

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 20/05/2020.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP

CÂMPUS DE JABOTICABAL

**RESPOSTAS IMUNES E PROTEÇÃO INDUZIDAS POR UMA
VACINA VIVA ATENUADA FORMULADA COM UMA
VARIANTE BRASILEIRA DO VÍRUS DA BRONQUITE
INFECCIOSA CONTRA DESAFIOS COM ESTIRPES
HOMÓLOGA E HETERÓLOGA**

Thaiane Coelho Kasmanas

Médica Veterinária

2018

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP

CÂMPUS DE JABOTICABAL

**RESPOSTAS IMUNES E PROTEÇÃO INDUZIDAS POR UMA
VACINA VIVA ATENUADA FORMULADA COM UMA
VARIANTE BRASILEIRA DO VÍRUS DA BRONQUITE
INFECCIOSA CONTRA DESAFIOS COM ESTIRPES
HOMÓLOGA E HETERÓLOGA**

Discente: Thaiane Coelho Kasmanas

Orientador: Prof. Dr. Helio José Montassier

**Dissertação apresentada à Faculdade de
Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp,
Câmpus de Jaboticabal, como parte das
exigências para a obtenção do título de
Mestre em Medicina Veterinária (Patologia
Animal)**

2018

K19r	<p>Kasmanas, Thaianne Coelho</p> <p>Respostas imunes e proteção induzidas por uma vacina viva atenuada formulada com uma variante brasileira do vírus da bronquite infecciosa contra desafios com estirpes homóloga e heteróloga / Thaianne Coelho Kasmanas. -- Jaboticabal, 2018</p> <p>56 p. : il., tabs. + 1 CD-ROM</p> <p>Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal</p> <p>Orientador: Helio José Montassier</p> <p>1. Bronquite Infecciosa das Galinhas. 2. Ciliostase traqueal. 3. Histopatologia. 4. Linhagem GI-11. 5. RT-qPCR. I. Título.</p>
------	--

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal. Dados fornecidos pelo autor(a).

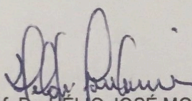
Essa ficha não pode ser modificada.

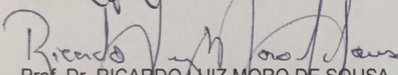
CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

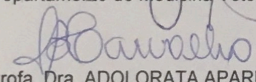
TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: RESPOSTAS IMUNES E PROTEÇÃO INDUZIDAS POR UMA VACINA VIVA ATENUADA FORMULADA COM UMA VARIANTE BRASILEIRA DO VÍRUS DA BRONQUITE INFECCIOSA CONTRA DESAFIOS COM ESTIRPES HOMÓLOGA E HETERÓLOGA

AUTORA: THAIANE COELHO KASMANAS
ORIENTADOR: HÉLIO JOSÉ MONTASSIER

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em MEDICINA VETERINÁRIA, área: Patologia Animal pela Comissão Examinadora:


Prof. Dr. HÉLIO JOSÉ MONTASSIER
Microbiologia / FCAV / UNESP - Jaboticabal


Prof. Dr. RICARDO LUIZ MORO DE SOUSA
Departamento de Medicina Veterinária / FZEA / USP / Pirassununga/SP


Profa. Dra. ADOLORATA APARECIDA BIANCO CARVALHO
Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - Câmpus de Jaboticabal/Unesp

Jaboticabal, 20 de novembro de 2018

DADOS CURRICULARES DA AUTORA

Thaiane Coelho Kasmanas – nascida em 05 de junho de 1990, na cidade de São Paulo-SP. Concluiu o ensino fundamental no Externato São Rafael e o médio, no Agostiniano São José. Graduiu-se em Medicina Veterinária pela Universidade de São Paulo (USP), em dezembro de 2013. Durante a graduação foi bolsista FAPESP na modalidade de Iniciação Científica no período de agosto de 2011 a fevereiro de 2012 na área de Nutrição e Produção Animal sob orientação da Profa. Dra. Cristiane Soares da Silva Araújo, com trabalho intitulado “Redução dos níveis proteicos e relação aminoacídica ideal de dietas para perus de corte durante a fase inicial de criação.” Em julho de 2014 assumiu a função de Médica Veterinária na Seara Alimentos – Nuporanga, SP, onde atuou nos processos agropecuários envolvendo frango de corte, tais como auditoria de clientes, implantação do conceito de biossegurança e suporte da sanidade dos plantéis, depois atuou como sanitarista de matrizes pesadas e incubatório. Em agosto de 2015 assumiu a função de Veterinária Sanitarista do Laboratório de Sanidade Animal da Seara Alimentos na unidade de Nuporanga, SP, período em que contribuiu para a acreditação do laboratório na norma ABNT NBR ISO/IEC 17025:2005, além de participar do desenvolvimento de ferramentas de diagnósticos moleculares, de técnicas convencionais de isolamento e sorologia para diagnóstico viral e bacteriano. Em agosto de 2016, iniciou o curso de mestrado sob orientação do Professor Doutor Helio José Montassier na área de Virologia e Patologia Animal. Em novembro de 2017, assumiu a função de Assistente Técnico na Hipra Saúde Animal, empresa do ramo de vacinas veterinárias com foco na prevenção da saúde animal, onde atuou na área de Postura Comercial dando o suporte técnico necessário à área comercial da empresa. Em Setembro de 2018, passou a atuar na Suiaves Comércio de Produtos Veterinários na função de Assistente Técnico Comercial também na área de Postura Comercial, sendo responsável por atender os clientes na região de São Paulo.

"Doubt is the beginning of wisdom"

Aristotle (398 BC - 322 BC)

Aos meus pais, Roberto Kasmanas Junior e Maria Adelaide G. M. Coelho Kasmanas, que estiveram sempre do meu lado, me apoiando em todas as decisões.

Ao meu irmão, Jonas Coelho Kasmanas, quem me ajudou em todas as dúvidas desta jornada.

À minha amada Meg, que hoje é uma estrelinha, mas que espero que saiba de todo meu amor por ela e como ela foi responsável pelo meu trajeto na Medicina Veterinária.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus porque sem Ele, nada disso seria possível! Só Ele sabe das alegrias e tristezas desta jornada.

Aos meus pais, que sempre são as primeiras pessoas a me apoiarem. Vocês são minha eterna fonte de inspiração, espero poder um dia ser metade do que vocês são pra mim.

Ao meu irmão que, desde pequeno, sempre foi o meu orgulho e, hoje, já me ultrapassou em conhecimento e me ajuda nos problemas mais difíceis. Além de me oferecer sua casa em São Carlos quando precisei.

À minha vó Sofia (*in memoriam*), a quem rezo todas as noites e sua memória se faz presente em toda minha vida.

À minha vó Matilde, por rezar sempre por mim e mesmo de longe me proteger dos males dessa vida.

Ao meu namorado, Lucas Alves Pereira, pela paciência com meu jeito de ser e por aguentar meus piores dias. Obrigada por escolher me acompanhar nesta jornada.

Às minhas amigas Priscila, Dani e Caren, ou melhor, queridinhas, que conheci em Jaboticabal e se tornaram amigas da vida e de gordices.

Aos meus amigos antigos, que foram fonte de diversão e que sem as viagens, festas e parceria a vida não teria tanta graça.

A toda equipe do Laboratório de Sanidade da Seara de Nuporanga, onde aprendi a ser uma pessoa melhor com pessoas que me ajudaram em todos os desafios e com quem sei que posso contar onde quer que eu vá! Em especial a Tati Hass, que foi meu ombro amigo, me ouviu rir e chorar e me ajudou com as análises deste trabalho. Desculpe se te enlouqueci ou te fiz congelar as mãos no ultrafreezer.

Ao meu amigo e colega de trabalho, Filipe Santos Fernando, pela parceria em me apresentar tudo que aprendi sobre laboratório e por ser o grande responsável por eu ter começado o mestrado.

