

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**AVALIAÇÃO DA PATOGENICIDADE E DA IMUNIDADE
CRUZADA DE ESTIRPE VARIANTE DO VÍRUS DA
BRONQUITE INFECCIOSA AVIÁRIA ISOLADA NO BRASIL**

Filipe Santos Fernando

Médico Veterinário

2013

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**AVALIAÇÃO DA PATOGENICIDADE E DA IMUNIDADE
CRUZADA DE ESTIRPE VARIANTE DO VÍRUS DA
BRONQUITE INFECCIOSA AVIÁRIA ISOLADA NO BRASIL**

Filipe Santos Fernando

Orientador: Prof. Dr. Hélio 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).

2013

Fernando, Filipe Santos

F363a Avaliação da patogenicidade e da imunidade cruzada de estirpe variante do vírus da bronquite infecciosa aviária isolada no Brasil / Filipe Santos Fernando. -- Jaboticabal, 2013
x, 111 p.: il.; 28 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista,
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2013

Orientadora: Hélio José Montassier

Banca examinadora: Antônio Carlos Paulillo, Ricardo Luís Moro de
Sousa

Bibliografia

1. Vírus da bronquite infecciosa. 2. Variante. 3. Patotipo. 4.
Protectotipo. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e
Veterinárias.

CDU 619:614.4:636.5

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação –
Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: AVALIAÇÃO DA PATOGENICIDADE E DA IMUNIDADE CRUZADA DE ESTIRPE VARIANTE DO VÍRUS DA BRONQUITE INFECCIOSA AVIÁRIA ISOLADA NO BRASIL


AUTOR: FILIPE SANTOS FERNANDO

ORIENTADOR: Prof. Dr. HELIO JOSE MONTASSIER

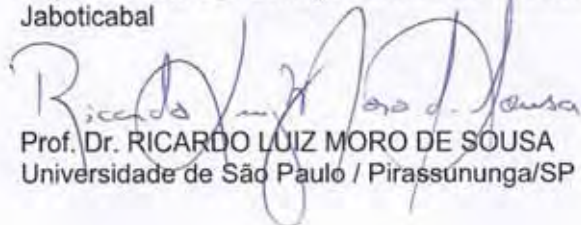
Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de MESTRE EM MEDICINA VETERINÁRIA, Área: PATOLOGIA ANIMAL, pela Comissão Examinadora:


Prof. Dr. HELIO JOSE MONTASSIER

Departamento de Patologia Veterinária / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal


Prof. Dr. ANTONIO CARLOS PAULILLO

Departamento de Patologia Veterinária / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal


Prof. Dr. RICARDO LUIZ MORO DE SOUSA

Universidade de São Paulo / Pirassununga/SP

Data da realização: 28 de junho de 2013.

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

Filipe Santos Fernando – Nascido em Umuarama-PR, no dia 14 de fevereiro de 1987, graduou-se em Medicina Veterinária pela Universidade Estadual de Maringá (UEM), em janeiro de 2011. Realizou estágio no laboratório de Microbiologia e doenças infectocontagiosas entre janeiro de 2007 e julho de 2010, sob orientação da Professora Dra. Sheila Rezler Wosiacki. Neste período foi bolsista CNPq/Fundação Araucária de iniciação científica (IC) na área de microbiologia de animais domésticos. Entre janeiro de 2008 e outubro de 2010 realizou estágio no Laboratório de Imunologia e Virologia Veterinária na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista - FCAV-UNESP, sob supervisão do Professor Dr. Hélio José Montassier, na área de Imunologia, virologia e patologia aviária, onde também realizou estágio curricular de graduação entre os meses de junho a outubro de 2010. Em novembro de 2010 apresentou o trabalho de conclusão de curso intitulado “*Caracterização de um novo isolado de campo do vírus da bronquite infecciosa aviária*” sob orientação da Professora Dra. Sheila Rezler Wosiacki e Professor Dr. Hélio José Montassier. Em março de 2011 iniciou o curso de mestrado sob orientação do Professor Dr. Hélio José Montassier na área de imunologia, virologia e patologia veterinária.

AGRADECIMENTOS

Dou graças a Jesus Cristo, meu Senhor, que me deu forças e me considerou fiel, designando-me para este trabalho.

Ao Professor Hélio José Montassier, que dedicou parte de seu tempo à mim durante estes quase 6 anos. Por ter sido o grande exemplo de profissionalismo, caráter e honestidade na pesquisa. Pela confiança depositada em mim, e pelos incontáveis ensinamentos.

À Dr.^a. Maria de Fátima S. Montassier, pelo exemplo de esperança e positivismo à qual enxerga a vida e o trabalho. Pela colaboração e conselhos técnicos.

Aos amigos do laboratório de Imunologia e Virologia e do Departamento de Patologia Veterinária: Ketherson, Lurdinha, Camila, Mariana Gonçalves, Mariana Borzi, Cintia, Marcio e Romeu, pela colaboração, parceria e amizade.

Aos docentes e funcionários que de uma forma ou de outra participaram de minha formação e colaboraram para que este trabalho fosse realizado: Professor Alessi, Professora Rosemeri, Professor Paulillo, Chica e Edna.

À minha amiga, parceira, namorada, esposa e família Suelen P. Diniz. Pela paciência, otimismo, coragem e tantas outras qualidades que não caberiam neste curto espaço. Sem ela, possivelmente seria muito mais difícil vencer esta etapa da minha vida.

Aos membros da banca de qualificação e dissertação: Professor Paulillo, professora Rosemeri e Professor Ricardo L. M. de Sousa.

Aos meus animais, razão pela qual escolhi esta Profissão: Samantha, Antônio e Francisca.

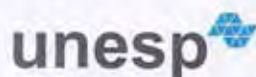
A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São – FAPESP - pela bolsa concedida (processo: 2011/04743-2).

SUMÁRIO

	Página
Resumo	ix
Abstract	x
Lista de abreviaturas	xi
Lista de tabelas	xiv
Lista de figuras	xv
1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO DE LITERATURA	4
2.1 Bronquite infecciosa aviária	4
2.2 Etiologia e morfologia viral	4
2.3 Patogenia	7
2.4 História do VBI no Brasil e no mundo	10
2.5 Epidemiologia	15
2.6 Diagnóstico	17
2.7 Prevenção e controle	19
3 HIPÓTESE DE TRABALHO	23
4 OBJETIVOS	23
5 MATERIAL E MÉTODOS	24
5.1 Amostras virais	24
5.2 Propagação e isolamento viral	24
5.3 Determinação da Dose Infectante Embrionária 50% (DIE _{50%})	25
5.4 Infecção Experimental	25
5.4.1 Infecção Experimental (delineamento I)	25
5.4.2 Infecção Experimental (delineamento II)	26
5.5 Avaliação da concentração de anticorpos de mucosa e séricos contra o VBI	26
5.6 Quantificação absoluta da carga viral pela técnica de RT-PCR em tempo real	28
5.6.1 Extração de RNA total	28
5.6.2 <i>Transcrição reversa (RT)</i>	29

5.6.3	PCR em tempo real	29
5.6.4	Construção da curva padrão para quantificação da carga viral pela técnica de PCR em tempo real.....	30
5.7	Imuno-histoquímica	31
5.7.1	Preparo do anticorpo detector primário anti-VBI.....	31
5.7.2	Análise imuno-química pela técnica de “Western blotting” do antissoro de cabra anti-proteína N recombinante do VBI	32
5.7.3	Padronização da Técnica de Imuno-histoquímica	33
5.8	Avaliação do movimento ciliar dos anéis traqueais obtidos de aves desafiadas com as estirpes do VBI	34
5.9	Exames histopatológicos dos órgãos obtidos de aves desafiadas com as estirpes do VBI	35
5.9.1	Histopatologia da Traqueia e Pulmão.....	35
5.9.2	Histopatologia dos Rins e das Gônadas.....	36
6	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	37
6.1	Determinação da infectividade viral.....	37
6.2	Sinais clínicos nas aves experimentalmente infectadas com as estirpes variante ou a M41 do VBI	37
6.3	Alterações macroscópicas na necropsia das aves experimentalmente infectadas com a estirpe variante ou a M41 do VBI	38
6.4	Análise da estase ciliar traqueal das aves experimentalmente infectadas com a estirpe variante ou a M41 do VBI	39
6.5	Histopatologia.....	42
6.5.1	Traqueia	42
6.5.2	Pulmão	45
6.5.3	Rim	46
6.5.4	Gônadas, tonsila cecal e ceco.....	51
6.6	Avaliação da resposta imune humoral local e sistêmica contra o VBI.....	55
6.6.1	Perfil cinético dos anticorpos Anti-VBI M41 dos isótipos IgM e IgG séricos	55
6.6.2	Perfil cinético dos anticorpos Anti-VBI M41 dos isótipos IgA, IgM e IgG na secreção lacrimal	59

6.6.3 Perfil cinético dos anticorpos Anti-VBI IBVPR-12 dois ótipos IgG no soro sanguíneo.....	65
6.7 Quantificação absoluta da replicação viral	66
6.7.1 Construção da curva padrão para quantificação absoluta da replicação viral	66
6.7.2 Quantificação absoluta da replicação viral em diferentes órgãos de aves infectadas experimentalmente com o VBI	67
6.7.3 Avaliação da persistência da estirpe IBVPR-12 através da detecção viral em amostras de suabe cloacal.....	73
6.8 Imuno-histoquímica	74
6.8.1 Análise imuno-química pela técnica de “Western blotting” do antissoro de cabra anti-proteína N recombinante do VBI	74
6.8.2 Detecção do VBI em tecidos por Imuno-histoquímica	76
6.9 Análise de patotipo e protectotipo do isolado IBVPR-12	82
7 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	83
8 CONCLUSÕES	84
9 REFERÊNCIAS	85



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





CEUA – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 011467/11 do trabalho de pesquisa intitulado "**Avaliação da patogenicidade e da imunidade cruzada de estirpe variante isolada no Brasil do vírus da Bronquite Infecciosa Aviária**", sob a responsabilidade do Prof. Dr. Hélio José Montassier está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal, adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação (COBEA) e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA), em reunião ordinária de 08 de Junho de 2011.

Jaboticabal, 13 de Junho de 2011.


Prof. Dr. Jeffrey Frederico Lui
Presidente - CEUA


Med. Vet. Maria Alice de Campos
Secretária - CEUA

AVALIAÇÃO DA PATOGENICIDADE E DA IMUNIDADE CRUZADA DE ESTIRPE VARIANTE DO VÍRUS DA BRONQUITE INFECCIOSA AVIÁRIA ISOLADA NO BRASIL

RESUMO - Nesse estudo, um isolado de campo do vírus da bronquite infecciosa (VBI) no Brasil (IBVPR-12), previamente classificado como um genótipo variante, foi caracterizado de forma comparativa com a estirpe M41 do VBI, sendo levantadas as características de patogenicidade em diferentes órgãos como a traqueia, o pulmão, os rins, as gônadas e as tonsilas cecais (patotipo) e a imunidade cruzada com relação à estirpe vacinal H120 do VBI (protectotipo), incluindo as respostas imunes humorais sistêmicas e locais induzidas. Para tanto, foram utilizados grupos experimentais de galinhas “specific pathogen free” (SPF) previamente vacinadas ou não com a estirpe H120 do VBI e depois desafiados com essa variante viral, ou com a estirpe M41. Para essas duas estirpes virais foram avaliadas a capacidade de replicação e as lesões produzidas em diferentes órgãos, a atividade inibidora do movimento ciliar no epitélio traqueal e as respostas imunes humorais desenvolvidas no soro sanguíneo e na secreção lacrimal dessas aves. Foram observadas diferenças marcantes na patogenicidade e no tropismo tecidual desses vírus, sendo que a estirpe M41 apresentou replicação mais intensa e lesões mais pronunciadas no trato respiratório, especialmente na traqueia, enquanto que a estirpe variante foi encontrada de forma mais distribuída em vários dos órgãos analisados, tendo-se replicado e provocado menos lesões na traqueia, mas alcançando maior replicação e tendo causado lesões mais severas nos rins e nos testículos. Nas regiões teciduais mais afetadas por lesões, a presença do VBI foi detectada por marcação específica com anticorpos policlonais contra a nucleoproteína do VBI pela técnica de imuno-histoquímica. As aves vacinadas com a estirpe H120 do VBI, revelaram proteção parcial contra a estirpe variante em órgãos como traqueia e rins e nenhuma proteção cruzada foi detectada nos testículos. O conjunto desses resultados caracterizou um novo patotipo e outro protectotipo dessa variante do VBI, isolada de campo no Brasil, em relação a estirpes do sorotipo Massachusetts (M41 e H120), ressaltando a importância de que novos estudos sejam futuramente realizados com essa e com outras variantes do VBI que tenham sido ou venham a ser isoladas em nosso país, a fim de que medidas mais efetivas de controle possam ser implementadas.

Palavras chave: vírus da bronquite infecciosa, variante, patotipo, protectotipo

EVALUATION OF PATHOGENICITY AND CROSS- IMMUNITY OF A VARIANT FIELD ISOLATE FROM BRAZIL OF AVIAN INFECTIOUS BRONCHITIS VIRUS

ABSTRACT - In this study a Brazilian field isolate of infectious bronchitis virus (IBV), previously classified as variant genotype, was characterized comparatively with the M41 strain of IBV, by evaluating the pathogenicity in different organs (trachea, lung, kidney, gonads and caecal tonsil) and the cross-immunity with H120 vaccine strain, including the systemic and local humoral immune responses. Experimental groups of specific pathogen free (SPF) chickens were vaccinated or not with H120 strain of IBV and challenged with this variant isolate. The viral replication and histopathology in different tissues and organs, the ability to inhibit ciliar movement of tracheal epithelial cells, and local and systemic humoral immune responses were evaluated in these chickens. The pathogenicity and tissue tropism of these IBV strains showed marked differences, and while the M41 strain damaged more the respiratory tract, specially the trachea, the variant isolated has a wide tissue distribution, showing less replication and lesions in the trachea, but affecting more severely the kidney and the testicles. In the most affected tissue regions, the presence of IBV was detected by immunohistochemistry technique, using an anti-nucleoprotein polyclonal antibodies. The H120 vaccine induced against this variant isolate a partial protection with regard to the infection of trachea and kidney and no cross-protection to the infection of testicles. In conclusion, a new pathotype and a new protectotype of a variant genotype of a Brazilian IBV isolate were characterized in this study with regard to Massachusetts genotype and serotype strains of IBV, indicating the importance for future investigations with other Brazilian IBV isolates in order to more effective control programs of IBV infection could be applied in this country.

