locais, ou seja, essas regiões não promoveram a dispersão do IBV para outros locais.

Considerando que pode existir uma correlação entre as rotas de dispersão do IBV e o comércio internacional de aves vivas, o Canadá, mesmo estando entre os quinze maiores exportadores de aves vivas no mundo, não foi considerado um centro de dispersão (COMTRADE, 2015). Este resultado pode ser consequência de um bom controle sanitário do material genético exportado ou devido a um viés de amostragem, visto que existem poucas sequências gênicas completas canadenses do IBV disponíveis no *GenBank*.

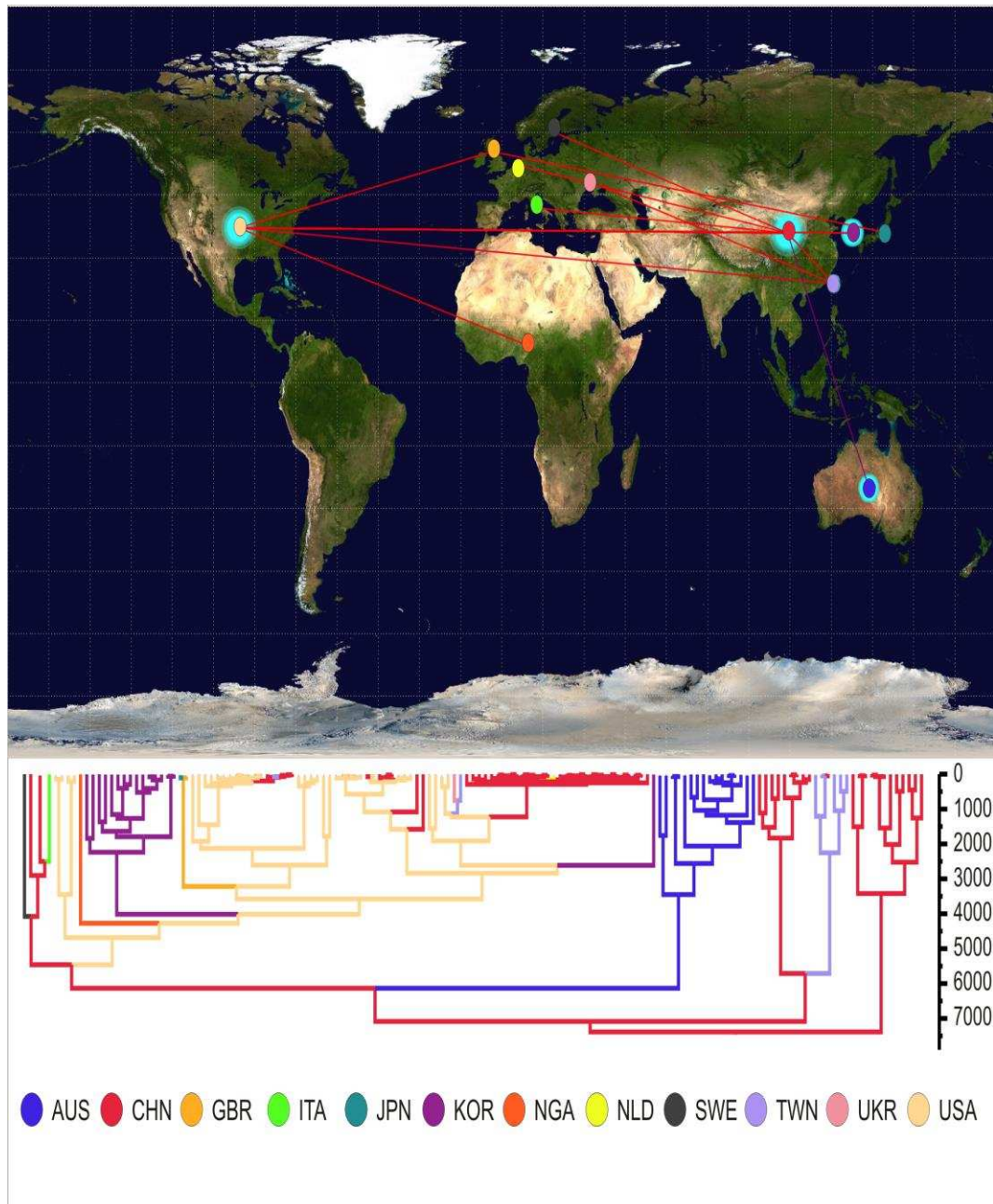


Figura 5: Resumo da dispersão espacial do IBV com base em 142 seqüências completas do gene N obtido através da análise de *Relaxed Random Walk* (RRW). O RRW é um método que utiliza a Inferência Bayesiana para inferir, visualizar e reconstruir os padrões de dispersão de um organismo ao longo de sua história evolutiva. As linhas de conexão entre os países representam os ramos da árvore e os círculos coloridos representam cada país amostrado na análise de RRW para o gene N.