Ao meu orientador, Helio José Montassier, que me aceitou no mestrado mesmo eu já estando trabalhando e me guiou de forma brilhante com todo seu conhecimento. Com você aprendi que a mente que se abre a uma nova ideia jamais voltará ao seu tamanho original. Agradeço também a Dona Fatima, Maria de Fatima Silva

Montassier, que com seu jeito de mãe sempre me acalmou em todas as idas ao laboratório.

Aos membros da banca de qualificação e dissertação, Professor Luis Guilherme, Professora Adolorata, Professora Rosemeire, Professor Ricardo L. M. de Sousa, por sua dedicação imensurável em ajudar e nos fazer melhores.

Aos demais docentes e funcionários da Unesp – Jaboticabal que, de uma forma ou de outra, participaram de minha formação e colaboraram para que este trabalho fosse realizado.

À Seara Alimentos da unidade de Nuporanga, por me permitir realizar o projeto em suas instalações e utilizar sua estrutura para produzir ciência e sonhos.

Aos animais que na sua forma mais inocente me permitiram todo esse conhecimento, em especial a minha gata, Kissen, que ficou do meu lado durante a redação da dissertação, tirando uma soneca.

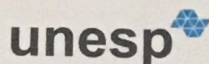
E a todos que colaboraram, direta ou indiretamente, para que eu finalizasse o mestrado.

Muito obrigada!!!

SÚMARIO

	Página
CERTIFICADO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS.....	xii
RESUMO.....	xiii
ABSTRACT.....	xiv
LISTA DE TABELAS.....	xv
LISTA DE FIGURAS.....	xvi
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1. Bronquite Infecciosa Aviária.....	3
2.2. Etiologia e morfologia viral.....	5
2.3. Epidemiologia.....	8
2.4. Diagnóstico.....	10
2.5. Prevenção e controle.....	13
3. HIPÓTESE DE TRABALHO.....	17
4. OBJETIVOS.....	18
4.1. Gerais.....	18
4.2. Específicos.....	18
5. MATERIAL E MÉTODOS.....	19
5.1. Delineamento experimental.....	19
5.2. Inóculo.....	21
5.2.1. Amostra viral.....	21
5.2.2. Propagação viral e determinação da infectividade viral.....	22
5.3. Avaliação da ciliostase.....	22
5.4. Análise histopatológica.....	23
5.5. Carga viral.....	23
5.6. Análise sorológica.....	24
5.7. Análise dos dados.....	25
6. RESULTADOS.....	25
2.1. Avaliação da ciliostase.....	25
6.2. Análise histopatológica.....	27
6.3. Carga viral.....	32

6.4.	Análise sorológica.....	37
7.	DISCUSSÃO.....	38
8.	CONCLUSÕES.....	42
9.	REFERÊNCIAS.....	44



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus de Jaboticabal



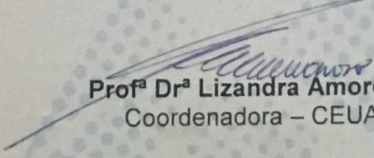
CEUA – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "**Acesso ao nível de proteção vacinal desenvolvida pela estirpe brasileira da bronquite infecciosa frente a desafio homólogo e heterólogo**", protocolo nº 4126/17, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Hélio José Montassier, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao Filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008, no decreto 6.899, de 15 de junho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA), da FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS, UNESP - CÂMPUS DE JABOTICABAL-SP, em reunião ordinária de 06 de abril de 2017.

Vigência do Projeto	01/05/2017 a 10/07/2017
Espécie / Linhagem	<i>Gallus gallus domesticus</i> / Cobb
Nº de animais	66
Peso / Idade	35g – 1 dia
Sexo	33 M; 33F;
Origem	Incubatório / Seara Alimentos Ltda - Nuporanga

Jaboticabal, 06 de abril de 2017.


Prof.ª Dr.ª Lizandra Amoroso
Coordenadora – CEUA

RESPOSTAS IMUNES E PROTEÇÃO INDUZIDAS POR UMA VACINA VIVA ATENUADA FORMULADA COM UMA VARIANTE BRASILEIRA DO VÍRUS DA BRONquite INFECCIOSA CONTRA DESAFIOS COM ESTIRPES HOMÓLOGA E HETERÓLOGA

RESUMO - O Vírus da Bronquite Infecciosa (VBI) é caracterizado por alta variabilidade genética que gera um grande número de variantes antigênicas e biológicas devido a mutações pontuais, inserções, deleções e recombinações que podem ocorrer em várias partes do genoma viral e, especialmente, no gene S1. O controle da Bronquite Infecciosa (BI) por meio de vacinas torna-se assim bastante complexo, mas a vacinação ainda é uma das abordagens mais eficazes para a proteção contra a infecção pelo VBI. Desde o ano 2000, o Brasil vem apresentando uma incidência aumentada de surtos de BI causados por estirpes variantes classificadas no genótipo I - linhagem 11 (GI-11) ou no genótipo BR-1 e, até 2016, havia disponíveis para comercialização somente as vacinas vivas atenuadas do genótipo Massachusetts. Nesse ano, uma indústria farmacêutica brasileira desenvolveu e conseguiu, com base em testes de proteção em frangos SPF, a permissão do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) para comercializar uma vacina viva atenuada formulada com uma variante brasileira (BR-1). O objetivo deste trabalho foi avaliar, em frangos de corte comerciais, a proteção induzida por esta nova vacina viva atenuada comercial, quando administrada isoladamente ou quando combinada com outra vacina viva atenuada comercial formulada com estirpe do genótipo Massachusetts. Para tanto, a resposta imune humoral sistêmica foi mensurada pelo teste de ELISA comercial e os escores de proteção para ciliostase traqueal, lesões microscópicas e carga viral por RT-qPCR foram avaliados na traqueia, pulmões e/ou rins dos diferentes grupos de aves vacinadas contra os desafios com estirpes homóloga (estirpe virulenta brasileira - BR-1) ou heteróloga (estirpe virulenta Massachusetts). Os resultados mostraram que a vacinação combinada conferiu uma maior imunoproteção caracterizada por menores escores de ciliostase traqueal, lesões microscópicas mais leves e carga viral mais reduzida e menos persistente após o desafio homólogo com estirpe BR-1. Foi também observada uma imunoproteção parcial contra a estirpe virulenta BR-1 nos grupos mono vacinados, ou somente com a vacina BR-1 ou com a vacina Massachusetts, mas não foi registrada nenhuma proteção relevante para as aves vacinadas somente com BR-1 após o desafio com a estirpe virulenta Massachusetts. Em conclusão, o protocolo vacinal que combina as vacinas atenuadas com as estirpes atenuadas BR-1 e Massachusetts pode ser utilizado de forma bem sucedida para induzir em frangos de corte de criações comerciais respostas imuno protetoras mais eficazes contra estirpes variantes brasileiras (BR-1) e Massachusetts do VBI.