Keywords: infectious bronchitis virus, variant, patotype, protectotype

Lista de abreviaturas

Acs - Anticorpos

aMPV – Metapneumovírus aviário

Ark- Estirpe Arkansas do vírus da Bronquite infecciosa

BI – Bronquite Infecciosa

CD8+ - Marcador de linfócito T citotóxico CD8+

CT – “Threshold Cycle”

CTL – Linfócito T citotóxico

DE – Desenvolvimento Embrionário

DEPC – Dietil-pirocarbonato

DIE – Dose Infectante Embrionária

DNA – Ácido desoxirribonucléico

dpi – dia pós-infecção

dpv – dia pós-vacinação

DTT – Dithiothreitol

ELISA – “Enzymed Linked Immunosorbent Assay”

H120 – Holland 120

HE – Hematoxilina-Eosina

HI – Inibição da Hemaglutinação

HRV2 – Região de hipervariabilidade gênica 2

IHQ – Imuno-histoquímica

IL – Interleucina

NDV – Vírus da doença de Newcastle

qPCR – Reação em cadeia da polimerase quantitativa

VILT – Laringotraqueíte infecciosa

IV – Isolamento Viral

Kb – Quilobases ou 1000 unidades de bases

kDa - Kilodalton

LCA – Líquido Cório Alantóide

LPD- Leite em pó desnatado

OIE – Organização Mundial de Saúde Animal

MPV - metapneumovírus aviário

M41 – Massachussets 41

ng – Nanograma

pb – Pares de bases

PCR – “Polimerase Chain Reaction” - Reação em Cadeia da Polimerase

pg - Picograma

pi – Pós Infecção

RNA – Ácido ribonucléico

RT- “Reverse transcription” - Transcrição Reversa

rt RT-PCR – Reação em Cadeia da Polimerase em tempo real

S – “Spike” - Glicoproteína de Superfície

SARS - Síndrome Respiratória Aguda Severa

S-ELISA-Con A - Sandwich-ELISA-Concanavalina A

SPF – “Specific Pathogen Free” – Livre de patógenos específicos

TA – Temperatura Ambiente

T_m – “Melting temperature” – Temperatura de dissociação

TNF – Fator de Necrose Tumoral

VBI –vírus da Bronquite Infecciosa

VDM- Vírus da doença de Marek

VIA – Vírus da Influenza Aviária

VN – Vírus-neutralização

Lista de tabelas

	Página
Tabela 1. Nomenclatura, número de acesso e procedência do par de “primer” utilizado neste estudo.....	30
Tabela 2. Parâmetros de avaliação da ciliostase de anéis traqueais para a avaliação do estado de proteção frente ao desafio com o VBI.....	34
Tabela 3. Resultados da inoculação da estirpe IBV PR-12 em ovos embrionados, utilizados para calculo de Reed & Muench	37
Tabela 4. Avaliação do escore de inibição do movimento ciliar da traqueia (de 0 a 4) de aves do delineamento experimental I e II, nos diferentes intervalos pós-infecção .	40
Tabela 5. Média do índice de gravidade da lesão renal de três aves de cada grupo desafiado com a estirpe variante IBV PR-12.....	47

Lista de Figuras

Página

- Figura 1.** Representação esquemática do vetor pGEMTEasy (Promega), no qual foi clonado um fragmento do gene S1 da estirpe M41 do VBI 31
- Figura 2.** Comparação de escores totais de ciliostase na traqueia das aves dos grupos vacinados e desafiados e apenas desafiados nos diferentes intervalos pós-desafio 41
- Figura 3.** Comparação entre os resultados de escores da histopatologia entre quarto dia e décimo quarto dia pós-desafio..... 43
- Figura 4.** Fotomicrografias de traqueias das lesões histopatológicas encontradas. A. Fotomicrografia de traqueia de ave do grupo controle negativo (não vacinado e não desafiado) no 14^o dpi. B. Traqueia de ave do grupo ANV no 4^o dpi. C. Traqueia de ave do grupo ANV no 7^o dpi. D. Traqueia de ave do grupo BNV com 7 dpi. HE, obj. 20x 44
- Figura 5.** Fotomicrografias das alterações pulmonares das aves pertencentes aos grupos desafiados com a variante IBV PR-12 e M41 46
- Figura 6.** Fotomicrografias das lesões renais das aves pertencentes aos grupos desafiados com a variante IBV PR-12..... 49
- Figura 7.** Fotomicrografias de lesões histopatológicas de diferentes órgãos. A. Testículo de ave pertencente ao grupo não vacinado e desafiado com a estirpe variante IBVPR-12 com onze dpi. HE, obj. 20x. B. Tonsila cecal de ave não vacinada e desafiada com a estirpe IBV PR-12. HE, obj. 10x. C. Porção intestinal correspondente ao ceco de ave do grupo vacinado e desafiado com a variante. HE, obj. 40x..... 54
- Figura 8.** Perfil cinético (médias) da produção de anticorpos do isótipo IgG anti-VBI M41 detectados pelo SELISA-Com A nas amostras de soro das aves nos diferentes dias pós-vacinação (dpv) ou pós-infecção (dpi) 56
- Figura 9.** Perfil cinético (médias) da produção de anticorpos do isótipo IgM anti-VBI M41 detectados pelo SELISA-Com A nas amostras de soro das aves nos diferentes dias pós-vacinação (dpv) ou pós-infecção (dpi) 58
- Figura 10.** Perfil cinético (médias) da produção de anticorpos do isótipo IgA anti-VBI M41 detectados pelo SELISA-Com A nas amostras de lágrima das aves nos diferentes dias pós-vacinação (dpv) ou pós-infecção (dpi) 61
- Figura 11.** Perfil cinético (médias) da produção de anticorpos do isótipo IgM anti-VBI M41 detectados pelo SELISA-Com A nas amostras de lágrima das aves nos diferentes dias pós-vacinação (dpv) ou pós-infecção (dpi) 62

- Figura 12.** Perfil cinético (médias) da produção de anticorpos do isótipo IgG anti-VBI M41 detectados pelo SELISA-Com A nas amostras de lágrima das aves nos diferentes dias pós-vacinação (dpv) ou pós-infecção(dpi) 64
- Figura 13.** Perfil cinético (médias) da produção de anticorpos do isótipo IgG anti-VBI IBVPR-12 detectados pelo S ELISA-Com A nas amostras de soro das aves nos diferentes dias pós-vacinação (dpv) ou pós-infecção (dpi). ‘ 65
- Figura 14.** Curva padrão gerada com uso dos valores de C(T)vs.Log₁₀ das diluições seriadas de razão 10 (10⁻⁴ a 10⁻⁹) do DNA plasmidial correspondente ao gene S1 do VBI 66
- Figura 15.** Número de cópias do gene S1 do VBI (Log₁₀) detectados nos diferentes órgãos das aves dos grupos ANV, ANVJ, AV, BNV e BV nos diferentes intervalos pós-desafio..... 70
- Figura 16.** Membrana de western blotting com soro policlonal de cabra anti Nr/ VBI, demonstrando a reatividade do antissoro produzido contra a proteína N do VBI frente a uma estirpe de referência vacinal e mais dois diferentes isolados de campo desse mesmo vírus. Todas as amostras foram concentradas com PEG. Na canaleta 1, 7 ul do marcador de peso molecular de proteína (SPECTRA, FERMENTAS); na canaleta 2, a estirpe de referência vacinal M41; na canaleta 3, o isolado de campo do VBI IBVPR-05; e na canaleta 4 o isolado de campo IBVPR-12 75
- Figura 17.** Detecção antigênica por imuno-histoquímica em diferentes órgãos A. Fotomicrografia de traqueia de ave do grupo ANV com sete dpi; Polímero ligado a peroxidase, obj. 20x. B. Fotomicrografia de pulmão de ave do grupo ANV com sete dpi. Polímero ligado a peroxidase, obj. 10x. C. Rim de ave correspondente ao grupo ANV com sete dpi; Polímero ligado a peroxidase, obj. 20x. D. Testículo de ave do grupo AV com sete dpi. Polímero ligado a peroxidase, obj. 40x 79

1. INTRODUÇÃO

A avicultura brasileira atualmente ocupa um lugar de destaque no cenário mundial, sendo o país com maior exportação de carnes de frango e o terceiro em termos de produção de carne e derivados de frango, alcançando a produção de 12,9 milhões de toneladas no ano de 2011 (USDA). Tratando-se da produção de ovos, o Brasil é capaz de atender o mercado interno, porém as exportações brasileiras são pouco expressivas o que sinaliza para um grande mercado potencial ainda pouco explorado (CNPSA).

No entanto, as doenças infecciosas em geral e, em particular, as doenças respiratórias de etiologia viral na avicultura exercem um impacto significativo em perdas econômicas no mundo todo. Estes danos são, em suma, relacionados à diminuição do crescimento e conseqüente perda na produção de carne, comprometimento da qualidade e da produção de ovos e em alguns casos ocasionados por uma taxa variável de mortalidade. Os agentes virais com maior potencial em 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 infecção respiratória, apesar de serem mais brandos quando comparados com os 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 (MPV) e o vírus da bronquite infecciosa aviária (VBI). Entre estes agentes causadores de doenças respiratórias, o vírus da bronquite infecciosa (VBI), um coronavírus do gênero *Gammacoronavirus*, composto por fita simples de RNA não segmentado com sentido positivo (CAVANAGH, 2001; de VRIES et al.,1997), é o que possui maior importância econômica, principalmente por seu potencial de ampla disseminação entre as criações avícolas (JONES, 2010).

O BI é conhecido principalmente por ocasionar uma doença aguda do trato respiratório de seus hospedeiros. No entanto, algumas estirpes deste vírus podem desenvolver lesões em diversos órgãos do trato urogenital, reprodutor e digestório das aves infectadas. Esta característica está relacionada principalmente pela alta taxa de variabilidade genética do VBI, que reflete no surgimento de estirpes

variantes genéticas e, em alguns casos fenotípicas, com padrões de tropismo e patogenia diferentes das estirpes referenciais. A prevenção da bronquite infecciosa (BI) no Brasil é feita pela vacinação dos plantéis, sendo utilizada a vacina atenuada da estirpe Massachusetts (Mass).

Em adição a isso, sabe-se que a maioria dos isolados brasileiros do VBI, até 1989, foram classificados no sorotipo Massachusetts. Entretanto, a partir da década de 90, a maior parte das amostras isoladas desse vírus teve apenas uma estirpe classificada no sorotipo Massachusetts, sendo que os demais isolados descritos eram antigenicamente diferentes desse e de outro sorotipo clássico, o sorotipo Arkansas. Tais estirpes mostraram-se também ser diferentes não só entre si, como também daqueles sorotipos descritos em outros países, tendo sido identificados pelo menos cinco tipos antigênicos diferentes que coexistiam no sudeste brasileiro, nesse mesmo período.

Mais recentemente, isto é, a partir do ano 2000, genótipos do VBI com características de variantes autóctones têm sido identificados em amostras colhidas de aves de plantéis brasileiros localizados nas principais regiões de produção avícola do Brasil. As análises filogenéticas mostraram que os genótipos brasileiros do VBI apresentavam-se segregados em um grupo filogeneticamente distinto de outros grupos constituídos pelas principais estirpes de referência do VBI provenientes dos continentes Europeu e Asiático, dos Estados Unidos e da Austrália, incluindo aquelas que são relacionadas ao sorotipo Massachusetts, levando a inferir que a presença de variantes do VBI nos plantéis brasileiros pode ser a razão para o insucesso no controle do vírus no Brasil. Foi verificado também que, além de lesões respiratórias, os novos isolados brasileiros do VBI que foram genotipados como variantes, têm sido também associados com diversas manifestações clínicas e patológicas da BI nos plantéis avícolas, tais como traqueobronquites e aerossaculites, lesões renais e problemas reprodutivos em fêmeas e em machos, ficando, assim, caracterizado o potencial de um amplo espectro de patótipos dentre esses novos isolados do VBI.

O fato é que no Brasil pouco se sabe quanto a patogenia destas variantes e qual é o “*status*” de proteção desenvolvido pela vacina de referência preconizada (Mass) frente às estirpes heterólogas.

De posse dessas informações foi então formulado o objetivo principal deste trabalho, no sentido de caracterizar comparativamente com a estirpe M41, a patogenicidade de um novo isolado de campo do VBI, no Brasil, previamente identificado como uma variante genotípica, bem como avaliar a imunidade cruzada dessa variante com relação à estirpe vacinal do sorotipo Massachusetts (H120) desse mesmo vírus.

2. Revisão de Literatura

2.1. Bronquite infecciosa aviária

A (BI) é causada por um coronavírus conhecido como VBI. Este vírus é um patógeno de grande importância na avicultura, sendo capaz de provocar infecções principalmente em frangos de corte, galinhas poedeiras comerciais e aves reprodutoras, acarretando menor produção de carne e ovos pela indústria avícola mundial. A BI foi descrita pela primeira vez em Dakota do Norte, nos Estados Unidos, em 1930. No Brasil foi relatada pela primeira vez em 1956 e desde então, vem acometendo aves de todas as idades, em diferentes regiões onde há indústria avícola instalada (ASSAYAG, 2004; CAPUA et al., 1999; CAVANAGH; NAQI, 2003; DI FÁBIO; ROSSINI, 2000; HIPÓLITO et al., 1973).

A BI é uma doença aguda, contagiosa caracterizada principalmente por sinais respiratórios. O VBI vem evoluindo desde a sua descoberta, o que resulta em alterações genotípicas e fenotípicas relevantes nas progênes produzidas pela replicação desse vírus. Essas alterações acarretam diferentes formas de patogenia e antigenicidade nas variantes do VBI geradas, dificultando o diagnóstico e o controle sanitário por meio da vacinação convencional com uma determinada estirpe de referência vacinal. Algumas estirpes variantes podem apresentar tropismo para outros tecidos e órgãos além do sistema respiratório, tais como rins, intestino, ovários e testículos. O uso difundido de vacinas vivas e inativadas pode complicar tanto os resultados advindos do diagnóstico direto desse vírus, quanto aqueles obtidos no sorodiagnóstico. Ademais, as estirpes variantes antigênicas do VBI podem se evadir da imunidade induzida pela vacinação com estirpes de referência vacinal heterólogas, pois a resposta imune pós-vacinal não seria efetiva em bloquear a infecção provocada por essas estirpes variantes.

2.2. Etiologia e morfologia viral

O VBI pertence à ordem *Nidovirales*, família *Coronaviridae*, gênero *Gammacoronavirus* (grupo III) (CAVANAGH, 2001; de VRIES et al., 1997). Seu genoma é composto por uma fita simples de RNA de sentido positivo, não segmentado de 27,6 kilobases (Kb) de comprimento, que codifica proteínas estruturais e não estruturais do vírus. Quatro genes diferentes são responsáveis por

codificar suas principais proteínas estruturais: a glicoproteína de superfície (S), uma pequena proteína de envelope (E), a glicoproteína da matriz (M) e a proteína que constitui o nucleocapsídeo (N) (CASAIS et al., 2005). As proteínas S e N possuem importantes funções biológicas e imunológicas na constituição do vírus da bronquite infecciosa, que aqui serão descritas mais detalhadamente.

O gene S codifica a principal proteína estrutural, a glicoproteína S que é constituída por diversas projeções no envoltório externo viral. Essa glicoproteína é pós translacionalmente clivada em duas subunidades, a subunidade amino-terminal S1 de 92 kDa e a subunidade S2 de 84 kDa, compreendendo cerca de 500 e 600 aminoácidos, respectivamente (CAVANAGH, 1983; CAVANAGH, 2007). A glicoproteína S pode ser dividida em três domínios estruturais, sendo, um domínio externo (dividido em dois subdomínios S1 e S2), um domínio transmembrana e um domínio curto carboxi-terminal (CAVANAGH, 1983; LAI; HOLMES, 2001). O gene S1 é o mais variável e pode apresentar mutações em sua sequência de aminoácidos, que acarretam alterações na antigenicidade e no tropismo tecidual das estirpes mutantes do VBI (CAVANAGH; NAQI, 2003). Estas variações podem ocorrer em torno de 2 a 25% na sequência de aminoácidos. Por outro lado a subunidade S2 é mais conservada (CAVANAGH et al., 1992, 1997; KANT et al., 1992; KOCH et al., 1990).