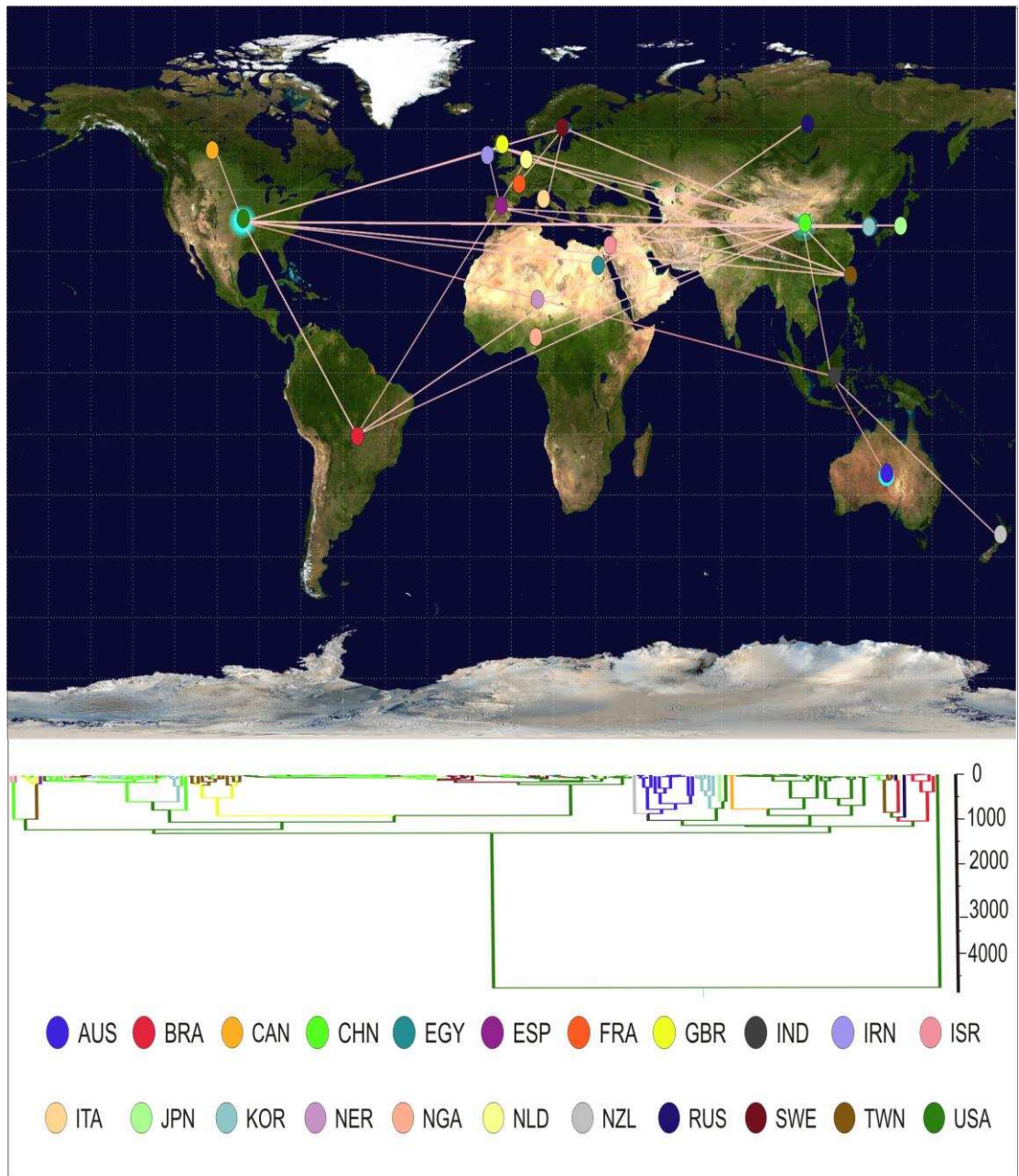


Figura 6: Resumo da dispersão espacial do IBV com base em 224 sequências completas do gene S1 obtido através da análise de *Relaxed Random Walk* (RRW). O RRW é um método que utiliza a Inferência Bayesiana para inferir, visualizar e reconstruir os padrões de dispersão de um organismo ao longo de sua história evolutiva. As linhas de conexão entre os países representam os ramos da árvore e os círculos coloridos representam cada país amostrado na análise de RRW para o gene S1.

Segundo estatísticas da United Nations Comtrade Database (<http://comtrade.un.org/>), a China, até o começo da década de 90, foi um país predominantemente exportador de aves vivas, ocupando a quarta posição entre 1990 e 1994. Atualmente, os Estados Unidos, Brasil e alguns países da Europa podem ser considerados regiões geográficas, majoritariamente, exportadoras de aves vivas e, portanto, possíveis dispersoras de agentes infecciosos que circulam na indústria avícola.

Analisando o padrão de dispersão das estirpes da China, obtido por meio da análise conjunta dos genes S1 e N, foi observado que a China, possivelmente, disseminou o vírus, em diferentes momentos da história evolutiva do IBV, para todos os continentes, incluindo países como os EUA, Taiwan, Coreia do Sul, Japão, Itália, Holanda, Suécia, Espanha, Inglaterra, Nigéria, Níger, Brasil, Indonésia e Austrália. Contudo, a China foi destino de várias rotas de dispersão originadas em outros países como os EUA, Taiwan, Coreia do Sul, Inglaterra e Suécia (figura 7).

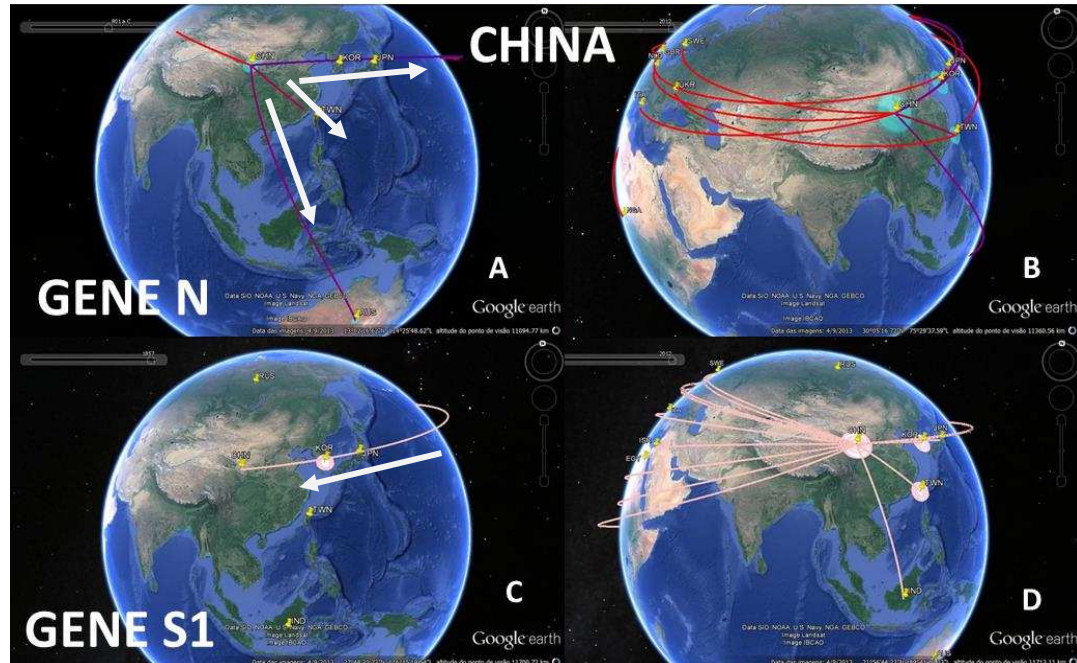


Figura 7: Padrão de dispersão espacial do IBV por centro de dispersão ou região geográfica. A China pode ser considerada um centro de dispersão do IBV, com base nas análises RRW para o gene N (B) e S1 (D). (A) Na análise RRW do gene N, a China foi o ponto de origem de todas as estirpes atuais do IBV. (C) Na análise RRW do gene S1, os Estados Unidos foi o ponto de

origem de todas as estirpes atuais do IBV. A figura 7C ilustra que a China foi o primeiro destino da estirpe americana antiga.

O padrão de dispersão dos EUA segue o mesmo modelo da China, no qual é ponto de origem de várias rotas de dispersão destinadas a países da Ásia, Europa, África, Oceania, Brasil e Canadá. Todavia, foi destino de rotas originadas somente no Brasil e Canadá (figura 8).