Palavras-chaves: bronquite infecciosa das galinhas, ciliostase traqueal, histopatologia, linhagem GI-11, RT-qPCR, vacina viva

**IMMUNE RESPONSES AND PROTECTION INDUCED BY AN ATENUATED LIVE
VACCINE FORMULATED WITH A BRAZILIAN VARIANT OF THE INFECTIOUS
BRONCHITIS VIRUS AGAINST CHALLENGE WITH HOMOLOGOUS AND
HETEROLOGOUS STRAINS**

ABSTRACT - Infectious Bronchitis Virus (IBV) is characterized by high genetic variability that generates a large number of antigenic and biological variants due to point mutations, insertions, deletions and recombination that may occur in various parts of the viral genome and especially in the S1 gene. The control of Infectious Bronchitis (IB) through vaccines thus becomes quite complex, but vaccination is still one of the most effective approaches to protection against IBV infection. Since the year 2000, Brazil has been presenting an increased incidence of IB outbreaks caused by variant strains classified as genotype I - lineage 11 (GI-11) or in genotype BR-1, and until 2016, only live attenuated vaccines containing the Massachusetts genotype were commercially available. In this year, one Brazilian pharmaceutical industry developed and achieved, on the basis of protection tests in SPF chickens, the permission of Ministry of Agriculture, Livestock and Supply (MAPA) to market a live attenuated vaccine formulated with a Brazilian variant strain (BR-1). The objective of this work was to evaluate, in commercial broilers, the protection induced by this new live attenuated vaccine when administered alone or combined with another live attenuated vaccine formulated with Massachusetts strain. For that, the systemic humoral immune response was measured by the commercial ELISA test, and the protective scores for tracheal ciliostasis, microscopic lesions and viral load by RT-qPCR were evaluated in the trachea, lungs and/or kidneys of the different groups of vaccinated birds against homologous (virulent Brazilian variant - BR-1) or heterologous (virulent Massachusetts strain) challenges. The results of this study showed that combined vaccination conferred a greater immune-protection characterized by lower tracheal ciliostasis scores, milder microscopic lesions and a lower and less persistent viral load after homologous challenge with BR-1 strain. Partial immune protection against the virulent strain BR-1 was also observed in the mono-vaccinated groups, either with the BR-1 vaccine or the Massachusetts vaccine, but no relevant protection was recorded for chickens vaccinated only with BR-1 against the challenge with virulent Massachusetts strain. In conclusion, the vaccine protocol combining the attenuated vaccines with the BR-1 and Massachusetts attenuated strains can be successfully used to induce more effective immuno-protective responses against Brazilian variant (BR-1) and Massachusetts IBV strains in commercial broilers.

Keywords: infectious bronchitis, tracheal ciliostasis, histopathology, GI-11 strain, RT-qPCR, live vaccine

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1. Grupos experimentais de aves vacinadas com vacinas vivas atenuadas comerciais formuladas com estirpes virais distintas (Massachusetts-Mass e variante brasileira - GI-11), e desafiadas com estirpe do genótipo brasileiro BR-1 e Massachusetts.....	20
Tabela 2. Avaliação da média de escores de inibição do movimento ciliar da traqueia (0 a 4) de aves dos diferentes grupos nos diferentes intervalos pós-vacinação e pós-infecção.....	27
Tabela 3. Porcentagem de proteção dos diferentes grupos vacinados frente ao desafio com estirpes homólogas ou heterólogas de acordo com o proposto por Cook et al., 1999.....	27
Tabela 4. Resultados da análise histológica de traqueia nos diferentes grupos de estudo aos 4, 7 e 11 d.p.i.....	29
Tabela 5. Resultados da análise histológica de rim nos diferentes grupos de estudo aos 4, 7 e 11 d.p.i.....	31
Tabela 6. Médias do número de cópias do gene S1 do VBI (\log_{10}) detectado em traqueia dos diferentes grupos de estudo ao longo dos períodos analisados.....	34
Tabela 7. Médias do número de cópias do gene S1 do VBI (\log_{10}) detectado em pulmão dos diferentes grupos de estudo ao longo dos períodos analisados pós-infecção.....	35
Tabela 8. Médias do número de cópias do gene S1 do VBI (\log_{10}) detectado em rim dos diferentes grupos de estudo ao longo dos períodos analisados.....	35

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Média do escore de lesões histopatológicas encontradas em amostras de traqueia das aves dos diferentes grupos analisados neste estudo ao longo dos períodos pós-infecção.....	28
Figura 2. Média do escore de lesões histopatológicas encontradas em amostras de rim das aves dos diferentes grupos analisados neste estudo ao longo dos períodos pós-infecção.....	30
Figura 3. Número de cópias do gene S1 do VBI (log10) detectado em traqueia e rim das aves dos grupos A, B e C nos diferentes intervalos pós-vacinação.....	33
Figura 4. Número de cópias do gene S1 do VBI (log10) detectado em traqueia, pulmão e rim das aves dos grupos A, B, C, D e E nos diferentes intervalos pós-infecção.....	36
Figura 5. Perfil cinético (médias) da produção de anticorpos do isótipo IgG anti-VBI detectados por ELISA nas amostras de soro sanguíneo das aves dos grupos A, B, C, D, E e F nos diferentes intervalos pós-vacinação (d.p.v) e pós-infecção (d.p.i). A seta vermelha indica o dia em que foi realizado o desafio.....	38

1. INTRODUÇÃO

A avicultura brasileira continua ocupando lugar de grande destaque no cenário mundial em se tratando de volume de produção de carne de frango. Segundo a Associação Brasileira de Proteína Animal (ABPA), o Brasil terminou o ano de 2016 como segundo maior produtor mundial de carne de frango, ficando atrás apenas dos Estados Unidos da América (EUA), e tendo a China como terceiro lugar. Ainda, e em conformidade com os dados da ABPA, a produção brasileira finalizou 2016 com a produção de 12,9 milhões de toneladas de carne de frango, seguida pela China, com a produção de 12,3 milhões de toneladas; os EUA produziram, em 2016, um pouco mais de 18 milhões de toneladas.

Segundo o Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA) a previsão para 2017 era de um aumento de 4% na produção de carne de frango, a qual chegaria às 13,5 milhões de toneladas. Esse aumento seria motivado principalmente pela maior demanda mundial por produtos brasileiros, principalmente pela China e União Europeia, além de novos mercados, especialmente após o impacto da gripe aviária em vários países. Além disso, a demanda interna de carne de frango deveria aumentar em 2017, já que a economia brasileira estava em crescimento e a inflação sob controle (USDA).

No entanto, devido a diversos fatores políticos e sociais que ocorreram em 2017 no Brasil e que atingiram o segmento envolvido na produção de carne de frango, o aumento não alcançou a previsão e fechou o ano com 13,25 milhões de toneladas de carne de frango produzidas. Para 2018, o USDA previu que a produção brasileira de carne de frango iria aumentar 3%, atingindo valores de 13,8 milhões de toneladas. Esse aumento ainda seria motivado pela gripe aviária que atingiu criações avícolas industriais em várias partes do mundo e também pelo aumento da demanda no mercado interno. Outro ponto importante é o baixo custo da produção, devido às safras recordes de milho e soja, o que gera um otimismo cauteloso, de que as margens de lucro podem melhorar ainda em 2018 (USDA). O novo boletim do USDA com as previsões para 2019 mantém o otimismo e prevê aumento de 2,3% para o próximo ano.

Em se tratando de exportação de carne de frango, o Brasil mantém sua posição de maior exportador mundial. De acordo com o USDA, em 2017, o Brasil

estava habilitado para exportar carne de frango para 158 países, sendo que 65% de todas as exportações estão concentradas em apenas sete países: China, União Europeia, Hong Kong, Japão, Arábia Saudita, África do Sul e Emirados Árabes. Com relação ao volume exportado em 2017, o Brasil enviou quatro milhões de toneladas de carne de frango para fora do país (USDA). A previsão para 2018, ainda de acordo com este órgão, é de um aumento das exportações em 5%, principalmente para a China, mercado que está em queda por fatores sanitários, e onde o Brasil já atua com quase 90% de participação, desde 2016.

A grande preocupação da avicultura brasileira e mundial, pelo seu potencial de gerar grandes perdas econômicas, são as doenças infecciosas em geral e, em particular, as doenças respiratórias de etiologia viral que exercem um impacto significativo na avicultura do mundo todo. Os principais danos causados por essas enfermidades são, em suma, relacionados à diminuição do crescimento e consequente perda na produção de carne, além do comprometimento da qualidade e da produção de ovos; em alguns casos, pode ocasionar uma taxa variável de mortalidade.