Ainda conforme descrito acima, deve-se salientar que o glicopolipeptídeo S1 é responsável pela infectividade viral, por possuir sítios que se combinam com os receptores de células alvo da infecção pelo VBI. Dessa forma, em regiões próximas a esses sítios estão presentes os principais determinantes antigênicos que induzem a formação de anticorpos neutralizantes. Um aspecto interessante é que a variação gênica de algumas regiões codificadoras da glicoproteína S; especialmente aquelas correspondentes aos sítios de vírus-neutralização, passa a se constituir na principal estratégia do VBI para escapar dos mecanismos de defesa do hospedeiro (CAVANAGH et al., 1992; CAVANAGH et al., 1997; KEELER et al., 1998; COOK et al., 1999; MURPHY et al., 1999).

Por isso, pode-se afirmar que essa glicoproteína possui um papel biológico de elevada relevância para esse patógeno viral e para o organismo hospedeiro das aves. Nesse contexto, sabe-se que a glicoproteína S é a principal indutora da

resposta imune protetora contra a infecção pelo VBI. A mesma é de fundamental importância na definição de quais estirpes desse vírus, que sofreram variação gênica, também alteraram sua antigenicidade e patogenicidade, a fim de estabelecer uma relação homóloga ou heteróloga com a estirpe vacinal de referência, que é usada no Brasil. Ainda neste enfoque, poderiam ser investigadas quais estirpes apresentam características essenciais para desenvolver uma potencial resposta imune nas aves e serem candidatas a entrarem na formulação de vacinas e dos esquemas imunoproláticos mais efetivos a serem adotados contra a BI.

Quanto ao gene N, este juntamente com o RNA genômico, forma o nucleocapsídeo helicoidal (COLLISON et al., 1992; SAPATS et al., 1996). A proteína do nucleocapsídeo é por definição, uma fosfoproteína que contém 409 aminoácidos, que forma uma concha protetora e embala o RNA genômico viral, além de desempenhar importante função na imunidade mediada por células (SEO; COLLISON, 1997; SEO et al., 1997). Ademais, esta proteína por sua vez, é altamente conservada, e na sua constituição podem se diferenciar entre 2 e 6% ao nível de aminoácidos nas estirpes variantes (WILLIAMS et al., 1992).

Com relação à glicoproteína M, sabe-se que ela interage com o nucleocapsídeo interno da partícula viral e tem cerca de 230 aminoácidos, sendo que desses, somente 10% estão exteriorizados no envelope viral.

Além da glicoproteína M, são encontradas quantidades reduzidas de uma proteína pequena não glicosilada (proteína E) que é formada por aproximadamente 100 aminoácidos. Essas duas proteínas são necessárias para a maturação e formação de partículas virais íntegras e maduras do VBI (CAVANAGH, 2007).

Portanto, diversas alterações podem ocorrer na composição, estrutura e propriedades antigênicas das proteínas do VBI, em decorrência de fenômenos de mutação e recombinação, que fazem parte da evolução do agente, e afetam os genes codificadores dessas proteínas. Esses eventos são responsáveis pela elevada variabilidade genética e antigênica do VBI, traduzindo também em diferentes tipos patogênicos com variadas formas de patogenicidade, definindo-se, assim, os patotipos. Tudo isto torna extremamente difícil o controle da infecção pelo VBI.

Os coronavírus também possuem um conjunto de genes que codificam proteínas acessórias de função desconhecida que não são necessários para a replicação *in vitro* (YOUN et al., 2005; CASAIS et al., 2005), porém podem desempenhar um papel importante na patogênese (ORTEGO et al., 2003). O VBI codifica dois genes acessórios, os genes 3 e 5, que expressam quatro proteínas acessórias, a 3a e 3b e 5a e 5b. Ainda neste contexto, além dos genes estruturais e acessórios, dois terços do genoma dos coronavírus corresponde ao gene da replicase, que expressa duas poliproteínas, pp1a e pp1ab. A pp1ab é o produto da extensão de pp1a, como resultado do “frame shifting” do gene -1 ribossomal durante o “reading frame” na tradução. As duas poliproteínas são clivadas por dois tipos de proteinases virais, que resultam em 16 proteínas não-estruturais (Nsp1-16).

Foi demonstrado que os genes acessórios do VBI não são necessários para a replicação *in vitro* (CASAIS et al., 2005; HODGSON et al., 2006), mas sim o gene S (CASAIS et al., 2003; HODGSON et al., 2004). Mesmo com estas descobertas, ainda era obscura a função dos genes acessórios em relação à patogenicidade, até que recentemente, Armesto et al. (2009), ao utilizar em uma ferramenta de substituição de segmentos gênicos, mais especificamente o gene da replicase, de uma estirpe não virulenta, Beudette, para uma estirpe virulenta, Mass M41, mostraram que estirpe receptora, também denominada “quimera” se transformou em avirulenta. Este fato indicou que nenhum dos genes estruturais ou acessórios derivados de um isolado avirulento do VBI foram capazes de restaurar a virulência e que, portanto, a perda de virulência associada com a estirpe Beudette reside no complexo do gene da replicase.

2.3. Patogenia

O VBI infecta galinhas (espécie *Gallus gallus*) de todas as idades, e provoca mais lesões nos órgãos constituintes do sistema respiratório e urogenital (CAVANAGH, 2007; COOK, 2002). As manifestações clínicas incluem retardo do crescimento em frangos de corte, queda na produção de ovos e ocasionalmente morte das aves (CAVANAGH; NAQI, 2003).

Apesar de a nomenclatura do VBI sugerir um patógeno restrito ao trato

respiratório, este vírus, além de se replicar em tecidos e órgãos desse sistema (nariz, traquéia, pulmão e sacos aéreos), e causar lesões proeminentes nesses tecidos ou órgãos; os quais são sua porta de entrada, apresenta também tropismo e patogenicidade para muitos outros tipos de células epiteliais. Entre estas incluem-se as renais, as células do oviduto ou as dos testículos e muitos outros tipos celulares do trato gastro-intestinal, tais como o esôfago, o proventrículo, o duodeno, o jejuno, a bursa de Fabrícus, as tonsilas cecais, o reto e a cloaca (CAVANAGH, 2003; CAVANAGH, 2005; DHINAKER, 1997).

Os isolados de VBI, independente do tecido de origem, infectam, inicialmente, as células ciliadas do epitélio que reveste a mucosa do aparelho respiratório, principalmente da traqueia das aves. Em consequência causa lesões características na traqueia, que é o órgão de eleição para sua multiplicação, sendo por isso, considerada doença primária do aparelho respiratório (KING, CAVANAGH, 1991). Apesar disso, alguns dos isolados apresentam tropismo exacerbado para os rins, oviduto e/ou, aparelho digestório (COOK et al., 2001; DHINAKAR RAJ; JONES, 1996; DI FÁBIO et al., 2000; FERNANDO et al., 2012).

Estirpes do VBI, quer sejam elas variantes, ou não, podem expressar uma predileção maior para outros tecidos, que não sejam do sistema respiratório, o que originará os diferentes patotipos virais. Estes caracterizam-se pelo tropismo de uma estirpe do VBI por um tipo particular de célula constituinte de determinado órgão. Ainda, deve ser considerado que, algumas vezes, a replicação desses vírus em um dado tipo celular, não desencadeia alterações patológicas significativas, mesmo quando este tecido apresente altos títulos virais (CAVANAGH, 2005; CAVANAGH; NAQI, 2003; AMBALI; JONES, 1990).

Os protectotipos ou tipos protetores do VBI são obtidos a partir de dados a respeito da eficiência de uma determinada formulação vacinal desse mesmo vírus. Com isso determina-se qual é a estirpe vacinal com maior capacidade de induzir uma proteção cruzada efetiva contra uma nova estirpe ou isolado de campo, caracterizando, assim, o protectotipo desse novo vírus. A tipagem antigênica faz a caracterização do sorotipo ou do “epitotipo” de uma dada estirpe viral, usando anticorpos vírus-específicos policlonais ou monoclonais respectivamente (DE WIT, 2000).

Em geral, a BI ocorre sob diferentes formas clínicas e anatomopatológicas. Quando são acometidas aves durante as primeiras semanas de vida, são mais comumente observados os sintomas respiratórios, caracterizados por espirros, estertores úmidos da traqueia e elevada taxa de morbidade e mortalidade. Nas poedeiras e reprodutoras, a enfermidade ocasiona queda de postura e/ou produção de ovos defeituosos, apresentado casca mole, rugosa e despigmentada, sem entretanto, haver uma mortalidade significativa. Há também, alguns patotipos do VBI que causam lesões renais mais proeminentes, e com vários graus de comprometimento renal, relacionados a nefrite e nefrose (KING; CAVANAGH, 1991). Nos últimos anos, diversas estirpes variantes do VBI têm sido isoladas em diversas regiões do mundo e associadas ao desenvolvimento de um quadro clínico e patológico que afeta mais os rins. Muitas dessas estirpes nefropatogênicas têm sido classificadas em genótipos variantes do VBI, após a análise filogenética de sequências do gene S1 (ZIEGLER et al., 2002; MEIR et al., 2004; BOUQDAOUI et al., 2005; FRANÇA et al., 2011; LIM et al., 2011).

Nas poedeiras e reprodutoras, durante a fase de recria, pode haver a manifestação tardia de urolitíase e a completa atrofia renal, sendo que a morbidade e a mortalidade são variáveis (2% a 10%). Ainda, há evidências de que a BI possa estar associada a quadros de enterite e de infertilidade em machos (CAVANAGH; NAQI, 2003; DI FÁBIO; ROSSINI, 2000; JONES, 2010; SILVA, 1989).

O coronavírus, semelhante a outros vírus que possuem genoma composto por RNA, com alta taxa de variabilidade genética durante a transcrição gênica, pode ser enquadrado como uma “quasiespecies”. Trata-se de agrupamentos contendo um conjunto de variantes genotípicas e fenotípicas de um vírus, que tem como fundamentação a divisão genômica interespecífica causada por influências internas e/ou externas, tais como o ambiente, os mecanismos de escape desencadeados pelo vírus, variabilidade e suscetibilidade ao hospedeiro (DOMINGO, 2002). Na verdade, o fenômeno das quasiespecies tem sido relatado entre os coronavírus, e considera-se importante para a evolução e persistência destes vírus, porque pode favorecer o surgimento de novas variantes na natureza, e pode contribuir na previsão dos mecanismos de escape do vírus às respostas imunes do hospedeiro (ROWE et al., 1998; KISS et al., 2000; NIX et al., 2000).

2.4. História do VBI no Brasil e no mundo

Durante décadas acreditava-se que as primeiras variantes do VBI foram isoladas no início dos anos 1950 nos Estados Unidos por Jungherr (1956). Este autor demonstrou a estirpe Connecticut (Conn), a qual não apresentava reação de neutralização e nem proteção vacinal quando utilizada a vacina da estirpe Massachusetts, isolada no início dos anos 1940. Desde então muitos relatos de outras variantes do VBI foram descritos em todo o mundo. Porém, no início do século XXI, Jia et al. (2002), por um estudo retrospectivo, identificou que duas amostras das 40 amostras de VBI isoladas entre 1930 e 1940 não pertenciam ao grupo Massachusetts (não-Mass), pela utilização de anticorpos monoclonais e da análise molecular de uma parte do gene da subunidade S1 da glicoproteína da espícula (S). Este fato levou a uma maior atenção para a busca e a identificação de estirpes variantes e o conhecimento de que muitos países possuem suas próprias estirpes, denominadas indígenas (MONTASSIER, 2010).

Ao se considerar a ocorrência do VBI na América Latina, verifica-se que a presença desse vírus foi relatada pela primeira vez na década de 1950 após o isolamento de uma estirpe do sorotipo Mass no Brasil (HIPÓLITO, 1957). As estirpes desse sorotipo parecem ter predominado até meados da década de 80, quanto foi reportado o isolamento da primeira variante no Brasil (Arkansas) (BRANDEN; DA SILVA, 1986).

Em outro estudo realizado em meados de 1990, foram isolados pelo menos cinco tipos antigenicamente diferentes de VBI em todo Brasil, principalmente nos grandes polos avícolas, com maior concentração de produtores, na região sul do país (DI FABIO et al., 2000). Recentemente, vários genótipos diferentes foram identificados no Brasil. Estas variantes genéticas foram identificadas tanto como variantes do gene S1 da glicoproteína da espícula (VILLARREAL et al., 2007a; VILLARREAL et al., 2007b; MONTASSIER et al., 2006, 2008) quanto do gene da nucleoproteína (N) (ABREU et al., 2006). Estas análises trouxeram grande contribuição no contexto genealógico das estirpes do VBI que estavam circulando no Brasil, no entanto, estudos de proteção vacinal frente à estas estirpes e análise de caracterização patogênica não foram realizados.

Os estudos de proteção vacinal contra estirpes isoladas na década de 1990 no Brasil mostraram que o sorotipo Mass, forneceu proteção inadequada contra a maior parte dessas novas variantes brasileiras do VBI (COOK et al., 1999; DI FABIO et al., 2000). Consta na literatura que essas estirpes foram isoladas de surtos de BI, apresentando diversas manifestações clínicas e patológicas, tais como traqueo-bronquites e aerossaculites, lesões renais e problemas reprodutivos em fêmeas e em machos. Esses achados caracterizaram, assim, o potencial de um amplo espectro de patotipos dentre esses isolados do VBI no Brasil (DI FABIO et al., 2000; ITO et al., 2006; MONTASSIER et al., 2006; VILLARREAL et al., 2007a; BRANDÃO, 2010; FERNANDO et al., 2010; MONTASSIER, 2010). No entanto, testes de caracterização de patotipos e de proteção vacinal dessas variantes não foram realizados. Da mesma forma não há relatos científicos mais detalhados das características biológicas destas variantes do VBI que foram isoladas mais recentemente.

Ainda, Hidalgo et al. (1976) relataram o primeiro isolamento do VIB (sorotipo Mass) no Chile em 1975. Pouco mais de uma década mais tarde, foi feita a primeira identificação de variantes no Chile (HIDALGO et al., 1986). Já na década de 80, o Chile passou por um grave problema de BI em frangos de corte e galinhas poedeiras comerciais, sendo este surto associado com variantes do VBI. Nove isolados do VBI foram obtidos a partir de 23 planteis que apresentavam problemas clínicos e patológicos compatíveis com BI. Os resultados da sorotipagem pelos testes de vírus-neutralização indicaram que quatro dos isolados chilenos do VBI eram sorologicamente relacionados com o sorotipo Mass e um dos outros isolados com o sorotipo Conn. Além disso, dentre esses isolados, três não foram relacionados antigenicamente com uma ampla gama de sorotipos do VBI isolados em muitos países. Uma dessas três estirpes e a estirpe Mass, quando administrada por via intranasal no oitavo dia de idade em aves SPF juntamente com os sorotipos patogênicos de *Escherichia coli*, causou mortalidade e morbidade considerável nessas aves (CUBILLOS et al., 1991).

Outros exemplos, na Argentina, Colômbia e México, nos quais foram isoladas e identificadas estirpes variantes do VBI que foram caracterizadas por análises moleculares e testes de neutralização, embora esses vírus não tenham sido

submetidos aos testes de proteção vacinal (RIMONDI et al. (2009); ALVARADO et al., 2005; ESCORCIA et al., 2000; CALLISON et al., 2001; GELB et al., 2001). Ainda, é interessante destacar que algumas das estirpes isoladas na Argentina e foram caracterizadas como variante genotípica, estão geneticamente relacionadas com algumas variantes isoladas no Brasil. Por isso foram suscitados muitos questionamentos com relação a essas estirpes, no que diz respeito a sua origem. Isso levou à formulação de duas hipóteses possíveis; ou esses vírus seriam indígenas ao menos de uma região da América do Sul, ou que tais estirpes podem ter sido carreadas de um país para o outro (MONTASSIER, 2010).