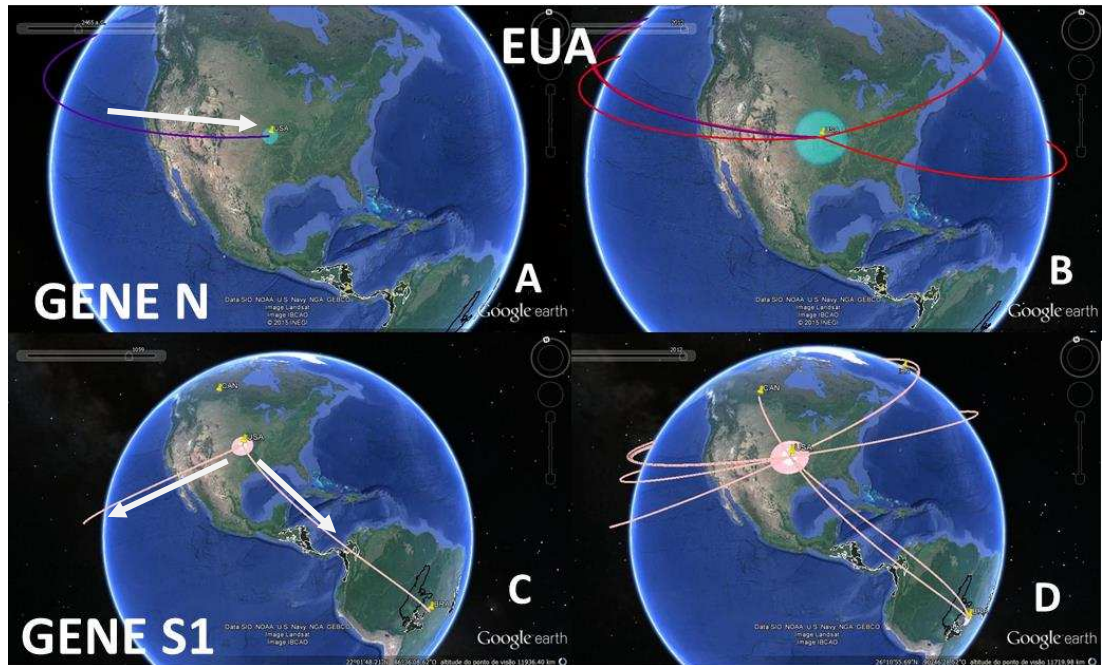


Figura 8: Padrão de dispersão espacial do IBV por centro de dispersão ou região geográfica. Os Estados Unidos pode ser considerado um centro de dispersão do IBV, com base nas análises RRW para o gene N (B) e S1(D). (C) Na análise RRW do gene S1, os Estados Unidos foi o ponto de origem de todas as estirpes atuais do IBV. (A) Na análise RRW do gene N, a China foi o ponto de origem de todas as estirpes atuais do IBV. A figura 8A ilustra que os Estados Unidos foi o primeiro destino da estirpe chinesa antiga.

O continente europeu é destino de rotas de dispersão de países da Ásia, dos EUA e o Brasil. Apesar da União Européia ser uma das maiores exportadoras de aves vivas, não se apresentou com uma grande dispersora do IBV, concentrando suas rotas de dispersão dentro da Europa e para alguns países asiáticos (figura 9).

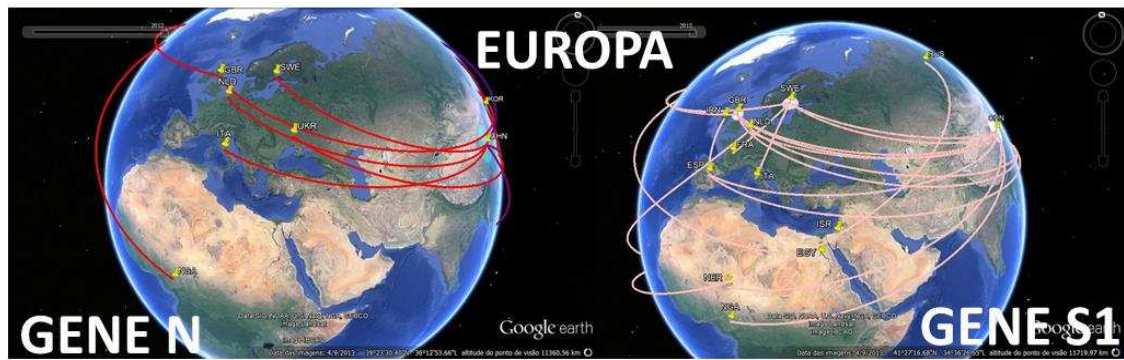


Figura 9: Rotas de dispersão do IBV, incluindo pontos de origem e destino, na Europa para os genes N e S1. Países da África também estão ilustrados nessa figura.

Na Oceania, em particular a Austrália, o IBV sempre evolui de forma independente, devido ao seu isolamento geográfico, por não importar aves vivas desde 1985 e pelo fato do comércio de aves vivas se restringir, principalmente, a países desse continente. Analisando, ao longo do tempo, as rotas de dispersão para a Oceania, pode-se inferir que as estirpes atuais dessa região geográfica foram originadas a partir de estirpes asiáticas e americanas do IBV (figura 10).

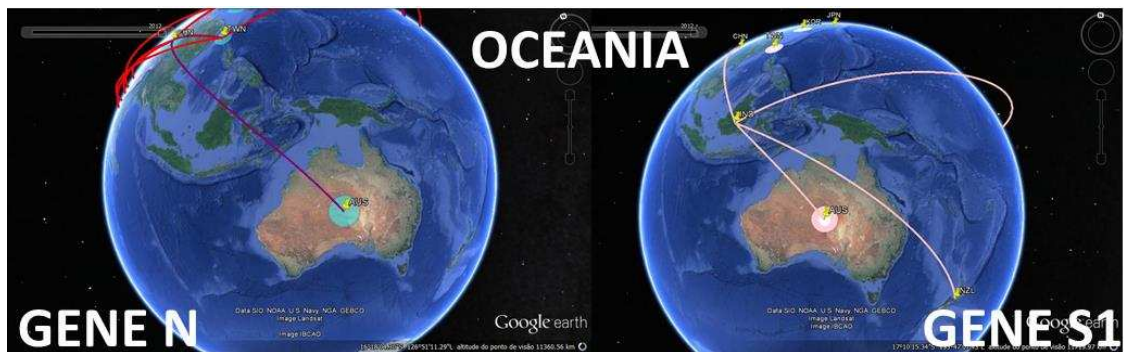


Figura 10: Rotas de dispersão do IBV, incluindo pontos de origem e destino, na Oceania para os genes N e S1. De acordo com as análises RRW para os genes N e S1, as estirpes atuais da Oceania foram originadas a partir de estirpes asiáticas e americanas do IBV.