Os agentes virais respiratórios com maior potencial de ocasionar severas perdas em termos de mortalidade são as estirpes de alta virulência do vírus da doença de Newcastle (VDN) e do vírus da influenza aviária (VIA). Outros agentes virais conhecidos principalmente por suas características de causar infecção no trato respiratório, apesar de serem mais brandos, quando comparados com os dois citados anteriormente, e que possuem significativa importância em termos de severidade de lesões e perdas econômicas na avicultura industrial são: o vírus da laringotraqueíte infecciosa (VLTi), o metapneumovírus aviário (AMPV) e o vírus da bronquite infecciosa aviária (VBI) (Fernando, 2013).

O vírus da bronquite infecciosa (VBI) é um coronavírus do gênero *Gammacoronavirus*, e é o vírus respiratório, depois dos vírus da influenza e da doença de Newcastle, que possui maior importância econômica, principalmente pelo seu potencial de ampla disseminação entre as criações avícolas (Jones, 2010). Ademais, o VBI apresenta alta taxa de variabilidade genética que se reflete no surgimento de um maior número de estirpes variantes genéticas e, em alguns casos, fenotípicas, com padrões de tropismo e patogenicidade diferentes das estirpes de referência desse vírus. Sabe-se também que a presença dessas variantes do VBI

nos plantéis avícolas brasileiros está relacionada com uma ampla gama de sinais clínicos e quadros patológicos, que dificultam o diagnóstico da bronquite infecciosa (BI) nas aves, e pode ser uma das razões para o insucesso no controle da doença no Brasil, uma vez que se faz necessário realizar o controle específico com a estirpe circulante em uma dada região devido à especificidade das respostas imunes (Cavanagh, 2007; Jordan, 2017).

Atualmente, a prevenção da BI no Brasil é feita com a adoção de medidas de biossegurança e pela vacinação dos plantéis com vacinas vivas atenuadas e/ou inativadas, sendo que, na maioria das vezes, utiliza-se a vacina viva atenuada contendo a estirpe Massachusetts (Mass) atenuada. Em 2016, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) liberou no Brasil o uso de uma vacina viva atenuada formulada com uma estirpe variante brasileira (BR), classificada como linhagem 11 do genótipo I, com base em testes dessa preparação vacinal em galinhas SPF, e que gradualmente tem sido utilizada na imunização de plantéis avícolas do país, não havendo, entretanto, dados que caracterizem de forma mais detalhada essa nova preparação vacinal, sobretudo em aves de criações comerciais.

Em vista de tudo o que foi explanado acima, e levando em consideração à importância da prevenção da BI, o objetivo do trabalho foi avaliar a inocuidade e a proteção induzida pela vacina viva atenuada comercial formulada com estirpe da linhagem 11 do genótipo I do VBI (GI-11/genótipo BR-1), administrada isoladamente ou combinada com uma vacina viva atenuada comercial do genótipo Massachusetts em frangos de corte de linhagem comercial, frente aos desafios com estirpes homóloga (GI-11/genótipo BR-1) e heteróloga (Massachusetts) do VBI.

8. CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos com este estudo e em consonância com os objetivos propostos, foi concluído que:

- A vacinação somente com estirpe atenuada do genótipo BR-1 seguida do desafio com estirpe homóloga se mostrou parcialmente eficaz para a indução de proteção ao desafio homólogo; no entanto, frente a um desafio heterólogo com estirpe virulenta Massachusetts, esta formulação vacinal não conferiu proteção relevante, especialmente às células e tecidos traqueais das aves vacinadas e desafiadas.
- A vacinação somente com estirpe atenuada Massachusetts resultou em proteção parcial heteróloga (estirpe do genótipo BR-1), quer seja à traqueia ou aos rins, quando as aves vacinadas dessa forma foram desafiadas com estirpe virulenta do genótipo BR-1, especialmente com base nos resultados da ciliostase traqueal e das cargas virais detectadas nesses órgãos.
- A vacinação com duas estirpes vacinais atenuadas, i.e., do genótipo BR-1 e do genótipo Massachusetts, apesar de induzir alterações patológicas pós-vacinais mais proeminentes, foi mais eficaz para conferir maior imunoproteção contra o desafio com estirpe do genótipo BR-1 e, portanto, de conseguir conter um desafio com essa estirpe virulenta variante.

- Deve-se ter cautela em indicar programas vacinais para o controle da BI para determinada propriedade ou região, levando em consideração o correto diagnóstico e epidemiologia local, com o objetivo de se obter o melhor resultado no controle dessa doença e com o menor impacto na inserção de novas variantes do vírus. Em se tratando do VBI, mais estudos são imprescindíveis para se ter acesso ao nível de segurança do manejo de se utilizar duas vacinas de forma concomitante, a fim de se evitar o surgimento de novas variantes a partir da recombinação de tais estirpes entre si e com as estirpes de campo circulantes no país.

9. REFERÊNCIAS

- Albassam, M. A., Winterfield R. W.; Thacker H. L. Comparison of the nephropathogenicity of four strains of infectious bronchitis vims. **Avian Disease**, v. 30, p. 468-476, 1986.
- Alexander, D. J.; Gough R. E. Isolation of avian infectious bronchitis vims from experimentally infected chickens. **Research in Veterinay Science**, London, v. 23, p. 344-347, 1977.
- Alexander, D. J.; Gough R. E.; Pattison, M. A long-term study of the pathogenesis of infection of fowls with three strains of avian infectious bronchitis vims. **Research in Veterinay Science**, London, v. 24, p. 228-233, 1978.
- Ambali, A. G.; Jones, R. C. Early pathogenesis in chicks of infection with an enterotropic strain of infectious bronchitis virus. **Avian Disease**, v. 34, p. 809-817, 1990.
- Ammayappan, A., Upadhyay, C., Gelb, J., Vakharia, V. N., Identification of sequence changes responsible for the attenuation of avian infectious bronchitis virus strain Arkansas DPI. **Archives of Virology**. March 2009, Volume 154, Issue 3, pp 495–499, 2009.
- Andrade, L. F. *et al.* Evaluation of ciliary movement in tracheal rings to assess immunity against infectious bronchitis virus. **Avian Disease**., v.26(4), p.805-14, 1982.
- Assayag, M. S. Bronquite infecciosa das galinhas. In: SIMPÓSIO BRASIL SUL DE AVICULTURA 5., 2004, Chapecó, SC. **Anais**. Chapecó: 2004. p.43-46.
- Assayag, M. S. J., Chacón, J. L. V., Ferreira, A. P. Economic impact of IB in a Brazilian poultry integration system. In M. Lierz, U. Heffels Redmann, E.F. Kaleta e J. Heckmann (Eds.), In: **Proceedings** of the VII. International symposium on Corona and Pneumoviruses and complicating pathogens, Rauschholzhausen, Germany, p. 80-83, 2012.
- Balestrin E, Fraga AP, Ikuta N, Canal CW, Fonseca ASK, Lunge VR. Infectious bronchitis virus in different avian physiological systems – a field study in Brazilian poultry flocks. **Poultry Science** 93:1922–9, 2014.
- Bande F., Arshad S. S., Omar A. R., Hair-Bejo, M., Mahmuda A., Nair, V. Global distributions and strain diversity of avian infectious bronchitis virus: a review. **Animal Health Research Reviews** 18(1); 70–83, 2017.
- Benyeda, Z.; Mató, T.; SüVeges, T.; Szabó, E.; Kardi, V.; Z Abonyi-TóTh, Z.; Rusvai, M.; Palya, V. Comparison of the pathogenicity of QX-like, M41 and 793/B infectious bronchitis strains from different pathological conditions. **Avian Pathology**, v. 38, n. 6, p. 449-456, 2009.