O histórico do surgimento de estirpes variantes do VBI no continente europeu deu-se no início da década de 70 no Reino Unido (DAWSON; GOUGH, 1971). Estas variantes, de sorotipos distintos da estirpe Mass, demonstraram em infecções experimentais, que se tratavam de sorotipos que não encontravam barreiras ao infectar aves vacinadas com as estirpes de referência vacinal. Apesar de existirem vários relatos da identificação de diversas variantes, tanto por técnicas sorológicas, como moleculares, desde o primeiro isolado na Europa (GOUGH et al., 1996; MEULEMANS et al., 1987; CAPUA et al., 1994; ZANELLA et al., 2000; WORTHINGTON et al., 2008), poucas dessas estirpes têm sido associadas ao desenvolvimento de doença altamente danosa. Uma das estirpes mais importantes, de caráter altamente patogênico, é a conhecida estirpe nefropatogênica B1648, isolada na Bélgica em 1984, que causa lesões renais proeminentes (LAMBRECHTS et al., 1993; PENSAERT; LAMBRECHTS, 1994). No entanto, Cook et al. (1999), ao aplicar diferentes protocolos de imunização usando duas estirpes de referência vacinal, obteve boa proteção vacinal. Uma destas estirpes, utilizada na formulação vacinal foi uma das estirpes de maior importância internacional, mais conhecida como 4/91 (GOUGH et al., 1992; PARSONS et al., 1992; LE GROS, 1998), que surgiu no década de 1990, combinada com a estirpe de referência Massachusetts. A estirpe 4/91, ao contrário da maioria das outras estirpes, disseminou-se para várias partes do mundo e exigiu o desenvolvimento de vacinas vivas atenuadas para o controle de surtos ocasionados por ela.

O VBI foi relatado no continente asiático pela primeira vez em 1967, na Malásia. Desde então variantes foram identificadas em 1979 (LOHR et al., 1988). Com o avanço tecnológico na caracterização filogenética por técnicas moleculares, diversas estirpes vêm sendo caracterizadas como sorotipos distintos da estirpe Mass (ZULPERI et al., 2009; YU et al., 2001). Variantes do VBI também foram isoladas na Tailândia (POHUANG et al., 2009), Coreia do Sul (SONG et al., 1998; LEE et al., 2004) e Japão (MASE et al., 2004; MASE et al., 2008; SHIMAZAKI et al., 2008.)

As primeiras variantes do VBI foram reconhecidas em Taiwan em meados dos anos 1960, no qual duas linhagens distintas foram identificadas, Mass e variantes relacionadas com as relatadas em países asiáticos vizinhos (WANG; TSAI, 1996; WANG; HUANG, 2000; HUANG et al., 2004). No entanto, dados recentes sugerem que a principal estirpe variante em Taiwan pode ter surgido em decorrência da recombinação entre a região 5' terminal do gene N entre uma estirpe do VBI local e uma estirpe estrangeira (KUO et al., 2010). A falta de proteção vacinal fornecida pela estirpe Mass para fornecer proteção adequada frente estas variantes levou ao desenvolvimento de vacinas formuladas com vírus indígenas (HUANG; WANG, 2006).

Por muitos anos, pouco se sabia da situação sobre variantes do VBI na China, mas o fato de que as vacinas Mass foram usadas com sucesso, sugere que variantes não devem ter sido um problema até 1980. No entanto, desde meados dos anos 1990, muitos estudos publicados demonstraram a diversidade de variantes do VBI. Por meio de estudos in vivo e tipagem antigênica utilizando anticorpos monoclonais e de testes de neutralização cruzada, Wu et al. (1998) identificaram variantes altamente patogênicas dos VBI na China, associadas tanto com patótipos respiratórios, como nefropatogênicos. Estas variantes demonstraram que a vacinação com o sorotipo Mass H120 forneceu pouca proteção contra o desafio com estes isolados.

A variante chinesa mais conhecida, e que tem despertado atenção mundial, é a variante QX relatada por Yudong et al. (1998), associada com proventriculite. No entanto, ainda não está claro se os problemas de proventriculite que foram associados com a detecção de QX foram realmente causados pela infecção por este

VBI ou por outro fator, devido o fato da replicação local da estirpe no proventriculo não ter sido demonstrada.

Em um estudo com 26 isolados do VBI entre 1980 e final da década de 2000, quatro grupos foram identificados como variantes do gene N (WEI et al., 2009). Em outra análise genética de 26 variantes isoladas dos rins, proventrículo e oviduto, em diferentes áreas da China entre 1995 e 2004, Liu et al. (2006) identificaram VBI do tipo Mass e mais cinco genótipos aparentemente encontrado apenas na China. Um destes foi subsequentemente demonstrado que era o tipo indígena predominante na China daquela época (LIU et al., 2009b). Recentemente, com base na análise de sequências do gene S1, Zou et al. (2010) relataram que um genótipo diferente, é agora dominante. Além disso, foi identificada a variante 4/91 na China, juntamente com a estirpe australiana T, bem como uma variante chinesa nativa. Com tudo isso, a diversidade de variantes do VBI na China é agora bem estabelecida, algumas de circulação restrita no país, enquanto outras apresentam similaridades com variantes identificadas em outros países da Ásia.

Uma região curiosa no qual há uma contínua evolução do VBI é a Oceania, principalmente em países como a Austrália e a Nova Zelândia. Acredita-se que nessa região, as variantes do VBI evoluem de forma independente em relação ao resto do mundo, devido à sua posição geográfica isolada (IGNJATOVIC et al., 2006). Dessa forma, diversas variantes do VBI foram isoladas e caracterizadas desde o início dos anos 60 na Austrália (CUMMING, 1963). A partir de então, testes de protecção *in vivo* foram realizados com estas variantes (KLIEVE; CUMMING, 1988). Em dois estudos, Ignjatovic et al. (1997; 2006) ao utilizarem dois anticorpos monoclonais dirigidos contra as principais proteínas do VBI juntamente com a análise por sequenciamento, reconheceram diversas linhagens distintas de todas aquelas encontrados em outros lugares do mundo. Ignjatovic et al. (2002) em outro estudo comparativo de patogenicidade de 25 estirpes isoladas na Austrália, a partir da década de 60 e início dos anos 90, demonstraram que de 12 isolados entre 1961 e 1976, 9 apresentaram características de patotipos nefropatogênicos, enquanto apenas três das 13 estirpes isoladas entre 1981 e 1994 foram associadas com nefrite. Estes resultados sugeriram que houve uma alteração das estirpes do VBI

nefropatogênicas (1960 a 1970) para estirpes de caráter respiratório (1980 a início de 1990).

2.5. Epidemiologia

O contato direto com aves infectadas é a principal fonte de infecção, sendo o exsudato traqueo-brônquico e as fezes destas aves as principais fontes de vírus. O vírus se espalha horizontalmente por aerossol ou ingestão. A taxa de disseminação depende principalmente da virulência do vírus e o estado imunitário das aves. O VBI é altamente infeccioso e, em condições naturais, sinais clínicos respiratórios podem se desenvolver em aves que tiveram contato direto num prazo de 36 horas. Alimentos e água potável e que foram contaminadas por fezes, também são fontes de infecção do VBI. Esse vírus pode sobreviver durante um tempo considerável nas fezes e pode representar uma fonte contínua de reinfecção na fase de convalescência da doença. Lixo contaminado, calçados, vestuário, utensílios, equipamentos e pessoas em contato com as aves também são fontes potenciais de transmissão viral de forma indireta e têm sido implicados na propagação do VBI à grandes distâncias (ERBECK; McMURRAY, 1998; McMARTIN, 1993; PURCHASE et al., 1966).

O papel da transmissão vertical na epidemiologia do VBI não foi claramente estabelecida. A transmissão vertical do VBI foi suspeita em um caso de campo (McFERRAN et al., 1971). Este foi demonstrado em outro estudo em galinhas poedeiras infectadas experimentalmente que produziram ovos infectados entre uma e seis semanas após a infecção (COOK, 1971). O vírus também foi isolado a partir do primeiro dia de idade dos pintinhos dessas galinhas. Isto sugere que o VBI pode ser transmitido verticalmente. O VBI foi também detectado no sêmen de galos de até duas semanas após a inoculação, o que indica a possibilidade de que o oviduto de uma galinha portadora, e também o ovo no oviduto, podem ser infectados com esse sêmen.

A principal via de eliminação viral durante a fase aguda da doença, é feita pelo trato respiratório, no momento em que as aves tosse ou espirram, eliminando o vírus diretamente no meio ambiente. O pode ser recuperado e isolado, a partir de amostras da traqueia e dos pulmões, entre o primeiro e sétimo dia após a infecção,

em títulos infectantes consideráveis. O vírus também pode ser isolado a partir do conteúdo cloacal após 24 horas pós-infecção. As fezes contêm uma quantidade significativa de vírus durante um período prolongado de tempo, principalmente durante o curso de infecções crônicas, ou na fase de persistência desse vírus no organismo hospedeiro (ALEXANDE; GOUGH, 1977; COOK, 1968).

A latência verdadeira, tal como observado em infecções por herpes vírus, não é considerada ocorrer em infecções pelo VBI. No entanto, em algumas circunstâncias, o vírus pode persistir durante um período de tempo considerável em aves infectadas, sendo alguns órgãos mais privilegiados, como os rins e trato digestório, especialmente as tonsilas cecais na manutenção viral (CHONG; APOSTOLOV, 1982; EI-HOUADFI et al., 1986; ALEXANDER et al., 1978). Aves portadoras de infecções persistentes pelo VBI são consideradas as prováveis fontes de re-infecção em poedeiras, a qual ocorre em intervalos regulares (COOK, 1968). No entanto, a persistência não se desenvolve para todas as estirpes do VBI, tendo sido evidenciado que algumas apresentam maior capacidade de persistência no hospedeiro.

A transmissão do VBI ocorre principalmente por via aérea, por aerossóis e mais facilmente entre aves mantidas a uma distância de mais de 1,5 m. Os ventos predominantes também podem contribuir para a distribuição entre galpões que são separados por uma distância de até 1.200 m (CUMMING, 1970). Vetores não parecem ser um fator importante na propagação do VBI.

Outras espécies de aves não são consideradas suscetíveis à infecção por VBI. Esse vírus pode ser propagado em camundongos por via intra-cerebral (CUNNINGHAM et al., 1972). No entanto, a passagem de tais vírus parece resultar na seleção de uma população viral que não é patogênico para pintinhos (YACHIDA et al., 1979).

O VBI é sensível à temperatura e algumas diferenças podem existir em termos de sensibilidade térmica, mas no geral, a maioria das estirpes são inativadas a 56°C durante 15 minutos ou 45°C durante 90 min (OTSUKI et al., 1979). À temperatura ambiente, esse vírus pode sobreviver por poucos dias. A infectividade viral é afetado por armazenagem a 4 °C, e para armazenamento a longo prazo, é necessário manter esse vírus a -70°C. Além disso, o VBI é facilmente inativado por

muitos desinfetantes comuns, incluindo álcool 70%, clorofórmio, fenol, formalina e iodo (JORDAN; NASSAR, 1973).

2.6. Diagnóstico

Os métodos de diagnóstico convencionais, que também podem ser chamados de “clássicos” do VBI são primordialmente baseados no isolamento viral em ovos embrionados “Specific Pathogen Free” (SPF) (OWEN et al., 1991; GELB, 1989) ou em culturas celulares (HOPKINS, 1974), seguidos da identificação antigênica dos isolados. Outra alternativa é o isolamento do VBI a partir da inoculação em anéis traqueais de embriões de galinha SPF, a qual se revelou uma técnica bastante sensível (COOK et al., 1976), mas também muito laboriosa e demorada. Esse método pode ser associado a reação de imunofluorescência direta em cultura de traqueia, permitindo a detecção mais rápida do vírus (BHATTACHARJEE et al., 1994).

O VBI também pode ser detectado diretamente em tecidos de aves infectadas por meio da técnica de imuno-histoquímica (IHC) ou por hibridização “in situ” (COLISSON et al., 1990; HANDBERG et al., 1999). Diversos testes de imuno-histoquímica foram aplicados utilizando apenas anticorpos monoclonais para detecção do VBI, tanto para estirpes vacinais (NAQI et al., 1990; NAKAMURA et al., 1991; ABDEL-MONAIN et al., 2009) quanto para variantes (CHEEN et al., 1996; HANDBERG et al., 1999; ZIEGLER et al., 2002; FRANÇA et al., 2011). Esta ferramenta tornou-se de fundamental importância no que diz respeito ao rastreamento do tropismo viral de diferentes estirpes, permitindo uma análise topográfica da migração viral para órgãos distintos.

Os métodos sorológicos mais utilizados no diagnóstico da BI, são inibição da hemaglutinação (HI), vírus-neutralização (VN) (CAPUA et al., 1999) e ensaio imunoenzimático “Enzyme Linked Immunosorbent Assay” (ELISA) com anticorpos monoclonais ou policlonais. Vários ensaios imunoenzimáticos foram desenvolvidos e aplicados no diagnóstico laboratorial da BI. O ELISA apresenta a vantagem de sobrepujar os demais métodos sorológicos, em virtude do seu baixo limiar de detecção, associado a capacidade de oferecer resultados mais objetivos e reprodutíveis. Portanto, a classificação mais rápida das amostras analisadas em

níveis de reação imuno-enzimática e possibilitando o acompanhamento do grau de imunidade humoral local e sistêmica de um grande número de aves vacinadas contra o VBI (CARDOSO et al., 1996a; CARDOSO et al., 1996b; IGNJATOVIC; ASHTON, 1996; NAQI et al., 1993; ZELLEN; THORSEN, 1986; GARCIA; BANKOWSKI, 1981).

As técnicas de biologia molecular constituem, por sua vez, um meio de diagnóstico direto rápido, preciso e específico na detecção do VBI. Como exemplo, a reação em cadeia da polimerase antecedida pela transcrição reversa (RT-PCR) é uma ferramenta muito útil na detecção de diversos RNA-vírus (CAVANAGH, 1993). No caso do VBI, por ser um RNA-vírus, a PCR foi aplicada pela primeira vez de forma bem sucedida depois que o genoma viral foi transformado, por meio da reação de transcrição reversa (RT) em cDNA (JACKWOOD et al., 1992).

Tradicionalmente, a técnica de vírus neutralização realizada em ovos embrionados foi utilizada para identificar os diferentes sorotipos do VBI. No entanto, a técnica de RT-PCR em conjunto com o sequenciamento de genes específicos pode ser rotineiramente utilizada com o objetivo de discriminar diferentes estirpes do VBI (KEELER et al., 1998; JACKWOOD et al., 1997; KWON et al., 1993; MONTASSIER et al., 2008). Além disso, deve ser destacado que um rápido teste de avaliação do polimorfismo gênico que ocorre entre estirpes do VBI, pode ser feito sobre produtos amplificados do gene S submetidos a uma digestão (clivagem) com algumas enzimas de restrição. Este processo gera fragmentos de DNA de diferentes tamanhos, de acordo com a presença ou a ausência de determinados sítios para cada uma das enzimas utilizadas, constituindo; dentro de uma técnica conhecida como Polimorfismo de Tamanhos de Fragmentos Gerados por Digestão com Enzimas de Restrição (“Restriction Fragment Length Polymorphism”-RFLP) (JACKWOOD et al., 1997; KWON et al., 1993).