Taiwan pode ser considerado um centro de dispersão do IBV, pois foi origem de dispersão para a Inglaterra, Espanha e China. O Brasil, mesmo com um pequeno número de sequências completas do gene S1 disponíveis no *GenBank* (tabela 1), nas análises RRW se mostrou como um dos principais centros de dispersão para a Europa e

América do Norte (figura 11). Por outro lado, mesmo a Coréia do Sul englobando muitos dos isolados analisados, não foi possível considerar este país como um centro de dispersão do IBV. Logo, podemos concluir que a amostragem não foi um viés nesse estudo.



Figura 11: Rotas de dispersão do IBV, incluindo pontos de origem e destino, em Taiwan e no Brasil para o gene S1.

Analisando os resultados das análises de dispersão viral do gene S1 e N de forma conjunta, podemos reconstruir um padrão de dispersão do IBV ao longo de sua história evolutiva. O ponto de origem de todas as estirpes atuais do IBV foi a China que, após dispersão local, disseminou para os Estados Unidos e, por conseguinte, se dispersou para diferentes países e continentes até alcançar a ampla distribuição mundial encontrada nos dias atuais.

A questão de como o vírus saiu da China e migrou para os EUA, antes do seu primeiro relato em 1931, é um evento desconhecido, pois parte da premissa que não existia ainda o modelo atual de comércio de aves vivas entre esses países. Hipóteses como dispersão do IBV através de aves migratórias ou carregamentos de aves em navios chineses com destino ao “Novo Mundo”, no período pós-colombiano, podem ser consideradas. A expansão europeia para as Américas, entre o século XV e o início do século XVII, levou ao surgimento dos impérios coloniais e, conseqüentemente, ampliou o comércio entre o Velho e o Novo Mundo, produzindo o chamado "intercâmbio

colombiano". Este evento envolveu a transferência de plantas, animais, alimentos e populações humanas (incluindo os escravos) entre os hemisférios ocidental e oriental. Esse fato histórico pode servir de fundamento para a hipótese levantada sobre carregamentos de aves em navios.

5.4 CONCLUSÕES

Importantes parâmetros para estudo da evolução viral foram analisados nesse trabalho para os genes S1 e N do IBV, incluindo estimativas de eventos de recombinação, taxa de mutação, pressão de seleção, dinâmica populacional e dispersão espacial. Os resultados apontam que, na ausência de uma elevada taxa de mutação e pelo fato da seleção purificadora ser a principal força de seleção natural no IBV, o processo de recombinação tem um papel fundamental na evolução do IBV. As análises de pressão seletiva foram consistentes com os valores encontrados das taxas de mutação, visto que os baixos valores das taxas de substituição sinônima (dS) obtidos para o gene S1 e N também sugerem uma baixa taxa de mutação.

As análises de dinâmica populacional sugerem que, até meados da década de 2000, os diferentes programas de vacinação, juntamente com os métodos de biossegurança, foram eficazes para controlar o crescimento do tamanho efetivo populacional do IBV. Contudo, a partir de 2007, o aumento da população de variantes do IBV, pode indicar que os protocolos vacinais, usados no presente, não estão sendo mais eficazes e que medidas diferentes de controle devem ser planejadas para impedir que a população de variantes continue a crescer. Dentre tais medidas, deve ser considerado o desenvolvimento de vacinas mais seguras, que não utilizem vírus vivo

atenuado, já que esse tipo de vacina pode aumentar a probabilidade da ocorrência de eventos de recombinação entre diferentes estirpes do IBV.

Além disso, medidas de controle e fiscalização do comércio de aves vivas devem ser continuamente praticadas para minimizar a dispersão do IBV por meio desse comércio entre os países. A dispersão do IBV através das aves migratórias não foi objeto de estudo deste trabalho, mas sua ocorrência e relevância ainda necessita ser elucidada para traçar medidas de controle mais eficazes contra o IBV.

Por último, os resultados das análises de dispersão viral do gene S1 e N foram analisados de forma conjunta a fim de reconstruir um padrão de dispersão do IBV ao longo de sua história evolutiva. De acordo com os resultados, o ponto de origem de todas as estirpes atuais do IBV foi a China que, após dispersão local, disseminou para os Estados Unidos e, por conseguinte, se dispersou para diferentes países e continentes até alcançar a ampla distribuição mundial encontrada nos dias atuais. Os principais centros de dispersão do IBV encontrados foram a China, Estados Unidos, Brasil, Taiwan e Europa.

5.5 REFERÊNCIAS

ALVARADO, I. R. P.; VILLEGAS, N. M.; JACKWOOD, M. W. Molecular Characterization of Avian Infectious Bronchitis Virus Strains Isolated in Colombia During 2003. **Avian Diseases**, v. 49, n.4, p. 494-499, 2005.

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, p.495–499, 2009.

BALESTRIN, E.; FRAGA, A.P.; IKUTA, N.; CANAL, C.W.; FONSECA, A.S.; LUNGE, V.R. Infectious bronchitis virus in different avian physiological systems-a field study in Brazilian poultry flocks. **Poult Sci.**, v.93, n.8, p. 1922-1929, 2014.

BONI, M. F.; POSADA, D.; FELDMAN, M. W. An exact nonparametric method for inferring mosaic structure in sequence triplets. **Genetics**, v.176, p.1035-1047, 2007.

BOUCKAERT, R.; HELED, J.; KÜHNERT, D.; VAUGHAN, T.; WU, C-H.; XIE, D.; SUCHARD, MA.; RAMBAUT, A.; DRUMMOND, A. J. BEAST 2: A Software Platform for Bayesian Evolutionary Analysis. **PLoS Computational Biology**, v. 10, doi:10.1371/journal.pcbi.1003537, 2014.

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

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

CASTRESANA, J. Selection of conserved blocks from multiple alignments for their use in phylogenetic analysis. **Molecular Biology and Evolution**, v.17, p. 540-552, 2000.

CAVANAGH, D.; DAVIS, P.J.; COOK, J.K.A. Infectious bronchitis virus: evidence for recombination within the Massachusetts serotype, **Avian Pathol.**, v.21, p.401–408, 1992.

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

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.; PICAULT, J.P.; GOUGH, R.; HESS, M.; MAWDITT, K.; 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 Pathol.**, v.34, p.20–25, 2005.

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

COMTRADE – **United Nations Comtrade Database**. Disponível em: <<http://comtrade.un.org/>>. Acesso em: maio de 2015.