Benyeda, Z.; Szeredi, L.; Mato, T.; Su, Veges, T.; Balka, G.; Abonyi-Toth, Z.; Rusvai, M.; And Palya, V. Comparative histopathology and immunohistochemistry of QX-like, Massachusetts and 793/B serotypes of infectious bronchitis virus infection in chickens. **Journal of Comparative Pathology**, v. 143, n. 4, p. 276-283, 2010.

Bhattacharjee, P. S.; Naylor, C. J.; Jones, R. C. A simple method for immunofluorescence staining of tracheal organ cultures for the rapid identification of infectious bronchitis virus. **Avian Pathology**, Cambs, v. 23, n. 1, p.471-480, 1994.

Box, P. G.; Roberts, B.; Beresford, A. V. Infectious bronchitis-preventing loss of egg production by emulsion vaccine at point-of-lay. **Developmental Biology Standard.**, Basel, v. 51, p. 97-103, 1982.

Brandão, P. E. Avian Infectious Bronchitis Virus in Brazil: A Highly Complex Virus Meets a Highly Susceptible Host Population. **Brazilian Journal of Poultry Science**. v.12(2), p. 121 – 124, 2010.

Callison, S. A.; Hilt, D. A.; Boynton, T. O.; Sample, B. F.; Robison, R.; Swayne, D. E.; Jackwood, M. W. Development and evaluation of a real-time Taqman RT-PCR assay for the detection of infectious bronchitis virus from infected chickens. **Journal of Virology Methods.**, Amsterdam, v.138, p. 60-65, 2006.

Cardoso, T. C.; Montassier, H. J.; Galletti, M. C. M.; Pinto, A. A. Development and application of a sandwich ELISA to measure chicken antibodies of infectious bronchitis virus. **Virus Review e Research**, v.1, N. 1-2, p. 75-80, 1996a.

Cardoso, T. C.; Montassier, H.J.; Galletti, M. C. M.; Pinto, A. A. Evaluation of an indirect ELISA method for the detection of chicken antibodies of infectious bronchitis virus. **Revista de Microbiologia**, v. 27, p. 64-69, 1996b.

Carstens, E. B. Ratification vote on taxonomic proposals to the International Committee on Taxonomy of Viruses. **Archives of Virology** 2012; 157:1411–1422, 2012.

Capua, I.; Minta, Z.; Karpinska, E.; Mawditt, K.; Britton, P.; Cavanagh, D.; Gough, E. Co-circulation of four types of infectious bronchitis virus (793/B, 624/I, B1648 and Massachusetts). **Avian Pathology**, Cambs, v. 28, n. 5, p.587-92, 1999.

Cavanagh, D. Coronavirus IBV: structural characterization of the spike protein. **Journal of General Virology**, v. 64, p. 2577-2583, 1983.

Cavanagh, D., Davis, P.J., Pappin D.J.C., Binns M.M., Boursnell M.E.G., Brown T.D.K., 1986. Coronavirus IBV: partial amino terminal sequencing of spike polypeptide S2 identifies the sequence Arg-Arg-Phe-Arg-Arg at the cleavage site of the spike precursor polypeptide of IBV strains Beaudette and M41. **Virus Research**. 4, 133–143, 1986.

Cavanagh, D. Advances in avian diagnostic technology. In: WORLD VETERINARY POULTRY ASSOCIATION CONGRESS, 10., Sidney. **Proceedings** p.57-70, 1993.

Cavanagh, D., Naqi, S., 1997. Infectious bronchitis. In: Calnek, B.W., Barnes, H.J., Beard, C.W., McDougald, L.R., Saif, Y.M. (Eds.), **Diseases of Poultry**, 10th ed. Mosby-Wolfe, London, pp. 511–526, 1997.

Cavanagh, D. A nomenclature for avian coronavirus isolates and the question of species status. **Avian Pathology**. v.30, n. 2, p. 109–115, 2001.

Cavanagh, D., Naqi, S. A. Infectious Bronchitis. In: (Ed) **Diseases of Poultry**. University Press, p. 101-119, 2003.

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

Cavanagh, D. Coronavirus avian infectious bronchitis virus. **Veterinary Research**, v. 38, p.281-297, 2007.

Cavanagh D. e Gelb J., Jr. Infectious bronchitis. **Diseases of Poultry**, Twelfth Edition. Saif Y.M., Fadly A.M., Glisson, J.R., McDougald L.R., Nolan L.K. e Swayne D.E., Eds. Wiley-Blackwell, Ames, Iowa, USA, 117– 135, 2008.

Chen, B. Y.; Hosi, S.; Nunoya, T.; Itakura, C. Histopathology and immunohistochemistry of renal lesions due to infectious bronchitis virus in chicks. **Avian Pathology**, v. 25, n. 2, p.269-283, 1996.

Chong K.T. e Apostolov K. The pathogenesis of nephritis in chickens induced by infectious bronchitis virus. **Journal of Comparative Pathology**, London, v. 92, p. 199-211, 1982.

Collisson, E. W.; Liz, J. Z.; Sneed, L. W.; Peters, M. L.; Wang, L. Detection of avian infectious bronchitis using in situ hybridization and recombinant DNA. **Veterinarian Microbiology**, Amsterdam, v. 24, n. 3, p.261-271, 1990.

Cook, J. K. Duration of experimental infectious bronchitis in chickens. **Research in Veterinary Science**, London, v. 9, n. 6, p. 506-514, 1968.

Cook, J. K. Recovery of infectious bronchitis virus from eggs and chicks produced by experimentally inoculated hens. **Journal of Comparative Pathology**, London, v. 81, p. 203-211, 1971.

Cook, J. K. A.; Darbyshire, J. H.; Peters, R. W. The use of chicken tracheal organ cultures for the isolation and assay of avian Infectious Bronchitis Virus. **Archives of Virology**, v. 50, p.109-118, 1976.

Cook, J. K. A.; Orbell, S. J.; Woods, M. A.; Huggins, M. B. Breadth of protection of the respiratory tract provided by different live-attenuated infectious bronchitis vaccines against challenge with infectious bronchitis viruses of heterologous serotypes. **Avian Pathology**, v. 28, p. 477-485, 1999.

Cook, J. K. A.; Jackwood, M.; Jones, R. C. The long view: 40 years of infectious bronchitis research. **Avian Pathology**, v. 1(3), 239-250, 2012.

Cubillos, A.; Ulloa, J.; Cubillos, V.; Cook, J. K. A. Characterisation of strains of infectious bronchitis virus isolated in Chile. **Avian Pathology**, v. 20, n. 1, p. 85-99, 1991.

Cumming, R.B. Infectious avian nephrosis (uraemia) in Australia. **Australian Journal of Veterinarian**, Chichester, v. 39, n. 9, p. 360, 1963. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1111/j.1751-0813.1963.tb04369.x>>.

Cumming, R. B. Studies on Australian infectious bronchitis virus. IV. Apparent farm-to-farm airborne transmission of infectious bronchitis virus. **Avian Disease**, v. 14, p. 191-195, 1970.

Darbyshire, J.H. e Peters, R.W. Sequential development of humoral immunity and assessment of protection in chickens following vaccination and challenge with avian infectious bronchitis virus. **Research in Veterinary Science**, 37, 77–86, 1984.

Darbyshire, J. H.; Peters, R. W. Humoral antibody response and Assessment of protection following primary vaccination of chickens with maternally derived antibody against avian infectious bronchitis virus. **Research in Veterinary Science**, v. 38(1), p.14-21, 1985.

Davelaar, F.G. e Kouwenhoven, B. Influence of maternal antibodies on vaccination of chicks of different ages against infectious bronchitis, **Avian Pathology**, 6:1, 41-50, 1977.

De Wit, J.J. Detection of infectious bronchitis virus. **Avian Pathology**, 29, 71–93, 2000.

De Wit, J.J., Cook, J.K., Van Der Heijden, H.M., 2011. Infectious bronchitis virus variants: a review of the history, current situation and control measures. **Avian Pathology** 40 (3), 223–235, 2011.