O surgimento da PCR em tempo real trouxe a possibilidade de se usar uma ferramenta de diagnóstico ainda mais rápido em relação à técnica de PCR convencional, com um aumento no índice de sensibilidade e reprodutibilidade, além de permitir que seja quantificado o número de cópias virais em diferentes tecidos, possibilitando uma interpretação mais completa e eficiente no que diz respeito à patogenia ao tropismo celular. Esta técnica deu suporte as análises histopatológicas

e imuno-histoquímica. Com isso, houve, também, uma redução no risco de contaminação do ambiente por manipulação do produto amplificado, já que, a PCR em tempo real permite a simultânea amplificação e detecção da sequência gênica alvo amplificada, pelo uso de marcadores fluorescentes, além de evitar manipulações adicionais na técnica de eletroforese e a exposição ao brometo de etídeo (CALLISON et al., 2006; NIESTERS, 2004; MACKAY et al., 2002; JACKWOOD et al., 2003, BENEYEDA et al., 2010).

Com o advento destas diferentes técnicas descritas anteriormente, a avicultura atual, principalmente no que se refere às viroses e, dentre elas a BI, pode desfrutar de muitas opções de diagnóstico laboratorial. Pode-se constatar então, se por um lado um conjunto significativo de dados sobre genotipagem tenham sido levantados para essas novas variantes de campo do VBI no Brasil e no mundo, por outro lado muito pouco se conhece sobre as relações entre propriedades genéticas e fenotípicas desses novos isolados brasileiros em comparação com as demais estirpes do VBI, e inclusive aquelas utilizadas na produção de vacinas. Em vista disso, fica evidente a importância de serem feitas investigações adicionais para melhor caracterizar os imunotipos e patotipos desses vírus, e avaliar os possíveis efeitos que as mudanças causadas por mutações e/ou recombinações no gene codificador da glicoproteína S1, ou até mesmo em outros genes desses isolados têm, sobre os perfis de patogenicidade e também sobre o grau de proteção conferido pelas vacinas comerciais disponíveis no mercado contra infecções causadas por estirpes brasileiras do VBI (MONTASSIER et al., 2008).

2.7. Prevenção e controle

O controle da bronquite infecciosa aviária é um trabalho difícil e laborioso, sendo que nenhum dos países que possuem indústria avícola em maior escala e mais desenvolvida, estão livres da BI.

Devido à natureza altamente infecciosa destes vírus, até mesmo as mais rigorosas medidas preventivas são, por vezes, insuficientes. Apenas as mais rigorosas medidas de quarentena, como aquelas utilizadas para manter aves SPF, e que não podem ser aplicadas comercialmente, parecem ser capazes de excluir o

VBI das criações avícolas (IGNJATOVIC; SAPATS, 2000). Isto implica circunstancialmente em uma interação vírus-hospedeiro nos plantéis avícolas.

O único meio prático de controlar a BI é a vacinação, medida essa que é aplicada rotineiramente em todas as aves industriais, principalmente em regiões endêmicas, podendo as vacinas serem vivas ou inativadas. Os programas de vacinação podem variar de um país para outro, ou mesmo de uma criação para outra, dentro do mesmo país, dependendo das condições locais e do levantamento das principais estirpes relatadas como circulantes.

As vacinas vivas estão em uso generalizado. A maior parte dessas vacinas é composta por estirpes do VBI que foram passadas em ovos embrionados, no intuito de diminuir a virulência deste vírus. As vacinas vivas podem ser administradas por meio de spray aerossol ou junto a água nos bebedouros, dependendo da vacina utilizada (HOFSTAD et al., 1975). A vacina intra-ovo ou embrionária é ainda pouco utilizada sendo restrita a alguns países mais desenvolvidos.

Vacinas compostas por estirpes menos atenuadas e com maior virulência residual, algumas vezes são utilizadas para a vacinação de reforço por volta de sete a dez dias de idade. Vacinas de baixa virulência são adequadas para pintainhos com baixo nível de imunidade materna e a vantagem destas vacinas é que elas não causam reações respiratórias, ou interferem menos na redução da taxa de crescimento, que pode ocorrer com vacinas de maior virulência (GEILHAUSEN et al., 1973). A desvantagem de se utilizar vacinas de baixa virulência é que o nível de imunidade previsto é baixo, e muitas vezes são suficientes apenas para proteger o trato respiratório. Muitas vezes, estas vacinas não induzem uma proteção eficaz para outros tecidos, tais como o rim e oviduto, contra o desafio com estirpes que são nefropatogênicas ou patogênicas para o trato reprodutivo (DHINAKAR; JONES, 1996).

Algumas vacinas vivas têm um grau significativo de virulência residual e uma tendência para produzir aerosaculite, particularmente em condições ambientais adversas e quando combinadas à infecção com bactérias como a *Escherichia coli* (HOPKINS; YODER, 1986). Diversos tipos antigênicos de vacinas da BI estão disponíveis em todo mundo, o que resulta em um grande problema para os produtores. Porém, a escolha da vacina, pode sem dúvida decidir o sucesso da

vacinação, e por isso deve se levar em conta quais são os tipos antigênicos prevalentes em determinadas regiões. As vacinas utilizadas com mais frequência são as pertencentes ao sorogrupo Massachusetts, como a M41, MA5, H52 e H120. Outras vacinas monovalentes também são usadas regionalmente na Europa e EUA, tais como Connecticut 46, Arkansas 99, Florida, JMK, 4/72 e D274.

Em todos os países com avicultura mais avançada, existe uma grande cautela quanto ao uso indiscriminado de vacinas vivas, de modo a não se utilizar estirpes vacinais de outras partes do mundo, que não estejam presentes em uma dada região ou país, e assim evitar a disseminação de linhagens genéticas e fenotípicas distintas das estirpes locais em suas criações.

Com relação às vacinas inativadas, estas são mais destinadas a criações de aves de postura, sendo mais comumente administradas por via subcutânea entre 13-18 semanas de idade, para galinhas que foram previamente imunizadas com a vacina contendo o vírus vivo atenuado. A grande vantagem das vacinas inativadas é que via de regra, ela é capaz de fornecer elevados níveis de anticorpos anti-VBI que persistem por períodos mais longos que os induzidos pela vacina viva (BOX et al., 1982). Níveis de anticorpos mais elevados são particularmente úteis para proporcionar proteção aos demais órgãos que não correspondem ao sistema respiratório, impedindo a propagação viral.

Uma das maiores dificuldades encontradas na sanidade avícola, é a identificação de sorotipos, patotipos e protectotipos de estirpes de campo em surtos da BI. Esta tarefa necessita de grande empenho para isolamento seguido dos demais testes para caracterização antigênica e biológica desse vírus. O resultado normalmente é confirmado por outros testes, tais como VN e sequenciamento de nucleotídeos. Algumas vacinas do VBI, tais como Mass, Conn, Ark ou D274 podem ser diferenciadas por anticorpos monoclonais específicos (KOCH et al., 1986; NAQI et al., 1993). Por isso, é de grande valia estabelecer características patogênicas de determinadas estirpes de campo, para que sirva de ferramenta e auxilie no direcionamento de possíveis surtos de BI no Brasil.

Em se tratando do Brasil, o controle da BI é baseado principalmente no uso de vacina viva atenuada, sendo somente permitido a utilização de estirpes do sorotipo Mass na composição destas vacinas (VILLARREAL et al., 2010). As

estirpes vacinais mais frequentemente utilizadas no Brasil são H120, H52 e Ma5 do VBI. A vacina H120, devido ao seu maior número de passagens em ovos embrionados, é mais atenuada do que a H52. Vacinas de caráter menos patogênico muitas vezes podem não conferir imunidade adequada para outros órgãos em adição ao trato respiratório.

Ainda neste contexto, sabe-se que os mecanismos essenciais de proteção contra a infecção do trato respiratório pelo VBI em galinhas têm sido definidos como a capacidade de o sistema imune conferir resistência à traqueia contra a infecção por este vírus, reduzindo a replicação viral e impedindo principalmente que ocorram lesões mais severas na traqueia e a completa ciliostase no epitélio desse mesmo órgão. No entanto, com o repentino crescimento da indústria avícola no Brasil, a partir da década de 1990, diversas estirpes vieram a “reboque” trazendo grandes problemas sanitários. Estas estirpes muitas vezes se manifestam de maneira diferente das comumente associadas com a BI em nosso país. O principal desafio para a comunidade científica é saber o estado de proteção imune desencadeado pela vacinação com estas estirpes preconizadas e/ou oficialmente autorizadas em nosso país, frente a estas novas variantes.

A despeito da existência de inúmeros trabalhos na literatura versando sobre o nível de proteção contra o VBI, especialmente aquela que é decorrente do uso de vacinas, restam muitas dúvidas sobre a eficácia destas vacinas frente as variantes isoladas em todo o mundo, e cabe a nós antevermos as características biológicas destas estirpes, bem como buscar alternativas para um correto manejo sanitário contra estas variantes.

3. HIPÓTESE DE TRABALHO

Considerando que desde o ano 2000, um número expressivo de variantes genotípicas do VBI, identificadas com base em sequências de nucleotídeos do gene S1, têm sido isoladas de diferentes regiões do Brasil (MONTASSIER et al, 2006, 2008, VILLARREAL et al., 2007^{a/b}, 2010, FELIPPE et al., 2010, CHACÓN et al., 2011) , e também que a caracterização biológica de patotipo e de protectotipo,, não foi ainda elucidada de forma mais definitiva, foi formulada a hipótese para o presente estudo de que essas variantes genotípicas do gene S1 podem também se constituir em variantes fenotípicas de patotipo e de protectotipo em relação à estirpe de referência do genótipo / sorotipo Massachusetts do VBI.

4. OBJETIVOS

- Caracterizar o patotipo de um novo isolado de campo do vírus da bronquite infecciosa (VBI), identificado previamente como variante genotípica (MONTASSIER et al., 2006, 2008), através da infecção experimental de aves SPF, fazendo a avaliação de lesões macro e microscópicas em órgãos potencialmente alvos do trato respiratório e urogenital de aves SPF experimentalmente infectadas e relacioná-las à presença do VBI por meio da detecção viral pelas técnicas de imuno-histoquímica e de RT-PCR em tempo real.

- Avaliar a resposta imune humoral nos compartimentos sistêmicos e local induzidas pelo novo isolado de campo do VBI em aves SPF experimentalmente infectadas.

- Caracterizar o protectotipo de um novo isolado de campo do VBI, através da avaliação da proteção imune cruzada induzida pela vacina comercial atenuada H120 do VBI existente no Brasil, em aves SPF vacinadas e posteriormente submetidas à infecção com a nova variante isolada de campo desse vírus no Brasil.

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1. Amostras virais

Foi utilizada uma estirpe variante de campo do VBI (IBVPR-12), devidamente isolada e caracterizada geneticamente por meio de sequenciamento de nucleotídeos do gene da glicoproteína S1, no Laboratório de Imunologia e Virologia da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinária “Júlio de Mesquita Filho” - UNESP de Jaboticabal-SP (MONTASSIER et al., 2006, 2008). Foi também empregada a estirpe de referência M41 obtida da Fort Dodge Animal Health. Ambas estirpes foram propagadas por inoculação na cavidade córion-alantóide de ovos embrionados SPF e as suspensões do líquido córion-alantóide (LCA) colhidas foram usadas para a infecção experimental em aves SPF vacinadas ou não.

5.2. Propagação e isolamento viral

Os procedimentos de propagação das estirpes do VBI foram realizados em ovos embrionados SPF (specific pathogen free) com 9 dias de incubação provindos da Granja de Aves SPF da Brasil Foods, localizada em Uberlândia - MG. Esta técnica foi realizada com base na descrição de Owen et al. (1991), com modificações. Em suma, a amostra teste foi inoculada em ovos embrionados SPF com 9 dias de idade. A amostra foi preparada e diluída na razão 1:100 em meio Eagle e foi inoculada na cavidade corio-alantóide, administrando-se um volume de 200µL/ovo. Após 24 horas da inoculação, os ovos foram avaliados, sendo que a mortalidade que ocorreu neste período foi considerada inespecífica e o ovo descartado. Decorridas 36 horas após a inoculação, os ovos foram refrigerados à 4°C e o líquido cório-alantóide (LCA) foi colhido individualmente, sendo distribuído em alíquotas de 1,5mL e estocado a -70°C até o seu processamento para titulação da infectividade viral. A mortalidade do grupo controle (ovos inoculados apenas com meio Eagle) foi avaliada diariamente e, ao final de sete dias, os ovos foram resfriados e os embriões foram avaliados quanto a presença de lesões características da infecção pelo VBI, tais como “nanismo e enrolamento”.

5.3. Determinação da Dose Infectante Embrionária 50% (DIE_{50%})

A infectividade das estirpes variante e M41 do VBI foram determinadas por titulação viral em ovos embrionados de galinhas SPF, com 9 dias de incubação, conforme o método preconizado por Gelb et al. (1991). Partindo-se de suspensões de LCA colhido de ovos infectados com essas estirpes virais, foram preparadas diluições de razão constante igual a dez até a diluição final de 10^{-9} , em Meio Eagle (Gibco BRL, EUA) contendo antibióticos (200 UI/mL de Penicilina e 50 ug/mL de Estreptomicina) e antifúngico (50 UI/mL de Anfotericina B). As suspensões foram inoculadas na cavidade alantóide, no volume de 200 µL/ovo, sendo utilizados cinco ovos para cada diluição, além de dez ovos destinados ao controle (não infectados). A mortalidade foi observada durante todo o período de incubação, considerando-se morte inespecífica até 24 horas. Findados sete dias, as alterações embrionárias dos sobreviventes foram analisadas. O título foi expresso em Doses Infectantes Embrionárias 50% (DIE_{50%}), calculado pelo método de Reed e Muench (1938).

5.4. Infecção Experimental

Os experimentos foram realizados no infectório do Laboratório de Imunologia e Virologia Veterinária, Departamento de Patologia Animal, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de Jaboticabal, da Universidade Estadual Paulista – FCAV/UNESP. O protocolo obedeceu aos Princípios Éticos de Experimentação Animal, adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação (COBEA), aprovado pela Comissão de Ética e Bem Estar Animal (CEBEA) da FCAV-UNESP, conforme o protocolo nº 011467/11.

5.4.1. Infecção Experimental (delineamento I)

No primeiro delineamento, as aves SPF que eclodiram foram divididas em 3 grupos de 18 aves cada um. O primeiro grupo (ANV) foi infectado por via óculo-nasal aos 21 dias de idade com $10^{4,0}$, doses Infectantes Embrionárias 50% (DIE₅₀) da estirpe variante IBVPR-12 do VBI/ave. O segundo grupo (BNV) foi infectado com a

estirpe M41 pela mesma via e com $10^{5.0}$ DIE₅₀/ave, enquanto que um terceiro grupo (Grupo C) não foi submetido à nenhuma infecção, sendo mantido como grupo controle negativo da infecção (Quadro 1). Os sinais clínicos foram observados durante 3 semanas. Três aves foram submetidas à eutanásia aos 4, 7, 11, 14 e 21 dias pós-infecção (d.p.i.), sendo colhidas amostras de traqueia, pulmão, rim, tonsila cecal e gônadas (testículo ou ovário). Uma primeira parte das amostras de traqueia foi destinada à avaliação da ciliostase. A outra parte das amostras da traqueia juntamente com as de outros órgãos foram processados para a realização do exame histopatológico e de imuno-histoquímica. Além disso, uma terceira parte das amostras foi submetida ao congelamento rápido em nitrogênio líquido para posterior aplicação de técnica de RT-PCR em tempo real, segundo OKINO (2010).