DARRIBA, D.; TABOADA, G.L.; DOALLO, R.; POSADA, D. jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. **Nature Methods**, v.9, n.8, p.772, 2012.

DENISON, M.R.; GRAHAM, R.L.; DONALDSON, E.F.; ECKERLE, L.D.; BARIC, R.S. Coronaviruses: an RNA proofreading machine regulates replication fidelity and diversity. **RNA Biol.**, v.8, p. 270–279, 2011.

DOLZ, R.; PUJOLS, J.; ORDÓÑEZ, G.; PORTA, R.; MAJÓ, N. Molecular epidemiology and evolution of avian infectious bronchitis virus in Spain over a fourteen-year period. **Virology**, v. 374, p.50–59, 2008.

DRUMMOND, A.J.; RAMBAUT, A.; SHAPIRO, B.; PYBUS, O.G. **Mol. Biol. Evol.**, v.22, p.1185-1192, 2005.

DRUMMOND, A.J.; SUCHARD, M.A.; XIE, D.; RAMBAUT, A. Bayesian phylogenetics with BEAUti and the BEAST 1.7. **Mol Biol Evol.** doi: 10.1093/molbev/mss075, 2012.

DUFFY, S.; SHACKELTON, L.A.; HOLMES, E.C. Rates of evolutionary change in viruses: patterns and determinants. **Nat. Rev.**, v. 9, p. 267–276, 2008.

GALLARDO, R. A.; VAN SANTEN, V. L.; TORO, H. Host intraspatial selection of *Infectious bronchitis virus* populations. **Avian Dis.**, v. 54, p. 807–813, 2010.

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 Pathol.**

doi:10.1080/03079457.2012.702889, 2012.

HAN, Z.; SUN, C.; YAN, B.; ZHANG, X.; WANG, Y.; LI, C.; ZHANG, Q.; MA, Y.; SHAO, Y.; LIU, Q.; KONG, X.; LIU, S. A 15-year analysis of molecular epidemiology of avian infectious bronchitis coronavirus in China. **Infection, Genetics and Evolution**, v.11, p. 190–200, 2011.

HANADA, K.; SUZUKI, Y.; GOJOBORI, T. A large variation in the rates of synonymous substitution for RNA viruses and its relationship to a diversity of viral infection and transmission modes. **Mol. Biol. Evol.**, v.21, p.1074–1080, 2004.

HOLMES, E.C.; RAMBAUT, A. Viral evolution and the emergence of SARS coronavirus. **Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.**, v. 359, p.1059–1065, 2004

HOLMES, E.C. **The Evolution and Emergence of RNA Viruses**. 1sted. New York: Oxford University Press Inc., 2009.

HUELSENBECK, J. P.; RONQUIST, F. MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. **Bioinformatics**, v.17, p.754-755, 2001.

HUGHES, A.L. **Adaptive evolution of genes and genomes**. New York: Oxford University Press, 1999.

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. Review of Infectious Bronchitis Virus Around the World. **Avian Diseases**, v.56, p. 634-641, 2012.

JACKWOOD, M.W.; HALL, D.; HANDEL, A. Molecular evolution and emergence of avian gammacoronaviruses. **Infection, Genetics and Evolution**, v.12, p. 1305–1311, 2012.

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, p.259–271, 1995.

JUNGHER, E.L., CHOMIAK, T.W.; LUGINBUHL, R.E. Immunologic differences in strains of infectious bronchitis virus. In: **Proceedings of 60th Annual Meeting of the United States Livestock Sanitary Association**. Chicago. Anais...1956, p. 203-209.

KILBOURNE, E. D. Host determination of viral evolution: a variable tautology. In: **The evolutionary biology of viruses**. New York: Raven Press Ltd., 1994, p. 253–271.

KORBER, B. HIV Signature and Sequence Variation Analysis. In: **Computational Analysis of HIV Molecular Sequences**. Holanda: Kluwer Academic Publishers, 2000, Cap. 4, p. 55-72.

KOTTIER, S.A.; CAVANAGH, D.; BRITTON, P. Experimental evidence of recombination in coronavirus *Infectious bronchitis virus*. **Virology**, v.213, p.569–580, 1995.

KUSTERS, J.G.; JAGER, E.J.; LENSTRA, J.A.; KOCH,G.; POSTHUMUS, W.P.;MELOEN, R.H.; VAN DER ZEIJST, B.A. Analysis of an immunodominant region of Infectious bronchitis virus. **J. Immunol.**, v.143, p.2692-2698, 1989.

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

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

LEMEY, P.; RAMBAUT, A.; DRUMMOND, A.J.; SUCHARD, M.A. Bayesian Phylogeography Finds Its Roots. **PLoS Comput Biol.**, v. 5, p. 1-16, 2009.

LIM , T.; LEE, H.; LEE, D.; LEE, Y.; PARK, J.; YOUN, H.; KIM, M.; LEE, J.; PARK, S.; CHOI, I.; SONG, C. An emerging recombinant cluster of nephropathogenic strains of avian infectious bronchitis virus in Korea. **Infection, Genetics and Evolution**, v.11, p. 678–685, 2011.

LIU, X.; MA, H.; XU, Q.; SUN, N.; HAN, Z.; SUN, C.; GUO, H., SHAO, Y.; KONG, X.; LIU, S. Characterization of a recombinant coronavirus infectious bronchitis virus with distinct S1 subunits of spike and nucleocapsid genes and 3' untranslated region. **Vet Microbiol.**, v.162, p. 429-436, 2013.

LIU, S.; XU, Q.; HAN, Z.; LIU, X.; LI, H.; GUO, H.; SUN, N.; SHAO, Y.; KONG, X. Origin and characteristics of the recombinant novel avian infectious bronchitis coronavirus isolate ck/CH/LJL/111054. **Infection, Genetics and Evolution**, v.23, p.189–195, 2014.

MAGIORKINIS, G.; MAGIORKINIS, E.; PARASKEVIS, D.; VANDAMME, A.M.; VAN RANST, M.; MOULTON, V.; HATZAKIS, A. Phylogenetic analysis of the full-length SARS-CoV sequences: evidence for phylogenetic discordance in three genomic regions. **J. Med. Virol.** v.74, p.369–372, 2004.

MARTIN, D., RYBICKI, E. RDP: detection of recombination amongst aligned sequences. **Bioinformatics**, v.16, p.562-563, 2000.

MARTIN, D.P., LEMEY, P., LOTT, M., MOULTON, V., POSADA, D., LEFEUVRE, P. RDP3: a flexible and fast computer program for analyzing recombination. **Bioinformatics** v.26, p. 2462-2463, 2010.