De Wit, J. J. e Cook, J. K. A. Factors influencing the outcome of infectious bronchitis vaccination and challenge experiments, **Avian Pathology**, 43:6, 485-497, 2014.

De Wit, J., Brandão, P. E., Torres, C. A., Koopman, R. A. e Villarreal, L. Y. (2015). Increased level of protection of respiratory tract and kidney by combining different infectious bronchitis virus vaccines against challenge with nephropathogenic Brazilian genotype subcluster 4 Strains. **Avian Pathology**. 44, 352-357, 2015.

Di Fábio, J. Bronquite infecciosa das galinhas: vacinar frangos. In: CONFERÊNCIA APINCO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLAS, 1992, Santos. **Anais**. Santos: FACTA, 1992. p.151-164.

Di Fábio, J. e Rossini, L.I. Bronquite infecciosa das galinhas. In:MACARI,M.;BERCHIERI JÚNIOR,A.B.(Eds.). **Doenças das aves**. Campinas: FACTA, 2000. p.293-300.

Di Fábio, J. Classificação viral x variantes brasileiras. **Aveworld**, v.2, n.12, p.20-25, 2004.

Di Fábio, J., Buitrago, L. Y. V. Bronquite Infecciosa das Galinhas In: BERCHIERI JUNIOR, A., SILVA, E. N., DI FABIO, J., SESTI, L., ZUANAZE, M. A. F. **Doenças das Aves**. 2.ed. Campinas: FACTA, 2009.

Dhinakar R. G.; Jones, R.C. Immunopathogenesis of infection in SPF chicks and commercial broilers chickens of a variant infectious bronchitis virus of economic importance. **Avian Pathology**, v.25, p.481- 501, 1996.

Dhinakar, R. G.; Jones, R.C. Infectious bronchitis virus: Immunopathogenesis of infection in the chicken. **Avian Pathology**, v.26, n.4, p.677-706, 1997. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1080/03079459708419246>>.

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

Erbeck, D. H.; McMurray, B. L. Isolation of Georgia variant (Georgia isolate 1992) infectious bronchitis virus but not *Ornithobacterium rhinotracheale* from a Kentucky broiler complex. **Avian Disease**, v. 42, p. 613-617, 1998.

European Pharmacopoeia 8.0, 8th ed. (2013)

Felippe, F. A. N. et al. Genetic diversity of avian infectious Bronchitis vírus isolated from domestic chicken flocks and coronaviruses from feral rigeus in Brazil between 2003 and 2009. **Avian Disease**., v. 54(4), p.1191-1198, 2010.

Fernando, F. S. **Avaliação da patogenicidade e da imunidade cruzada de estirpe variante do vírus da bronquite infecciosa aviária isolada no Brasil**. 2013. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Jaboticabal, 2013.

F. S. Fernando, R. M. Santos, K. R. Silva, E. S. Oliveira, M. F. S. Montassier, H. J. Montassier. Um novo protectotipo de um genótipo variante do vírus da bronquite infecciosa (VBI) isolado no Brasil definido pelo teste de proteção vacinal com a estirpe Massachusetts H120. **I Simpósio Internacional de Medicina Veterinária Preventiva (I SIMPREV)**, v. 29, n. 4, 2013.

Fernando, F. S., Montassier, M. F. S., Silva, K. R., Okino, C.H., Oliveira, E.S., Fernandes, C. C., Bandarra, M. B., Gonçalves, M. C. M., Borzi, M. M., Santos, R. M., Vasconcelos, R. O., Alessi, A. C. e Montassier, H. J. Nephritis associated with a S1 variant Brazilian isolate of infectious bronchitis virus and vaccine protection test in

experimentally infected chickens. **International Journal of Poultry Science** 12, 639-646, 2013.

Fernando, F.S., Okino, C. H., Silva, K. R., Fernandes, C. C., Gonçalves, M. C. M., Montassier, M. F. S., Vasconcelos, R. O. e Montassier, H. J. Increased expression of Interleukin-6 related to nephritis in chickens challenged with an Avian infectious bronchitis virus variant. **Pesquisa Veterinária Braileira** 35, 216-222, 2015.

Fernando, F.S., Kasmanas, T. C., Mazutti, A., Schaefer, G., Montassier, H. J., Assayag Jr, M. S. Longitudinal field studies on the pathogenesis, persistence, and molecular biology of avian infectious bronchitis virus in Brazilian broiler flocks In: **Proceedings** of the 9th International Symposium on Avian Corona- and Pneumoviruses, Utrecht, The Netherlands, 21-24 June, pp. 97-103, 2016.

Fernando F. S., Kasmanas T. C., Lopes P. D., Montassier M De F Da S, Mores M. A. Z., Mariguela V. C., Pavani, C., Santos, R. M., Assayag, M. S., Montassier, H. J. Assessment of molecular and genetic evolution, antigenicity and virulence properties during the persistence of the infectious bronchitis virus in broiler breeders. **Journal of General Virology**, 98, 2470–81, 2017.

França, M., Woolcock, P. R., Yu, M., Jackwood, M. W., Shivaprasad, H. L. Nephritis Associated with Infectious Bronchitis Virus Cal99 Variant in Game Chickens. **Avian Disease**, v. 55, n. 3, p. 422–428, 2011.

Fraga, A. P., Gräf, T., Pereira, C. S., Ikuta, N., Fonseca, A. S. K., Lunge, V. R. Phylodynamic analysis and molecular diversity of the avian infectious bronchitis virus of chickens in Brazil. **Infection, Genetics and Evolution** 61, 77–83, 2018.

Garcia, Z.; Bankowski, R. A. Comparison of a tissue-culture virus neutralization test and enzyme-linked immunosorbent assay for a measurement of antibodies to Infectious bronchitis. **Avian Disease**, Kennet Square, v. 25, p.121-130, 1981.

Geilhausen, H. E.; Ligon, F. B.; Lukert, P. D. The pathogenesis of virulent and avirulent avian infectious bronchitis virus. **Arch. Ges. Virusforsch.**, v. 40, p. 285-290, 1973.

Gelb, J.; Rosenberger, J. K.; Fries, P. A.; Cloud, S. S.; Odor, E. M.; Dohms, J. E.; Jaeger, J. S. Protection afforded infectious bronchitis virus- vaccinated sentinel chickens raised in a commercial environment. **Avian Disease**, v. 33, p. 764-769, 1989.

Gelb, J.; Nix, W. A.; Gellman, S. D. Infectious bronchitis virus antibodies in tears and their relationship to immunity. **Avian Diseases**, v. 42, p. 364-374, 1998.

Handberg, K. J.; Nielsen, O. L.; Pedersen, M. W.; Jorgensen, P. H. Detection and strain differentiation of infectious bronchitis virus in tracheal tissues from experimentally infected chickens by reverse transcription–polymerase chain reaction. Comparison with an immunohistochemical technique. **Avian Pathology**, v. 28, p. 327–335, 1999.

Hall, T.A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium Series** 41:95-98, 1999.

Hipólito, O.; Silva, J.M.L.; Hsiung, H.M. Bronquite infecciosa das galinhas a doença no Brasil. São Paulo, 1979. 72p.

Hopkins, S. R. Serological comparisons of strains of infectious bronchitis virus using plaque purified isolants. **Avian Disease**, Kennet Square, v. 18, n. 2, p. 231-239, 1974.

Hopkins, S. R.; Yoder Jr, H. W. Reversion to virulence of chicken-passaged infectious bronchitis vaccine vims. **Avian Disease**, v. 30, p. 221-223, 1986.

Hofstad, M. S. Immune response to infectious bronchitis vims. **American Journal of Veterinay Research**, v. 36, p. 520-521, 1975.

Ignjatovic, J; Ashton, F. Detection and differentiation of avian infectious bronchitis viruses using antibody-based ELISA. **Avian Pathology**, v. 25, p. 721-736, 1996.