Nos mesmos intervalos acima estabelecidos, foram colhidas amostras de soro e lágrima para mensuração de anticorpos anti-VBI dos isótipos IgG, IgA e IgM pela técnica de Sandwich-ELISA-Concanavalina (S-ELISA-Con A), usando-se a metodologia descrita por Bronzoni et al. (2005).

5.4.2. Infecção Experimental (delineamento II)

Em uma segunda etapa, outro conjunto de aves SPF foi separado, logo após a eclosão, em 4 grupos de 18 aves cada um. Dois dos grupos (Grupo AV e BV) foram vacinados aos 21 dias de idade com a vacina “viva” atenuada H120 do VBI (vacina comercial atenuada, na dose preconizada pelo fabricante, ou seja $10^{4.0}$ DIE_{50%}, por via óculo-nasal). Transcorridos 21 dias após a vacinação dos grupos AV e BV, as aves foram desafiadas, nas mesmas condições dos protocolos realizados na primeira etapa; ou com a estirpe variante do VBI (AV), ou com a estirpe M41 do VBI (BV). Um terceiro grupo (ANVJ), contendo aves com 2 dias de idade e não vacinadas foi desafiado com a estirpe IBVPR-12, constituindo o grupo de aves jovens não vacinadas e desafiadas com a estirpe variante do VBI. As aves foram observadas quanto aos sinais clínicos e sacrificadas para a colheita de amostras de órgãos no mesmo esquema preconizado anteriormente, para as análises de ciliostase traqueal, de histopatologia, de imuno-histoquímica e detecção/quantificação viral pela técnica de RT-PCR em tempo real.

Quadro 1. Nomenclatura (abreviação) e especificações dos grupos utilizados neste estudo e respectivas cores demonstrativas para o auxílio visual.

ANV	ANVJ	AV	BNV	BV	C
Aves adultas Não vacinado Desafiado com IBVPR-12	Aves jovens Não vacinado Desafiado com IBVPR-12	Aves adultas Vacinado Desafiadas com IBVPR-12	Aves adultas Não vacinado Desafiado com M41	Aves adultas Vacinado Desafiado com M41	Controle negativo Tratamentos com PBS

5.5. Avaliação da concentração de anticorpos de mucosa e séricos contra o VBI

A avaliação da concentração de anticorpos anti-VBI dos isótipos IgG, IgA e IgM foi realizada pelo teste de Sandwich-ELISA-Concanavalina A (S-ELISA-ConA), de acordo com o descrito por Bronzoni et al. (2005).

Em resumo, 50 µL de Concanavalina A (0,05 mg/mL diluída em PBS pH 7,4) foram aplicados na microplaca de poliestireno (Costar). A microplaca foi incubada a 4°C “overnight” (18 horas). O excesso de Concanavalina A foi eliminado por meio de quatro lavagens das cavidades da microplaca com tampão PBS acrescido de Tween 20 0,1% (PBST) pH 7,4.

Em seguida, foi realizado o bloqueio das cavidades da microplaca com tampão PBS acrescido de leite em pó desnatado (LPD) a 10% (100 µL por cavidade). Após, incubou-se a 37°C durante 45 minutos, e em seguida, lavada por mais quatro vezes com tampão PBST. Na fase subsequente, foram adicionados 50 µL de suspensão antigênica viral (estirpe M41 ou IBVPR-12 do VBI em LCA) diluído a 1:2 em PBS (pH 7,4) acrescido de 10% de LPD por cavidade, com incubação a 37°C, por uma hora. Seguindo-se a adição do antígeno e quatro lavagens, foram adicionadas as amostras-teste de soro, na diluição 1:100, ou de lágrima, na diluição 1:25, em duplicata. A reação foi incubada durante uma hora a 37°C. As microplacas foram lavadas quatro vezes com tampão PBST. Acrescentou-se 50 µL dos anticorpos conjugados com peroxidase anti-imunoglobulinas de galinha (Bethyl Laboratories;), específicos para os isótipos IgA (1:800), IgM (1:1000), ou IgG (1:6250), incubando-se durante duas horas a 37°C. Seguindo quatro lavagens das microplacas com PBST, foram acrescidos 50 µL de solução do substrato-cromógeno

Orto-fenileno-diamina (OPD, Dako, USA) diluído em H₂O deionizada contendo 0,006% de H₂O₂, sendo a reação incubada por um período de 15 minutos à temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Por fim, a reação de degradação enzimática do substrato foi bloqueada pela adição de 50 µL/cavidade de ácido clorídrico 1 M, sendo, ao final, as densidades ópticas (DO) obtidas e mensuradas em leitor de microplaca a 490nm (Bio-Rad, Modelo-550, USA).

Os valores de DO obtidos foram convertidos em A/P (amostra x positivo), de acordo com a equação abaixo.

$$AP = \frac{(DO \text{ amostra teste} - DO \text{ controle negativo})}{(DO \text{ controle positivo} - DO \text{ controle negativo})}$$

5.6. Quantificação absoluta da carga viral pela técnica de RT-PCR em tempo real

5.6.1. Extração de RNA total

A extração do RNA total dos órgãos em avaliação foi realizada com o kit comercial Trizol Reagent (Invitrogen, Life Technologies), seguindo as recomendações do fabricante.

Brevemente, entre 100-200mg das amostras foram maceradas juntamente com 1000 µL de Trizol Reagent, com auxílio de um micropistilo e um microtubo isento de DNase e RNase. A mistura foi homogeneizada por 15 segundos em vórtex e incubada por 5 minutos à temperatura ambiente (TA). Acrescentou-se 200 µL de uma mistura de clorofórmio e álcool isoamílico (24:1), realizando-se agitação por inversão por no mínimo 10 vezes. Após um período de cinco minutos à TA, as amostras foram centrifugadas a 12000 rpm durante 15 minutos a 4°C. Após a centrifugação, aproximadamente 500 µL do sobrenadante foi separado e transferido para outro microtubo de 1,5 mL livre de DNase e RNase. As amostras de RNA foram precipitadas em 500 µL de isopropanol, após incubação por quinze minutos, a -70°, e centrifugação 12000 rpm, por dez minutos a 4°C. O isopropanol suspenso foi descartado e as amostras foram lavadas em 1000 µL de etanol (75%) e secas à TA. Em seguida, os precipitados foram ressuspensos em 12µL de água tratada com dietil - pirocarbonate 0,1% (DEPC).

5.6.2. Transcrição reversa (RT)

A reação de transcrição reversa foi efetuada em um Termociclador PTC – 200 Peltier Thermal Cycler (MJ Research). O protocolo começou incubando-se a 65°C durante cinco minutos: 50 ng do RNA genômico extraído, dNTP 0,5 mM (Invitrogen, Life Technologies), 0,5 µg de Randon Primer (Invitrogen, Life Technologies) e 3 µL de água DEPC. Em seguida, acrescentou-se o tampão da RT 5 x (Invitrogen), 40U de inibidor de ribonucleases (Invitrogen, Life Technologies) e incubou-se a 42°C durante dois minutos. Por fim, 50 U da enzima SuperScript (Invitrogen) foi adicionada a mistura, incubando-se a 42°C durante 50 minutos, e a 70°C por 15 minutos. O volume final da reação foi de 20 µL. O DNA complementar (cDNA) obtido pela transcrição reversa foi armazenado a –20°C para uso posterior na técnica de PCR em tempo real.

5.6.3. PCR em tempo real

Após a extração do RNA total e a síntese do cDNA, foi realizado o método de PCR em tempo real utilizando-se o marcador SYBR Green I, sendo a reação conduzida em um aparelho termociclador Chromo 4 - PTC – 200 Peltier Thermal Cycler (MJ Research). Foi utilizado um volume de 2,0 µL de cDNA proveniente da RT, ao qual acrescentou-se 10,0 µL da mistura KAPA SYBR® FAST Universal 2X qPCR Master Mix (KAPABIOSYSTEMS), 10 pmol de cada “primer”, completando-se com água para um volume final de 20 µL. As reações foram realizadas em microtubos especiais de 0,2 mL com as tampas apropriadas para leitura óptica, o que é requerido pelo sistema de detecção e mensuração fotométrica desse equipamento de PCR em tempo real.

O par de “primers” utilizado, na técnica de PCR em tempo real para a amplificação do fragmento S1 do gene S do VBI foi obtido da literatura (Tabela 1), e descrito por Wang e Tsai (1996).

O perfil térmico da PCR foi constituído por um primeiro ciclo de 95°C por três minutos, seguindo-se de mais 45 ciclos, compostos por desnaturação a 95°C por 3 segundos, anelamento por 30 segundos a 54,5°C, e extensão a 72°C por 3

segundos. Ao final dessa etapa, foi realizada a dissociação dos produtos amplificados de DNA, entre a temperatura de 65°C e 95°C para a avaliação da T_m , e as leituras efetuadas a cada 0,2°C. Todas as amostras foram testadas, no mínimo, em duplicata.

Tabela 1. Nomenclatura, número de acesso e procedência do par de “primer” utilizado para amplificar o fragmento S1 do gene S do VBI.

Nome	Número de Acesso	Referência	Fragmento amplificado
HVR1+ HVR1-	AY851295	Wang e Tsai (1996)	216 - 228 pb

+ = “Forward”/ - = “Reverse”

5.6.4 Construção da curva padrão para quantificação da carga viral pela técnica de PCR em tempo real

A curva padrão foi construída para quantificação absoluta do cDNA do gene S1 do VBI para se determinar a carga viral presente em amostras de tecidos e/ou órgãos colhidos das aves submetidas ao desafio, seguindo-se as recomendações de Okino (2010). Toda a *open reading frame* do gene S1 da estirpe M41 do VBI, com cerca de 1,6 Kb foi previamente clonada no vetor pGEM T Easy (Promega) (Figura 1) (Gonçalves et al.,2010). O DNA plasmidial foi então extraído, quantificado através da leitura em biofotômetro (Eppendorf) e submetido a diluições seriadas de razão constante igual a 10 (de 10^{-1} a 10^{-10}) em água ultra-pura, e em seguida essas diluições foram ensaiadas na técnica de PCR em tempo-real com a utilização de “primers” para amplificação de sequência parcial do gene S1 do VBI (Tabela 1).

O valor obtido da quantificação do DNA plasmidial extraído foi convertido em número de moles utilizando-se o programa computacional Molbio.ru (www.molgen.mpg.de/~soldatov/protocols/scripts/01_07.html). Os valores de CT obtidos a partir da PCR em tempo real foram subsequentemente usados para calcular e traçar uma linha de regressão linear relacionando os logaritmos de base10 do número de moles do “template” (DNA plasmidial contendo o gene S1) (eixo Y) com os valores correspondentes de CT obtidos (eixo X).

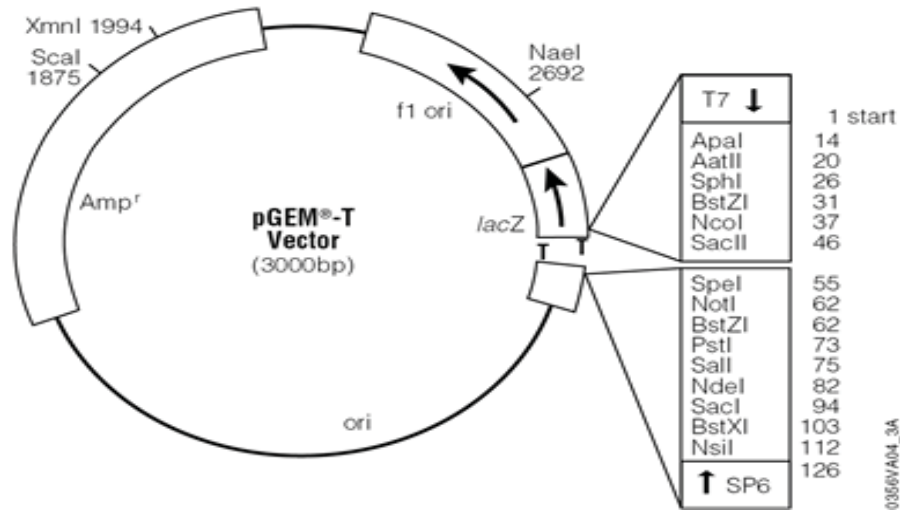


Figura 1. Representação esquemática do vetor pGEM T Easy (Promega), no qual foi clonado um fragmento do gene S1 da estirpe M41 do VBI .

5.7. Imuno-histoquímica

5.7.1. Preparo do anticorpo detector primário anti-VBI

A proteína N recombinante da estirpe M41 do VBI, previamente expressa em *E. coli* (Gibertoni et al., 2010) foi purificada em resina de níquel agarose e usada para a obtenção do antissoro em cabra, o qual foi empregado como anticorpo primário na técnica de imuno-histoquímica para detecção do VBI em cortes de tecidos de aves experimentalmente infectadas. Para a produção desse antissoro anti-proteína N recombinante do VBI, foi imunizada uma cabra com 7 inoculações de 50µg da proteína recombinante N do VBI / dose, emulsionadas em adjuvante completo de Freund (1ª imunização) ou adjuvante incompleto de Freund (a partir da 2ª imunização em diante), sendo as doses administradas em intervalos de 14 dias. A cada intervalo entre as inoculações, foi colhido o sangue da cabra para separação do soro e análise dos títulos de anticorpos anti proteína N pelo método indireto de ELISA, segundo as recomendações de Gibertoni et al. (2005), exceto que foi usado o conjugado imunoenzimático anti-IgG de cabra com a peroxidase (SIGMA). Após um intervalo de dez dias sucedidos da 7ª inoculação, o soro apresentou altos títulos

de anticorpos específicos, e este, foi então utilizado na montagem e padronização da técnica de imuno-histoquímica.

5.7.2. Análise imunoquímica pela técnica de “Western blotting” do antissoro de cabra anti-proteína N recombinante do VBI

O antissoro produzido pela inoculação da proteína recombinante N do VBI em cabra foi avaliado em ensaio de Western blotting para a determinação da especificidade do mesmo. Para isso, 30 µg das proteínas virais da mistura concentrada das estirpes IBVPR-05, IBVPR-12 e M41 foi adicionada a um tampão contendo 62,5 mM Tris-HCl, pH 6,8; 1 % SDS; 10 % de glicerol; 0,001 % de azul de bromofenol e 1 % de 2-mercaptoetanol. A amostra assim preparada foi fervida por 2 minutos e aplicada em gel de poliacrilamida, sendo usado o gel de empilhamento na concentração de 3 % e o gel de separação na concentração de 12 %. A separação eletroforética pela técnica de SDS-PAGE foi então realizada, utilizando-se um sistema de tampão descontínuo segundo LAEMMLI (1970). As bandas polipeptídicas foram, ao final, detectadas em um dos géis, através da coloração com “Coomassie Brilliant blue R-250”. O outro gel foi usado para a eletrotransferência para a membrana de nitrocelulose, seguindo-se a realização da técnica de Western blotting.