MASTERS, P.S. The molecular biology of coronaviruses. **Adv. Virus Res.**, v.66, p. 193-292, 2006.

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, p.225–234, 2011.

PADIDAM, M.; SAWYER, S.; FAUQUET, C. M. Possible emergence of new geminiviruses by frequent recombination. **Virology**, v. 265, p. 218-225, 1999.

POSADA, D.; CRANDALL, K.A. Evaluation of methods for detecting recombination from DNA sequences: computer simulations. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 98, p.13757-13762, 2001.

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

SILVA, F. M.F.; VIDIGAL, P.M.P.; MYRRHA, L. W.; FIETTO, J. L.R.; SILVA JR., A.; ALMEIDA, M. R. Tracking the molecular epidemiology of Brazilian Infectious bursal disease virus (IBDV) isolates. **Infection, Genetics and Evolution**, v.13, p.18–26, 2013.

SMITH, J.M., Analyzing the mosaic structure of genes. **J Mol Evol.**, v.34, p.126-129, 1992.

SUCHARD, P.; LEMEY, M. **Estimating rates and dates from time-stamped sequences - a hands-on practical tutorial.** Julho/2014. Disponível em:>https://perswww.kuleuven.be/~u0036765/SISMID/handouts_files/2014_SISMID_14_05.pdf> Acesso em: Abril, 2015.

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, p. 1777–1799, 2011.

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 Pathol.**, v.35, p.1–10, 2006.

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 Dis.**, v.56, p. 501–508, 2012a.

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, 2012b.

VAN SANTEN, V. L.; TORO, H. Rapid selection in chickens of subpopulations within ArkDPI-derived infectious bronchitis virus vaccines. **Avian Pathol.**, v.37, p.293–306, 2008.

VIDIGAL, P. M. P.; MAFRA, C. L.; SILVA, F. M. F.; FIETTO, J. L. R.; JR, A. S.; ALMEIDA, M. R. Tripping over emerging pathogens around the world: a phylogeographical approach for determining the epidemiology of Porcine circovirus-2 (PCV-2), considering global trading. **Virus Research**, v.163, p.320-327, 2012.

WANG, L.; JUNKER, D.; COLLISSON, E.W. Evidence of natural recombination within the S1 gene of Infectious bronchitis virus. **Virology**, v.192, p.710–716, 1993.

5.6 MATERIAL SUPLEMENTAR

Tabela S1: Sequências completas de S1

Agrupamento por país e por data de isolamento - Sequências completas de S1			
Número GenBank	País de Origem	Sigla	Data Isolamento
DQ490206	Austrália	AUS	1962
DQ490214	Austrália	AUS	1971
DQ490216	Austrália	AUS	1971
DQ490209	Austrália	AUS	1973
DQ490208	Austrália	AUS	1975
DQ490210	Austrália	AUS	1976
DQ490218	Austrália	AUS	1990
DQ490211	Austrália	AUS	1999
DQ490215	Austrália	AUS	2002
DQ490217	Austrália	AUS	2002
DQ490205	Austrália	AUS	2006
DQ490213	Austrália	AUS	2006
DQ490221	Austrália	AUS	2006
JN983807	Austrália	AUS	2010
JX182775	Brasil	BRA	1975
JX182790	Brasil	BRA	1978
JX182789	Brasil	BRA	1981
JX182773	Brasil	BRA	1987
JX182770	Brasil	BRA	1989
JX182771	Brasil	BRA	1989

JX182774	Brasil	BRA	2008
JX182776	Brasil	BRA	2008
JX182778	Brasil	BRA	2008
JX182779	Brasil	BRA	2008
JX182780	Brasil	BRA	2008
JX182783	Brasil	BRA	2009
JX569792	Brasil	BRA	2010
AF349620	Canadá	CAN	2001
AF349621	Canadá	CAN	2001
KC008600	China	CHN	1985
DQ068701	China	CHN	1997
EU714028	China	CHN	1997
AF227438	China	CHN	1998
AF286302	China	CHN	1998
AF286303	China	CHN	1998
AY189157	China	CHN	1999
AY180958	China	CHN	2001
AY277632	China	CHN	2001
FJ829881	China	CHN	2001
AY278246	China	CHN	2002
AY702085	China	CHN	2003
Y702975	China	CHN	2003
AY846836	China	CHN	2004
AY856348	China	CHN	2004
FJ829875	China	CHN	2005
FJ829872	China	CHN	2006
FJ829876	China	CHN	2006
FJ829877	China	CHN	2006
FJ829873	China	CHN	2007
FJ829878	China	CHN	2007
HM245923	China	CHN	2007
JF274479	China	CHN	2007
EU817497	China	CHN	2008
FJ829880	China	CHN	2008
KF853202	China	CHN	2008
JF330899	China	CHN	2009
JF732903	China	CHN	2009
KJ425503	China	CHN	2009
KJ425504	China	CHN	2009
KJ425508	China	CHN	2009
JF330898	China	CHN	2010
JF828980	China	CHN	2010
JF828981	China	CHN	2010
JF951368	China	CHN	2010

JF951370	China	CHN	2010
JF951374	China	CHN	2010
JF951376	China	CHN	2010
JX840411	China	CHN	2010
JX195176	China	CHN	2011
KC136209	China	CHN	2011
KF663561	China	CHN	2011
KJ425485	China	CHN	2011
KJ425487	China	CHN	2011
KJ425488	China	CHN	2011
KJ425489	China	CHN	2011
KJ425490	China	CHN	2011
KJ425491	China	CHN	2011
KJ425505	China	CHN	2011
KJ425506	China	CHN	2011
KJ425510	China	CHN	2011
KJ425512	China	CHN	2011
KJ435286	China	CHN	2011
KJ469737	China	CHN	2011
KF574761	China	CHN	2012
KJ425486	China	CHN	2012
KJ425492	China	CHN	2012
KJ425493	China	CHN	2012
KJ425494	China	CHN	2012
KJ425495	China	CHN	2012
KJ435285	China	CHN	2012
KJ469739	China	CHN	2012
KF377577	China	CHN	2013
KF696629	China	CHN	2013
KJ425496	China	CHN	2013
KJ425497	China	CHN	2013
KJ425498	China	CHN	2013
KJ425499	China	CHN	2013
KJ425500	China	CHN	2013
KJ425501	China	CHN	2013
KJ425502	China	CHN	2013
KJ425507	China	CHN	2013
FJ807932	Coréia do Sul	KOR	1986
JQ920406	Coréia do Sul	KOR	1990
JQ977698	Coréia do Sul	KOR	1991
AY257062	Coréia do Sul	KOR	2001
AY790368	Coréia do Sul	KOR	2001
AY257068	Coréia do Sul	KOR	2002
FJ807929	Coréia do Sul	KOR	2003