Jackwood, M. W.; Kwon, H. M.; Hilt, D. A. Infectious bronchitis virus detection in allantoic fluid using the polymerase chain reaction and a DNA probe. **Avian Disease**, Kennett Square, v. 36, n. 2, p.403-409, 1992.

Jackwood, M. W.; Yousef, N. M. H.; Hilt, D. Further development and use of a molecular serotype identification test for infectious bronchitis virus. **Avian Disease**, Kennet Square, v.41, n.1, p.105-110, 1997.

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

Jackwood, M. W., Hall, D., Handel, A. Molecular evolution and emergence of avian gammacoronaviruses. **Infection Genetics Evolution**. v. 12, p. 1305-1311, 2012.

Jackwood, M. W., de Wit, S. Infectious bronchitis. In: Swayne, D.E., Glisson, J.R., McDougald, L.R., Nolan, L.K., Suarez, D.L., Nair, V. (Eds.), **Diseases of Poultry**. Wiley-Blackwell Publishing, Ames, Iowa, Ames, IA, pp. 139–160, 2013.

Jackwood M. W., Jordan B. J., Roh H. J., Hilt D. A., Williams S. M. Evaluating Protection Against Infectious Bronchitis Virus by Clinical Signs, Ciliostasis, Challenge Virus Detection, and Histopathology. **Avian Disease**. 2015;59: 368–74, 2015.

Jones, R. C. Viral respiratory diseases (ILT, aMPV infections, IB): are they ever under control?. **Brazilian Poultry Science**, v. 51, n. 1, p. 1 – 11, 2010.

Jordan, F. T. W.; Nassar T. J. The survival of infectious bronchitis (IB) virus in an iodophor disinfectant and the influence of certain components. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 36, p. 335-341, 1973.

Jordan, B. Vaccination against infectious bronchitis virus: A continuous challenge. **Veterinary Microbiology** 206 (2017) 137–143, 2017.

Julian, R.J. e Willis, N.G. The nephrosis-nephritis syndrome in chickens caused by a Holte strain of infectious bronchitis virus. **Canadian Veterinary Journal**, 10, 18-19, 1969.

Keeler, C. L. Serotype identification of avian infectious bronchitis virus by RTPCR of the peplomer (S-1) gene. **Avian Disease**, Kennett Square, v. 42, n. 2, p. 275-84, 1998.

Koch, G.; Hartog, L.; Kant, A.; Van Roozelaar, D.; De Boer, G. F. Antigenic differentiation of avian bronchitis vims variant strains employing monoclonal antibodies. **Israel Journal of Veterinay Medice**, v. 42, p. 89-97, 1986.

Koch, G., Hartog, L., Kant, A., Van Roozelaar, D.J., 1990. Antigenic domains on the peplomer protein of avian infectious bronchitis virus: correlation with biological functions. **Journal of General Virology** 71, 1929–1935, 1990.

King D. J. e 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.

Kusters J.G., Jager E. J., Niesters H.G.M., Van Der Zeijst B.A.M. Sequence evidence for RNA recombination in field isolates of avian coronavirus infectious bronchitis virus, **Vaccine**, Vol. 8, 1990.

Kwon, H. M.; Jackwood, M. W.; Gelb Jr, J. Differentiation of infectious bronchitis virus serotypes using polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism analysis. **Avian Disease**, Kennet Square, v. 37, n. 1, p.194-202, 1993.

Lambrechts C., Pensaert M. e Ducatelle R. Challenge experiments to evaluate cross-protection induced at the trachea and kidney level by vaccine strains and Belgian nephropathogenic isolates of avian infectious bronchitis virus, **Avian Pathology**, 22:3, 577-590, 1993.

Lee, Ming-Shiuh; Chang, Poa-Chun; Shien, Jui-Hung; Cheng, Ming-Chu; Shieh, Happy K. Identification and subtyping of avian influenza viruses by reverse transcription-PCR. **Journal of Virological Methods**, 7 (2001) 13–22, 2001.

Lee, H. J *et al.* Characterization of a novel live attenuated infectious bronchitis virus vaccine candidate derived from a Korean nephropathogenic strain. **Vaccine**, v. 28, p. 2887–2894, 2010.

Lima, E.T.; Bronquite infecciosa das galinhas. In: ANDREATTI, L. R. **Saúde Aviária e Doenças**. São Paulo: Roca, 2007. P.256-260.

Lim, K.P, Liu, D.X. The missing link in coronavirus assembly. Retention of the avian coronavirus infectious bronchitis virus envelope protein in the pre-Golgi

compartments and physical interaction between the envelope and membrane proteins **Journal of Biological Chemistry**, 276 (2001), pp. 17515–17523, 2001.

Livak, K. J.; Schmittgen, T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. **Methods**, v.25, p.402-408, 2001.

Lopes, P. D.; Okino, C. H.; Fernando, F. S.; Pavani, C.; Casagrande, V. M.; Lopez, R. F. V.; Montassier, M. F. S; Montassier, H. J. Inactivated infectious bronchitis virus vaccine encapsulated in chitosan nanoparticles induces mucosal immune responses and effective protection against challenge. **Vaccine** 36 (2018) 2630–2636, 2018.

Mackay, I. M.; Arden, K. E.; Nitsche, A. Survey and summary: Real-time PCR in virology. **Nucleic Acids Research**, Oxon, v. 30, n. 6, p. 1292-1305, 2002.

Marandino, A., Pereda, A., Tomás, G., Hernández, M., Iraola, G., Craig, M. I., Hernández, D., Banda, A., Villegas, P., Panzera, Y. e Pérez, R. Phylodynamic analysis of avian infectious bronchitis virus in South America. **Journal of General Virology**. 96, 1340-1346, 2015.

Martins, N.R.S. Alguns aspectos da etiopatogenia de bronquite infecciosa. In: CONFERÊNCIA APINCO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA A VÍCOLAS, 1992, Santos. **Anais**. Santos: FACTA, 1992. p.145-150.

McMartin, D.A. Infectious bronchitis. In: **Virus infections of birds**. Amsterdam: Elsevier Science Publishers, 1993, 249-274.

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

McKinley, E. T., Hilt, D. A., Jackwood, M. W. Avian coronavirus infectious bronchitis attenuated live vaccines undergo selection of subpopulations and mutations following vaccination, **Vaccine**, 26, 1274—1284, 2008.

Meir, R. A.; Rosenblut, E. A.; Perl, S. B.; Kass, N. C.; Ayali, G. C.; Hemsani, E. C.; Perk, S. A. Identification of a Novel Nephropathogenic Infectious Bronchitis Virus in Israel. **Avian Disease**, v. 48, p. 635-641, 2004.

Mondal, S. P. e Naqi, S. A. Maternal antibody to infectious bronchitis virus: its role in protection against infection and development of active immunity to vaccine, **Veterinary Immunology and Immunopathology** 79, 31-40, 2001.

Montassier, M. F.S. *et al.* Genetic diversity on S1 glycoprotein of avian infectious bronchitis virus strains isolated in Brazil between 1988-2000. Proceedings of the 5th International Symposium on Avian Coronavirus; 2006; Rauschholzhausen. Germany. v.1, p.119-131., 2006.

Montassier, M. F.S; Brentano, L.; Montassier, H.J.; Richtzenhain, L. J. Genetic grouping of avian infectious bronchitis virus isolated in Brazil based on RT-

PCR/RFLP analysis of the S1 gene. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.28, p.190-194, 2008.

Montassier, H. J. Molecular Epidemiology and Evolution of Avian Infectious Bronchitis Virus. **Brazilian Journal Poultry Science**. v. 12(2), p.87-96, 2010.

Muneer, M.A., Chaudhry, K.M. e Khawaja, K.N. Losses due to infectious bronchitis virus infection in laying and breeding hens. **Pakistan Veterinary Journal**, 20, 64–70, 2000.