Na técnica de “Western blot”, adotou-se o protocolo de Towbin et al. (1979), buscando-se fazer a detecção tanto da proteína N recombinante, quanto da proteína do vírus nativo, com anticorpo policlonal de cabra contra a proteína N recombinante do VBI. Depois de realizada a separação eletroforética das proteínas do VBI, os polipeptídeos foram transferidos para uma membrana de HPVDF (GE Healthcare, USA), a qual foi em seguida bloqueada com leite em pó desnatado a 5% em tampão PBS por 1h. Em seguida foi acrescentado sobre essa membrana a preparação do anticorpo policlonal de cabra, na diluição de 1:2000, preparada em PBS acrescido de 5% de LPD e 10% de extrato de lisado de *E. coli* (Tampão Diluente), com incubação sob agitação por 1 h à temperatura ambiente. O conjugado de coelho anti-IgG de cabra com a peroxidase (ZIMAX, San Francisco, California, USA) foi utilizado na diluição de 1:1000 em tampão diluente, com

incubação por 1h, para revelar a ligação antígeno-anticorpo primário. Em seguida, a membrana foi lavada com PBS Tween por 3 vezes e 1 vez com PBS, sendo revelada a reação após a adição do substrato cromógeno (3,3-diaminobenzidina - DAB) mais uréia (Sigma). Para referência de peso molecular foi utilizado o padrão “kaleidoscope prestained standards” (Bio-Rad) e como controle negativo de antígenos virais, foi usado a suspensão de líquido alantóide de ovos embrionados SPF.

5.7.3. Padronização da Técnica de Imuno-histoquímica

O procedimento geral da técnica de imuno-histoquímica iniciou-se pela desparafinização dos cortes de tecidos em estufa a 60°C por 1 hora, seguido de dois banhos em xilol (10 minutos cada banho). Em seguida, as amostras foram hidratadas em soluções de concentrações decrescentes de álcool etílico. A recuperação antigênica foi realizada pelo calor, utilizando-se câmara de pressão (Pascal, Dako), recomendado por Pileri et al. (1997) e Bankfalvi et al., (1994). Na sequência, fez-se o bloqueio da peroxidase endógena, por meio da imersão das lâminas em solução de peróxido de hidrogênio volume 30 (Dinâmica) e metanol (Sinth) em uma concentração final de 10% por 20 minutos. O bloqueio das reações com antígenos proteicos não específicos foi feito com produto comercial (Protein Block, DAKO, USA) a TA por 20 minutos. Na fase seguinte, realizou-se a incubação com anticorpo primário anti-VBI (soro de cabra hiperimunizada com a nucleoproteína recombinante), na diluição de 1:700 por 2 horas em TA, em câmara úmida. O complexo secundário utilizado foi um polímero ligado a peroxidase (Kit Advance HRP, Dako, USA) e para a visualização da reação utilizou-se o cromógeno DAB (Dako, USA). A contra-coloração foi feita com Hematoxilina de Harris e a montagem das lâminas com Entellan (Merck). Entre cada um dos passos descritos fizeram-se banhos em água destilada e solução de tampão Tris HCL, pH 7,4. O controle negativo da técnica foi realizado com solução tampão Tris HCL, em substituição ao anticorpo primário, e outro modelo com os tecidos das aves pertencentes ao controle negativo da infecção com o VBI.

Foi utilizado microscópio Nikon Eclipse E200, com câmera Moticam 2300 3.0 M Pixel USB 2.0, e auxílio do programa Motic Images Plus 2.0 ML para leitura dos

cortes histológicos submetidos à técnica de imuno-histoquímica e da fotodocumentação.

5.8. Avaliação do movimento ciliar dos anéis traqueais obtidos de aves desafiadas com as estirpes do VBI

Depois da eutanásia das aves, foram colhidas amostras de traqueia para a avaliação da estase ciliar. Para tanto, foram analisados três fragmentos de aproximadamente 1,5 mm de cada porção da traqueia (cranial, medial e distal), totalizando nove anéis traqueais de cada ave. Os anéis traqueais foram dispostos sobre lâminas e imersos em Meio Eagle (Gibco) acrescido de 10% de soro fetal bovino; o movimento ciliar foi observado com auxílio de um microscópio invertido (Olympus, CK2) com obj. 40 x, avaliando-se a integridade e o grau de conservação do movimento ciliar das células epiteliais, de acordo como descrito por DARBYSHIRE e PETERS (1985).

Para classificação dos escores, foi adotado a escala de zero a quatro, de acordo com a intensidade da perda de movimento ciliar e o dano no epitélio traqueal em cada um dos quatro quadrantes analisados por anel traqueal (ANDRADE et al., 1982; DI FABIO et al., 2000). Considerando-se a análise de nove anéis traqueais por ave, foi obtida a média de escore (Tabela 2).

Tabela 2. Parâmetros de avaliação da ciliostase de anéis traqueais para a avaliação do estado de proteção frente ao desafio com o VBI.

Escore	Integridade do epitélio traqueal
0	100%
1	75 a <100%
2	50 a <75%
3	25 a <50%
4	0 a <25%

5.9. Exames Histopatológicos dos órgãos obtidos de aves desafiadas com as estirpes do VBI

5.9.1. Histopatologia da Traqueia e Pulmão

Fragmentos cilíndricos de aproximadamente 0,5 cm de comprimento das porções cranial, medial e caudal da traqueia foram colhidos, logo após a eutanásia das aves nos intervalos pós-desafio estabelecidos nos delineamentos experimentais de infecção experimental I e II. Esses fragmentos de traqueia foram fixados em formol tamponado a 10%, pH 7,2. Após a fixação, os fragmentos foram desidratados, diafanizados e incluídos em parafina. Após foram obtidas secções transversais de 5µm de espessura e corados com Hematoxilina e Eosina (HE). Estas etapas foram conduzidas no laboratório histotecnologia do Departamento de Patologia Veterinária da FCAV - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.

Foram atribuídos escores variando de zero a três, conforme a gravidade das lesões para cada uma das características das porções traqueais de acordo com a avaliação estabelecida por Andrade et al. (1982) e Yashida et al. (1985), com algumas modificações. Em suma, a ausência de lesões foi classificada com escore zero, enquanto processos leves, moderados e intensos foram classificados com escores um, dois e três, respectivamente. As características morfológicas foram avaliadas quanto a perda de cílios e de células epiteliais, degeneração de glândulas do epitélio, presença de infiltrado inflamatório, hiperplasia epitelial e infiltrado inflamatório na camada adventícia. Para avaliação histopatológica de cada ave, considerou-se a soma dos três anéis traqueais por ave, com o escore máximo de 54, considerando-se o grupo experimental.

Com relação aos pulmões, foi adotado o critério de intensidade de infiltrado inflamatório, congestão e dilatação dos para-brônquios, sendo considerado leve, moderado e/ou acentuado.

5.9.2. Histopatologia dos Rins e das Gônadas

Os fragmentos de rins e de gônadas (testículos e ovários) foram fixados, processados e corados com H.E. da mesma forma que os fragmentos de traqueia. A análise histopatológica dos rins foi realizada de acordo com os parâmetros descritos por Chen et al. (1996). Em suma, foram observadas alterações como: degeneração epitelial, dilatação do ducto-tubular, infiltração de heterófilos, infiltração linfóide e hiperplasia. Os escores foram atribuídos de acordo com a intensidade das lesões observadas, variando de sem alteração patológica (-), alteração leve (+), moderada (++) e severa (+++).

Para os órgãos reprodutores foram adotados critérios de intensidade semelhante aos rins, sendo avaliada a presença de depósitos de cálcio nos ovários, descamação das células epiteliais de mucosa e infiltração de células inflamatórias. Os testículos foram analisados quanto à intensidade de infiltrado de células inflamatórias e a presença ou não de degeneração e necrose das células epiteliais cúbicas dos túbulos seminíferos e células de Sertoli.

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1. Determinação da infectividade viral

A titulação dessa estirpe foi realizada a partir da inoculação do antígeno, no volume de 200µL/ovo embrionado SPF com 9 dias de incubação, em diluições na base 10 entre 10^{-3} a 10^{-8} (Tabela 3). Foram considerados no cálculo de Reed e Muench (1936) os embriões mortos até sete dias pós-inoculação ou que apresentaram lesões características do VBI como enrolamento ou nanismo. O título obtido foi igual a $10^{8,49954}$ DIE_{50%} / ml.

Tabela 3. Resultados da inoculação da estirpe IBVPR-12 em ovos embrionados, utilizados para calculo de Reed & Muench.

Diluições	Mortos	Sobreviventes	Resultados Acumulados			
			Mortos	Vivos	Totais	% Mortos
10^{-9}	1	4	1	5	6	16,66
10^{-8}	4	1	5	1	6	83,33
10^{-7}	5	0	10	0	10	100
10^{-6}	5	0	15	0	15	100
10^{-5}	5	0	20	0	20	100
10^{-4}	5	0	25	0	25	100
10^{-3}	5	0	30	0	30	100

6.2. Sinais clínicos nas aves experimentalmente infectadas com as estirpes variante ou M41 do VBI

Durante todo o delineamento experimental as aves foram acompanhadas em intervalos aleatórios em todo período, 42 dias, para observação da sintomatologia clínica após os tratamentos.

As aves do grupo desafiado com a estirpe variante IBVPR-12, apresentaram sintomatologia respiratória leve, caracterizada principalmente por estertores traqueo-bronquiolares e descarga nasal entre o quarto e sétimo dia pós-desafio, o que corrobora com o fato que neste período a replicação viral desta estirpe havia atingido seu máximo, o bastante para causar sintomatologia clinica da bronquite infecciosa. O grupo vacinado (AV) não apresentou sintomas significativos para a doença da bronquite infecciosa, demonstrando apenas espirros e descarga nasal leves. As aves do grupo AV e ANV, aumentaram consideravelmente o consumo de

água no terceiro dpi, mantendo este consumo até o décimo quarto dia. Esta característica está relacionada ao fato do tropismo renal desta estirpe e seu caráter patogênico ao tecido renal como demonstrado no exame histopatológico, mesmo que moderado. O intenso consumo de água também pode ter refletido na diarreia aquosa destas aves durante todo período pós-infecção em conjunto com a presença viral nas tonsilas cecais e a possível presença deste vírus em algumas camadas intestinais (BENYEDA et al., 2009).

Com relação às aves do grupo desafiado com a estirpe M41 (BNV), estas apresentaram sintomatologia clínica evidente, caracterizada por estertores traqueo-bronquiolares, descarga nasal, espirros e ronqueira entre o quarto e sétimo dia pós-desafio, o que também corrobora com o fato que neste período este vírus atingiu a maior replicação viral traqueal, o bastante para causar sintomatologia clínica da bronquite infecciosa. As aves do grupo vacinado e desafiado com a estirpe M41 (BV) não apresentaram sintomas significativos para a doença da bronquite infecciosa.

No que diz respeito a avaliação da sintomatologia clínica encontrada em nosso estudo, podemos concluir que o estado de proteção desenvolvido pelo protocolo vacinal adotado, foi capaz de proteger totalmente as aves desafiadas com a estirpe homóloga M41. Porém, as aves que foram desafiadas com a estirpe variante IBVPR-12 ainda apresentaram alguma sintomatologia como citado acima. No entanto, devemos dar mais atenção às análises mais objetivas como a histopatologia e ciliostase.

6.3. Alterações macroscópicas na necropsia das aves experimentalmente infectadas com as estirpes variante ou a M41 do VBI

Durante a coleta das amostras e de órgãos foi realizada minuciosa necropsia das aves, em todos os intervalos pós-infecção. Referente ao grupo desafiado com a estirpe M41, apenas o grupo não vacinado apresentou traqueia congesta e com alguns pontos de petéquias. Não foi observada mais nenhuma alteração em outros órgãos deste grupo.

O grupo ANV e AV, não apresentaram alterações macroscopicamente significantes na traqueia. No entanto, os rins estavam aumentados de tamanho, e alguns com discreta palidez nas aves com 7 dpi.

6.4. Análise da estase ciliar traqueal das aves experimentalmente infectadas com as estirpes variante ou a M41 do VBI

A Tabela 4 mostra que a avaliação do movimento ciliar conforme as diferentes porções cranial, medial e caudal da traqueia das aves vacinadas e não vacinadas indicou que não há diferença de sensibilidade para os efeitos danosos da infecção pelo VBI nas diferentes porções da traqueia.

A análise da estase dos cílios traqueais nos possibilitou a avaliar o efeito da variante IBVPR-12 e da estirpe de referência M41 sobre o movimento ciliar do epitélio traqueal e na origem das lesões traqueais observadas imediatamente após a coleta dos segmentos de traqueia. Também auxiliou na avaliação da proteção traqueal das aves vacinadas e não vacinadas frente ao desafio com a estirpe variante e M41 do VBI.

De início, foi possível detectar moderada paralisia dos cílios traqueais no quarto dia pós-desafio de todos os grupos, com exceção do grupo controle negativo (Figura 2). No entanto, ficou mais evidente a diferença entre os grupos vacinados e não vacinados. O grupo desafiado com a variante IBVPR-12, apresentou menor intensidade de lesões ao epitélio traqueal quando comparado ao grupo desafiado com a estirpe M41.

Os resultados da ciliostase traqueal revelaram que o maior dano foi causado pela estirpe M41 do VBI, que acometeu principalmente as aves do grupo BNV no sétimo dia pós-desafio, ocasião em que foram observados os maiores escores de ciliostase (3,36), período no qual as aves se encontravam em fase aguda da doença, e que as lesões puderam ser mais bem evidenciadas. Da mesma forma, os grupos desafiados com a estirpe IBVPR-12 e não vacinados, demonstraram em suma, uma estase ciliar mais proeminente no sétimo dia pós-desafio. Porém, vale salientar, que a estirpe M41 desenvolveu um escore maior de estase ciliar e lesões ao epitélio ciliado traqueal quando comparada a estirpe variante, de forma semelhante ao quarto dia pós-desafio.

Com relação ao décimo primeiro dpi, a atividade ciliostática foi inferior quando comparada ao sétimo dpi, em razão das aves já terem desenvolvido respostas imunes humorais, como demonstrado na avaliação do perfil sorológico, com elevada produção de IgA, IgG e IgM, sendo primariamente o aumento do título de IgM sérica

e lacrimal. Além da resposta imune humoral, sabe-se que aves desafiadas com a estirpe M41, com modelo experimental semelhante ao utilizado neste estudo, também desenvolvem uma resposta imune celular, apresentando altas concentrações de marcadores de linfócitos T CD8+ e Granzima A, que podem evitar danos posteriores maiores na traqueia das aves vacinadas e posteriormente desafiadas (SANTOS et al., 2012).

Tabela 4. Avaliação do escore de inibição do movimento ciliar da traqueia (de 0 a 4) de aves do delineamento experimental I e II, nos diferentes intervalos pós-infecção.

PI	Grupo	Escore P	Escore M	Escore D	Escore Total
4dpi	ANV	1,37	1,22	1,19	1,26
	ANVJ	1,55	1,52	1,3	1,45
	AV	0,89	0,81	0,63	0,78
	BNV	2	1,85	1,7	1,85
	BV	1,55	1,26	1,26	1,36
	C	0	0	0	0
7dpi	ANV	2,88	2,55	2,44	2,62
	ANVJ	2,33	2,55	1,67	2,18
	AV	2,07	1,96	1,66	1,9
	BNV	3,37	3,48	3,22	3,36
	BV	2,66	2,44	2,33	2,48
	C	0	0	0	0
11dpi	ANV	1,77	2	1,67	1,81
	ANVJ	1,7	1,37	1,33	1,46
	AV	1,66	1,44	1,33	1,48
	BNV	2	2	1,66	1,88
	BV	1,63	1,6	1,55	1,59
	C	0	0	0	0
14dpi	ANV	1,44	1	1	1,15
	ANVJ	1,11	1	1	1,03
	AV	0,81	0,89	0,66	0,78
	BNV	1,55	1,11	1	1,22
	BV	0,71	0,69	0,71	0,7
	C	0	0	0	0
21dpi	ANV	0,44	0,44	0,11	0,33
	ANVJ	0	0	0	0
	AV	0,11	0	0,25	0,12
	BNV	0,44	0,22	0	0,22
	BV	0,22	0	0	0,07
	C	0	0	0	0

pi = intervalo pós-infecção; d= dia; P= porção proximal; M= porção média; D= porção distal; ANV= grupo não vacinado e desafiado com a estirpe IBVPR-12; ANVJ = grupo de aves jovens não vacinado e desafiado com a estirpe IBVPR-12; AV= grupo vacinado e desafiado com a estirpe IBVPR-12; BNV= grupo não vacinado e desafiado com a estirpe M41; BV= grupo vacinado e desafiado com a estirpe M41; C= grupo submetido aos tratamentos com PBS (controle negativo).