JQ977697	Coréia do Sul	KOR	2008
JQ920381	Coréia do Sul	KOR	2010
JQ920397	Coréia do Sul	KOR	2011
JQ920399	Coréia do Sul	KOR	2011
JQ920400	Coréia do Sul	KOR	2011
JQ920402	Coréia do Sul	KOR	2011
JQ920403	Coréia do Sul	KOR	2011
DQ487085	Egito	EGY	2003
DQ064802	Espanha	ESP	2000
DQ064815	Espanha	ESP	2000
M95169	Estados Unidos	USA	1937
GQ504725	Estados Unidos	USA	1941
GU393336	Estados Unidos	USA	1954
GU361608	Estados Unidos	USA	1956
GU393337	Estados Unidos	USA	1956
GU393334	Estados Unidos	USA	1960
L18989	Estados Unidos	USA	1962
GU393338	Estados Unidos	USA	1964
FJ904720	Estados Unidos	USA	1965
JQ964060	Estados Unidos	USA	1965
JQ964061	Estados Unidos	USA	1965
JQ964062	Estados Unidos	USA	1965
JQ964063	Estados Unidos	USA	1965
JQ964065	Estados Unidos	USA	1965
JQ964066	Estados Unidos	USA	1965
FJ904716	Estados Unidos	USA	1966
JQ964067	Estados Unidos	USA	1966
JQ964068	Estados Unidos	USA	1966
JQ964069	Estados Unidos	USA	1966
JQ964070	Estados Unidos	USA	1966
JQ964071	Estados Unidos	USA	1966
GU393333	Estados Unidos	USA	1971
FJ904717	Estados Unidos	USA	1972
FJ904721	Estados Unidos	USA	1972
FJ008695	Estados Unidos	USA	1976
FJ904722	Estados Unidos	USA	1979
GQ504720	Estados Unidos	USA	1981
FJ904718	Estados Unidos	USA	1983
NC001451	Estados Unidos	USA	1984
FJ904723	Estados Unidos	USA	1985
FJ904719	Estados Unidos	USA	1991
U49858	Estados Unidos	USA	1993
AF510564	Estados Unidos	USA	1997
DQ458217	Estados Unidos	USA	1998

AF193423	Estados Unidos	USA	1999
AY514485	Estados Unidos	USA	1999
DQ458218	Estados Unidos	USA	2000
EU359656	Estados Unidos	USA	2000
AY113182	Estados Unidos	USA	2001
EU359653	Estados Unidos	USA	2001
EU359654	Estados Unidos	USA	2001
EU359655	Estados Unidos	USA	2001
FJ904715	Estados Unidos	USA	2003
AY561713	Estados Unidos	USA	2004
AY851295	Estados Unidos	USA	2004
DQ830980	Estados Unidos	USA	2006
DQ830981	Estados Unidos	USA	2006
FJ904713	Estados Unidos	USA	2006
EU283073	Estados Unidos	USA	2007
EU283076	Estados Unidos	USA	2007
EU283082	Estados Unidos	USA	2007
EU359642	Estados Unidos	USA	2007
EU359643	Estados Unidos	USA	2007
EU359644	Estados Unidos	USA	2007
EU359645	Estados Unidos	USA	2007
EU359649	Estados Unidos	USA	2007
EU359650	Estados Unidos	USA	2007
EU359651	Estados Unidos	USA	2007
EU359652	Estados Unidos	USA	2007
EU359658	Estados Unidos	USA	2007
GQ484958	Estados Unidos	USA	2007
EF079118	França	FRA	2002
KF188436	Índia	IND	2013
AJ618984	Inglaterra	GBR	1995
AF093793	Inglaterra	GBR	1998
AF093794	Inglaterra	GBR	1998
HQ842710	Irlanda	IRN	2002
DQ400359	Israel	ISR	2004
FN430414	Itália	ITA	2005
EF079117	Itália	ITA	2006
M21515	Japão	JPN	1983
AY296744	Japão	JPN	1993
AY296746	Japão	JPN	1995
FN182272	Níger	NER	2007
FN430415	Nigéria	NGA	2006
FJ888351	Nova Zelândia	NZL	1960
X15832	Nova Zelândia	NZL	1989
AF151958	Nova Zelândia	NZL	1999

AJ440783	Rússia	RUS	1999
AJ441314	Rússia	RUS	2002
JN022536	Suécia	SWE	1995
JN022537	Suécia	SWE	1995
JN022538	Suécia	SWE	1995
JN022539	Suécia	SWE	1995
JN022541	Suécia	SWE	1995
JN022540	Suécia	SWE	1997
JN022542	Suécia	SWE	1997
JN022554	Suécia	SWE	1997
JN022543	Suécia	SWE	1999
JN022544	Suécia	SWE	1999
JN022555	Suécia	SWE	1999
JN022549	Suécia	SWE	2009
JN022553	Suécia	SWE	2010
JQ088078	Suécia	SWE	2010
AF250005	Taiwan	TWN	1992
AF250006	Taiwan	TWN	1992
DQ646406	Taiwan	TWN	1992
DQ646404	Taiwan	TWN	1995
AY296742	Taiwan	TWN	1997
DQ646405	Taiwan	TWN	1998
AY606322	Taiwan	TWN	2002
EU822340	Taiwan	TWN	2002
EU822339	Taiwan	TWN	2003
EU822338	Taiwan	TWN	2004
EU822337	Taiwan	TWN	2005
EU822336	Taiwan	TWN	2007

Tabela S2: Sequências completas de N

Agrupamento por País e por Data de Isolamento - Sequências completas de N			
Número GenBank	País de Origem	Sigla	Data Isolamento
DQ490206	Austrália	AUS	1962
DQ490214	Austrália	AUS	1971
DQ490216	Austrália	AUS	1971
DQ490209	Austrália	AUS	1973
DQ490208	Austrália	AUS	1975
DQ490210	Austrália	AUS	1976
DQ490218	Austrália	AUS	1990
DQ490211	Austrália	AUS	1999
DQ490215	Austrália	AUS	2002
DQ490217	Austrália	AUS	2002