Murphy, F.H.; Gibbs, E.P.J.; Horzinek, M.C.; Studdert, M.J. **Veterinary virology**. 3.ed. New York: Academic Press, 1999. p.495-509.

Nakamura, K.; Cook, J. K. A.; Otsuki, K.; Huggins M. B.; Frazier, J. Comparative study of respiratory lesions in two chicken lines of different susceptibility infected with infectious bronchitis virus: histology, ultrastructure and immunohistochemistry. **Avian Pathology**, v. 20, p. 241-257, 1991.

Naqi, S. A. A monoclonal antibody-based immunoperoxidase procedure for rapid detection of infectious bronchitis virus in infected tissues. **Avian Disease**, v. 34, p. 893– 898, 1990.

Naqi, S. A.; Karaca, K.; Bauman, B. A monoclonal antibody-based antigen capture enzyme-linked immunosorbent assay for identification of IBV serotypes. **Avian Pathology**, Cambs, v. 22, p. 555-564, 1993.

Niesters, H. G. M. Molecular and diagnostic clinical virology in real time. **Clinical, Microbiology and Infection**, Oxford, v. 10, n. 1, p. 5-11, 2004.

OIE. (2013). Avian Infectious Bronchitis. OIE Terr Man 2013;2.3.2:1–16.

Otsuki, K.; Yamamoto, H.; Tsubokura, M. Studies on avian infectious bronchitis virus (IBV). I. Resistance of IBV to chemical and physical treatments. **Archives of Virology**, v. 60, p. 25-32, 1979.

Okino, C. H. **Imunidade celular e humoral do trato respiratório de galinhas desafiadas com o vírus da bronquite infecciosa e efeito de subdosagens da vacina na indução da proteção**. 2010. 137 f; Tese (Doutorado em Patologia Veterinária) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, Brasil, 2010.

Okino, C.H., Alessi, A.C., Montassier, M.F.S., Wang, X., Montassier, H.J. Humoral and Cell-Mediated Immune Responses to Different Doses of Attenuated Vaccine Against Avian Infectious Bronchitis Virus. **Viral Immunology**, v. 26, n. 4, p. 259-267, 2013.

Owen, R. L., Cowen, B. S., Hattel, A. L., Nagi, S. A. e Wilson, R. A. Detection of viral antigen following exposure of one-day-old chickens to the Holland 52 strain of infectious bronchitis virus, **Avian Pathology**, 20:4, 663-673, 1991.

Pena, L.J., Santos, B.M., Roberti, R.P., Marin, S.Y. Bronquite infecciosa das galinhas – Artigo de Revisão, **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v.72, n.3, p.397-404, jul./set., 2005.

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

Purchase, H. G.; Cunningham, C. H.; Burmester, B. R. Identification and epizootiology of infectious bronchitis in a closed flock. **Avian Disease**, v. 10, p. 111-121, 1966.

Reed, L.J.; Muench, H. A simple method of estimating fifty per cent end points. **Am J Hyg.**, v.27, p. 493-97, 1938.

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. 163p. 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. 31p. Dissertação (Mestrado) - Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2000.

Santos, I. L. **Respostas mediadas por anticorpos e células T de memória na imunidade contra o Vírus da Bronquite Infecciosa das Galinhas.** 2009. xiii, 83 f. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2009.

Seo, S. H.; Wang, L.; Smith, R.; Collisson, E. W. The carboxyl-terminal 120- residue polypeptide of infectious bronchitis virus nucleocapsid induces cytotoxic T lymphocytes and protects chickens from acute infection. **Journal of Virology**, v. 71, n. 7, p. 7889-7894, 1997.

Seo, S.H.; Collisson, E. W. Specific cytotoxic T lymphocytes are involved in in vivo clearance of infectious bronchitis virus. **Journal of Virology**. v. 71, n. 7, p. 5173–5177, 1997.

Silva, J. M. L. Bronquite infecciosa das galinhas: como e quando introduzir novas vacinas. In: CONFERÊNCIA APINCO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLAS, 1989, São Paulo, SP. **Anais...** Campinas: FACTA, 1989. p.75-79.

Spaan, W., Cavanagh, D., Horzine, M.C., 1988. Coronaviruses: structure and genome expression. **Journal of General Virology**. 69, 2939–2952, 1988.

Sturman, L. S.; Holmes, K. V.; Behnke, J. Isolation of coronavirus envelope glycoproteins and interaction with the viral nucleocapsid. **Journal of General Virology**. Washington, v.33, p.449-462, 1980.

Toffan, A., Bonci, M., Bano, L., Bano, L., Valastro, V., Vascellari, M., Capua, I. e Terregino, C. Diagnostic and clinical observation on the infectious bronchitis virus strain Q1 in **Italy**. **Veterinaria Italiana**, 49, 347–355, 2013.

Thompson Jd, Gibson Tj, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins Dg. (1997). The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. **Nucleic Acids Research**, 25, 4876-4882, 1997.

Valastro, V., Holmes, E. C., Britton, P., Fusaro, A., Jackwood, M. W., Cattoli, G., Monne, I. S1 gene-based phylogeny of infectious bronchitis virus: An attempt to harmonize virus classification. **Infection, Genetics and Evolution** 39 (2016) 349–364, 2016.

Van Hemert, M.J., Van Den Worm, S.H., Knoops, K., Mommaas, A.M., Gorbalenya, A.E., Snijders, E.J., SARS-coronavirus replication/transcription complexes are membrane-protected and need a host factor for activity in vitro. **PLoS Pathology**. 4, e1000054, 2008.

Villarreal Lyb, Brandão Pe, Chacón JI, Assayag Ms, Maiorka Pc, Raffi Abs, Saidenberg Abs, Jones Rc, Ferreira Ajp. Orchitis in Roosters with Reduced Fertility Associated with Avian Infectious Bronchitis Virus and Avian Metapneumovirus Infections. **Avian Disease**, v.51, p. 900-904, 2007a.

Villarreal, L. Y. B.; Brandão, P.E, Chacón, J.L, Saidenberg, A.B.S, Assayag, M.S, Jones, R.C.; Ferreira, A.J.P. Molecular Characterization of Infectious Bronchitis Virus Strains Isolated from the Enteric Contents of Brazilian Laying Hens and Broilers. **Avian Disease**, v.51, p.974- 978, 2007b.

Villegas, P. Control de reacciones respiratorias. In: CONGRESO LATINOAMERICANO DE AVICULTURA, 16., 1997, México. **Anais** . México: 1997. p.388-391.

Vries, A.A.F, Horzinek, M.C, Rottier, P.J.M, Groot, R.J. The genome organization of Nidovirales: similarities and differences between arteri-, toro-, and coronaviruses. **Seminars in Virology**, Volume 8, Issue 1, February 1997, Pages 33-47, 1997.

Winterfield, R.W. e Hitchner, S.B. Etiology of an infectious nephritis-nephrosis syndrome of chickens. **American Journal of Veterinary Research**, 23, 1273-1279, 1962.

Yashida, S. *et al.* Relationship between several criteria of challenge-immunity and humoral immunity in chickens vaccinated with avian infectious bronchitis vaccines. **Avian Pathology**, Huntingdon, v.14, p.199-211, 1985.

Zellen, G. H.; Thorsen, J. Standardization and application of the enzyme-linked immunosorbent assay for Infectious Bronchitis. **Avian Disease**, Kennet Square, v. 30, p. 695- 698, 1986.

Ziegler, A. F., Ladman, B. S., Dunn, P. A., Schneider, A., Davison, S., Miller, P. G., Lu, H., Weinstock, D., Salem, M., Eckroade, R. J., Gelb, J. Jr. Nephropathogenic infectious bronchitis in Pennsylvania chickens 1997-2000. **Avian Disease**, v. 46, p. 847–858, 2002.