JF732918	Austrália	AUS	2003
DQ490205	Austrália	AUS	2006
DQ490213	Austrália	AUS	2006
DQ490221	Austrália	AUS	2006
JN176213	Austrália	AUS	2008
JN983807	Austrália	AUS	2010
EU714028	China	CHN	1997
EU714029	China	CHN	2002
AY646283	China	CHN	2003
AY702085	China	CHN	2003
AY702975	China	CHN	2003
HM245924	China	CHN	2004
HQ848267	China	CHN	2005
JF893452	China	CHN	2005
HM245923	China	CHN	2007
HQ850618	China	CHN	2007
JF274479	China	CHN	2007
KF663560	China	CHN	2007
EU637854	China	CHN	2008
EU817497	China	CHN	2008
FJ807653	China	CHN	2008
KF853202	China	CHN	2008
JF330899	China	CHN	2009
JF732903	China	CHN	2009
JX897900	China	CHN	2009
KF668605	China	CHN	2009
KJ425503	China	CHN	2009
KJ425504	China	CHN	2009
KJ425508	China	CHN	2009
HQ014604	China	CHN	2010
JF330898	China	CHN	2010
JF828981	China	CHN	2010
JX195176	China	CHN	2011
KC506155	China	CHN	2011
KF411040	China	CHN	2011
KF663561	China	CHN	2011
KJ425485	China	CHN	2011
KJ425487	China	CHN	2011
KJ425488	China	CHN	2011
KJ425489	China	CHN	2011
KJ425490	China	CHN	2011
KJ425491	China	CHN	2011
KJ425505	China	CHN	2011
KJ425506	China	CHN	2011

KJ425510	China	CHN	2011
KJ425511	China	CHN	2011
KJ425512	China	CHN	2011
KJ435284	China	CHN	2011
KJ435286	China	CHN	2011
JF828980	China	CHN	2012
KC013541	China	CHN	2012
KC119407	China	CHN	2012
KJ128295	China	CHN	2012
KJ425486	China	CHN	2012
KJ425492	China	CHN	2012
KJ425493	China	CHN	2012
KJ425494	China	CHN	2012
KJ425495	China	CHN	2012
KJ425509	China	CHN	2012
KJ435285	China	CHN	2012
KF377577	China	CHN	2013
KF696629	China	CHN	2013
KJ425496	China	CHN	2013
KJ425497	China	CHN	2013
KJ425498	China	CHN	2013
KJ425499	China	CHN	2013
KJ425500	China	CHN	2013
KJ425501	China	CHN	2013
KJ425502	China	CHN	2013
KJ425507	China	CHN	2013
JQ977698	Coréia do Sul	KOR	1991
AY790344	Coréia do Sul	KOR	2001
AY790345	Coréia do Sul	KOR	2001
AY790347	Coréia do Sul	KOR	2001
AY790355	Coréia do Sul	KOR	2001
AY790356	Coréia do Sul	KOR	2001
JQ693045	Coréia do Sul	KOR	2001
AY790346	Coréia do Sul	KOR	2002
AY790348	Coréia do Sul	KOR	2002
AY790349	Coréia do Sul	KOR	2002
AY790350	Coréia do Sul	KOR	2002
AY790352	Coréia do Sul	KOR	2002
AY790357	Coréia do Sul	KOR	2002
JQ693046	Coréia do Sul	KOR	2002
JQ977697	Coréia do Sul	KOR	2008
JQ693047	Coréia do Sul	KOR	2010
M95169	Estados Unidos	USA	1937
GQ504725	Estados Unidos	USA	1941

GU393336	Estados Unidos	USA	1954
GU393337	Estados Unidos	USA	1956
GU393334	Estados Unidos	USA	1960
GU393338	Estados Unidos	USA	1964
FJ904720	Estados Unidos	USA	1965
JQ964073	Estados Unidos	USA	1965
JQ964074	Estados Unidos	USA	1965
JQ964075	Estados Unidos	USA	1965
JQ964076	Estados Unidos	USA	1965
JQ964077	Estados Unidos	USA	1965
JQ964078	Estados Unidos	USA	1965
JQ964079	Estados Unidos	USA	1965
FJ904716	Estados Unidos	USA	1966
JQ964080	Estados Unidos	USA	1966
JQ964081	Estados Unidos	USA	1966
JQ964082	Estados Unidos	USA	1966
GU393333	Estados Unidos	USA	1971
FJ904717	Estados Unidos	USA	1972
FJ904721	Estados Unidos	USA	1972
FJ008695	Estados Unidos	USA	1976
FJ904722	Estados Unidos	USA	1979
GQ504720	Estados Unidos	USA	1981
FJ904718	Estados Unidos	USA	1983
NC001451	Estados Unidos	USA	1984
FJ904723	Estados Unidos	USA	1985
FJ904719	Estados Unidos	USA	1991
GU393331	Estados Unidos	USA	1991
GU393332	Estados Unidos	USA	1992
U49858	Estados Unidos	USA	1993
GQ504723	Estados Unidos	USA	1998
AY514485	Estados Unidos	USA	1999
FJ904715	Estados Unidos	USA	2003
AY851295	Estados Unidos	USA	2004
FJ904713	Estados Unidos	USA	2006
FN430414	Itália	ITA	2005
M21515	Japão	JPN	1983
FN430415	Nigéria	NGA	2006
FJ888351	Nova Zelândia	NZL	1960
JQ088078	Suécia	SWE	2010
DQ646406	Taiwan	TWN	1992
DQ646404	Taiwan	TWN	1995
GQ229232	Taiwan	TWN	2002
GU386375	Taiwan	TWN	2002
KJ135013	Ucrânia	UKR	2011

6. CONCLUSÕES GERAIS

- Na ausência de uma elevada taxa de mutação e pelo fato da seleção purificadora ser a principal força de seleção natural no IBV, pode-se sugerir que o processo de recombinação tem um papel fundamental na evolução do IBV.

- As análises de dinâmica populacional mostraram que, até meados da década de 2000, os diferentes programas de vacinação, juntamente com os métodos de biossegurança, foram eficazes para controlar o crescimento do tamanho efetivo populacional do IBV. Contudo, a partir de 2007, o aumento da população de variantes do IBV, pode indicar que os protocolos vacinais, usados no presente, não estão sendo mais eficazes e que medidas diferentes de controle devem ser planejadas para impedir que a população de variantes continue a crescer.

- Dentre tais medidas, deve ser considerado o desenvolvimento de vacinas mais seguras, que não utilizem vírus vivo atenuado, já que esse tipo de vacina pode aumentar a probabilidade da ocorrência de eventos de recombinação entre diferentes estirpes do IBV.

- Os resultados das análises de dispersão viral do gene S1 e N foram analisados de forma conjunta, a fim de reconstruir um padrão de dispersão do IBV ao longo de sua história evolutiva. O ponto de origem de todas as estirpes atuais do IBV foi a China que, após dispersão local, disseminou para os Estados Unidos e, por conseguinte, se dispersou para diferentes países e continentes até alcançar a ampla distribuição mundial encontrada nos dias atuais. Os principais centros de dispersão do IBV encontrados foram a China, Estados Unidos, Brasil, Taiwan e Europa.