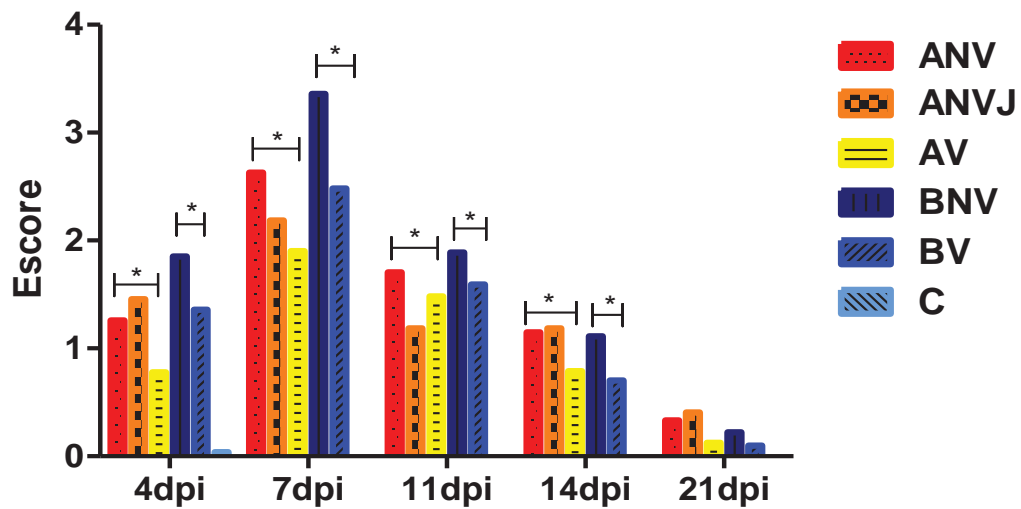


Figura 2. Comparação de escores totais de ciliostase na traqueia das aves dos grupos vacinados e desafiados e apenas desafiados nos diferentes intervalos pós-desafio. Estão indicadas na figura as diferenças significativas pelo teste de Mann-Whitney entre os grupos vacinados e não vacinados para cada intervalo avaliado; $p < 0.05^*$.

No quarto, sétimo e décimo primeiro dia pós-infecção, os resultados indicaram que as aves vacinadas, tanto do grupo desafiado com a variante quanto com a estirpe de referência, apresentaram um significativo grau de proteção, com escores menores e diferentes no quarto dpi, sétimo dpi e décimo primeiro ($p < 0.05$) dos grupos não vacinados, uma vez que a menor media de escores obtidos na ciliostase foram destes grupos (Figura 2). Estas manifestações estão de acordo com os resultados encontrados na histopatologia e na detecção do VBI na traqueia destas aves, sugerindo que, em conjunto com os dados obtidos das respostas imunes humorais, as aves mesmo do grupo não vacinado, possuem neste período pós-infecção, uma resposta imunológica atuante e que parece ser capaz de conferir proteção mais tardia nas aves não vacinadas contra o VBI. A partir do décimo quarto dpi, podemos notar uma queda drástica nos escores de ciliostase, principalmente tratando-se dos grupos vacinados. Assim como demonstrado na análise histopatológica, as traqueias das aves dos grupos AV e BV foram eficientes para que houvesse alguma regeneração tecidual nestas aves, uma vez que escores de ciliostase foram inferiores quando comparados com os escores dos grupos não vacinados. Por fim, aos vinte e um dpi, todos os grupos caminharam para escores

próximos a zero, uma vez que estas aves estavam em fase convalescência da infecção.

Apesar de a vacinação com a estirpe H120 não ter induzido uma proteção integral da estase ciliar, houve proteção, tanto nas aves desafiadas com a estirpe M41 quanto desafiadas com a variante IBVPR-12. Estes resultados estão em concordância com os achados de Darbyshire (1980), que aferiu que a proteção ao desafio estava associada à habilidade de uma estirpe vacinal de VBI em conferir resistência na traqueia frente ao desafio com outra estirpe, observada pela incapacidade de induzir uma completa ciliostase no epitélio traqueal. Ainda neste contexto, pode-se dizer que a vacina Mass foi parcialmente efetiva na proteção do trato respiratório das aves desafiadas com esta estirpe variante e heteróloga. Porém, apenas a proteção traqueal não pode definir uma vacina como hábil e eficaz frente a outras estirpes. Lembrando que como foi demonstrado na análise histopatológica e da carga viral nos diferentes tecidos, esta vacina não conferiu total proteção aos rins, pulmões e intestinos das aves vacinadas com a estirpe H120 e desafiadas com a estirpe variante do VBI.

6.5. Histopatologia

6.5.1. Traqueia

Os resultados da histopatologia de traqueia corroboraram quase que totalmente com aqueles obtidos na avaliação da ciliostase. A Figura 3 mostra que os maiores escores de lesões histopatológicas na traqueia foram alcançados no sétimo dia pós-desafio, tanto para o grupo desafiado pela estirpe M41 quanto pela variante IBVPR-12. Os escores foram praticamente iguais em relação aos grupos que foram vacinados previamente ao desafio. As lesões traqueais se manifestaram de forma crescente com o decorrer dos dias após o desafio até o décimo primeiro dpi. A partir do décimo primeiro dpi as lesões regrediram, chegando a um escore próximo à zero no vigésimo primeiro dpi (dado não mostrado).

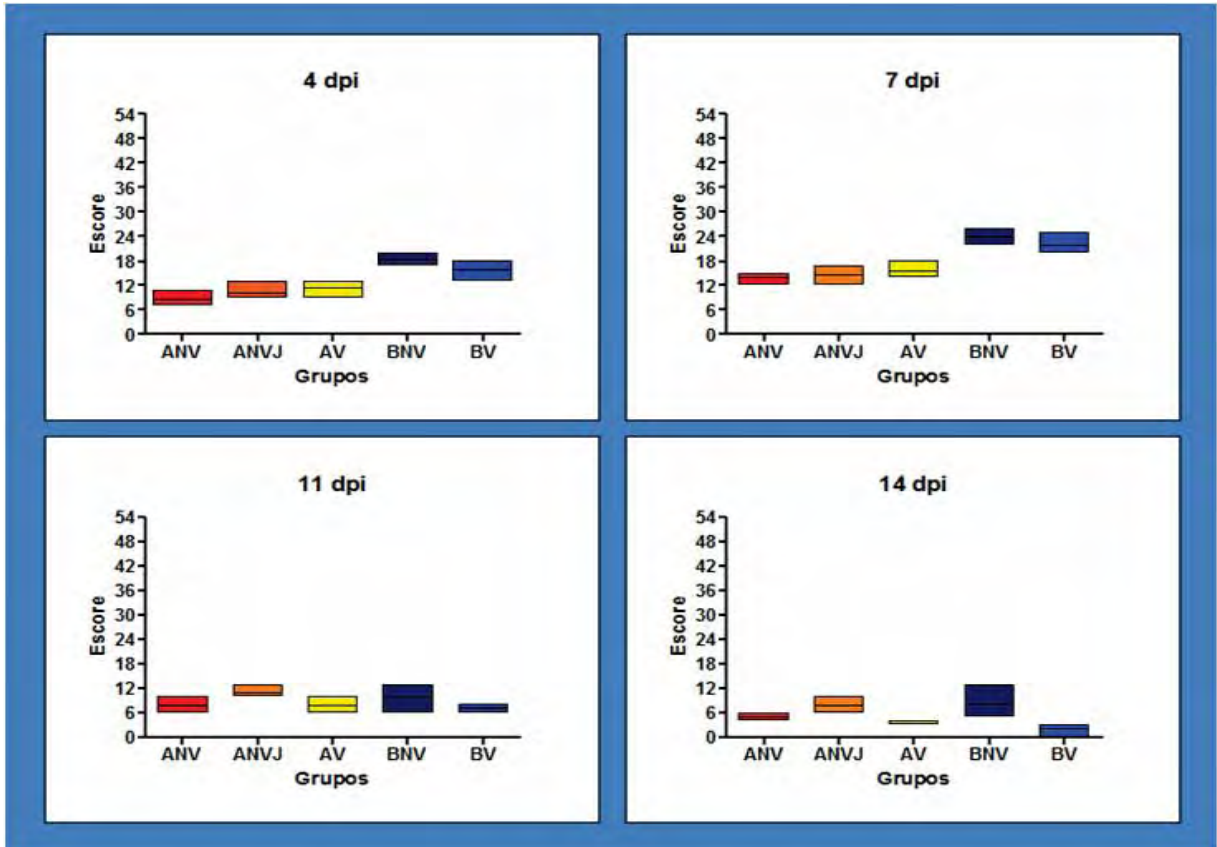


Figura 3. Comparação entre os resultados de escores da histopatologia entre quarto dia e décimo quarto dia pós-desafio. Legenda: BV – aves SPF vacinadas com estirpe H120 no vigésimo primeiro dia de idade e desafiadas com estirpe M41 do VBI aos 42 dias de idade; AV– aves SPF vacinadas no vigésimo primeiro dia de idade com a estirpe H120 e desafiadas aos 42 dias de idade com estirpe variante IBVPR-12 do VBI ANV – aves SPF não imunizadas e desafiadas com a estirpe variante IBVPR-12 aos 21 dias de idade; BNV -- aves SPF não imunizadas e desafiadas com a estirpe M41 aos 21 dias de idade; ANVJ - aves SPF não imunizadas e desafiadas com a estirpe variante IBVPR-12 aos 2 dias de idade.

As alterações mais marcantes, em todos os grupos, foram a descamação ciliar e degeneração das células epiteliais da mucosa, infiltrado de heterófilos na lâmina própria caracterizada como traqueíte, congestão, edema da submucosa e degeneração parcial das glândulas secretoras de muco. Houve leve infiltrado inflamatório na camada adventícia apenas no grupo BNV e BV no quarto dpi. Ainda que os escores das lesões traqueais das aves vacinadas mostraram-se menores em relação aos grupos não vacinados, não foi observada diferença significativa entre estes grupos. Assim como esperado, as aves pertencentes ao grupo controle não

apresentaram alterações histológicas. Os parâmetros avaliados e mais manifestos estão demonstrados na Figura 4, bem como os respectivos escores.

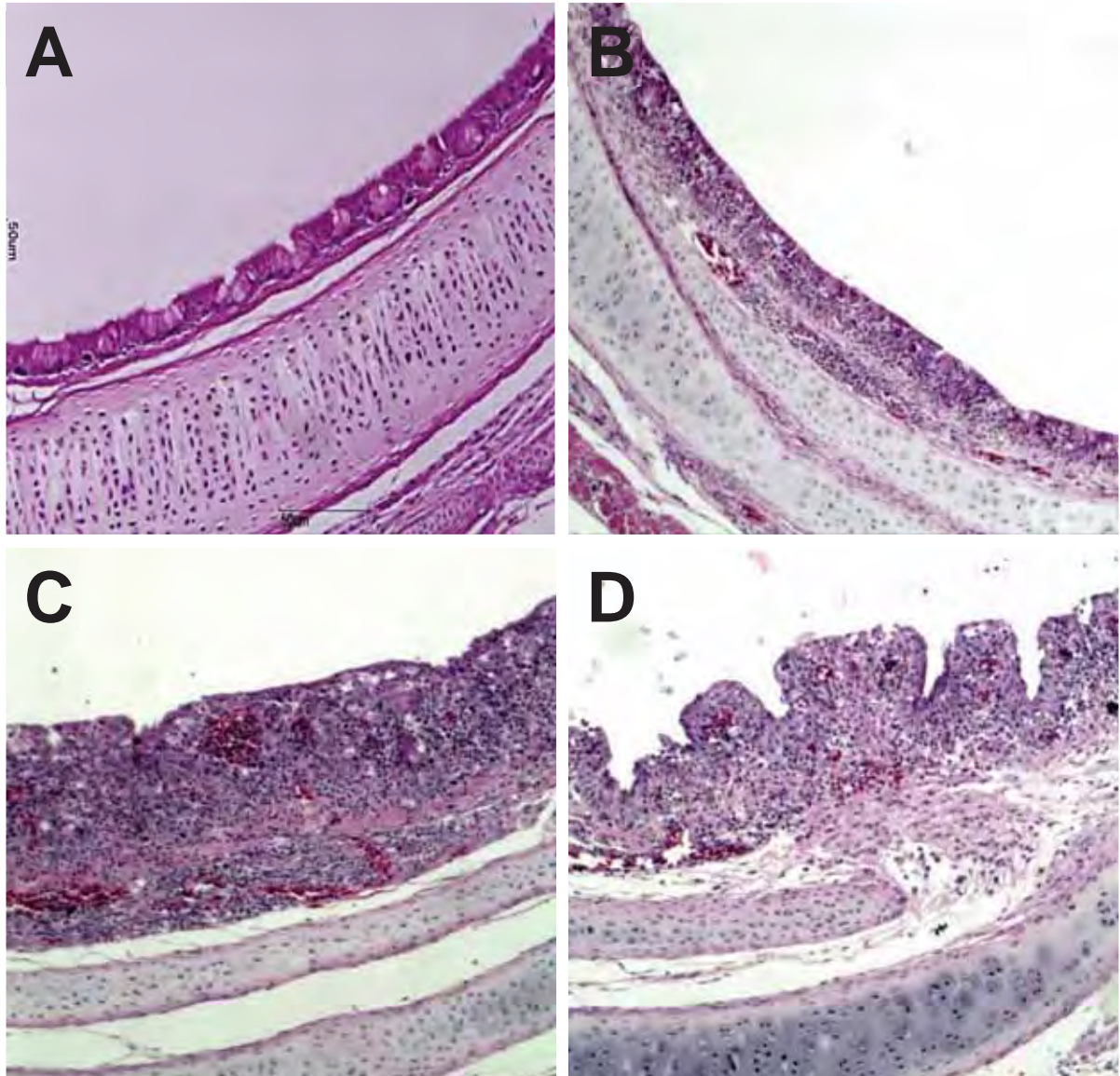


Figura 4. A. Fomicrografia de traqueia de ave do grupo controle negativo (não vacinado e não desafiado) no 14^o dpi, demonstrando preservação dos cílios e células epiteliais, isenta de células inflamatórias. B. Traqueia de ave do grupo ANV no 4^o dpi, nota-se leve infiltrado inflamatório (escore 1), perda integral de cílios e leve congestão. C. Traqueia de ave do grupo ANV no 7^o dpi; infiltração de heterofilos na lâmina própria de escore 3, moderada congestão, perda de cílios, leve descamação de células epiteliais e moderada degeneração de glândulas mucóides. D. Traqueia de ave do grupo BNV com 7 dpi; presença moderada de heterofilos (escore 2), congestão, degeneração de glândulas mucóides de escore 2, descamação de células epiteliais (escore 2), perda total de cílios e moderada hiperplasia epitelial de escore 2. HE, obj. 20x.

Foi também possível observar que a estirpe M41 apresentou maior potencial patogênico para a traqueia do que a estirpe variante IBVPR-12. Estes resultados também estão relacionados à análise quantitativa da carga viral neste tecido, já que o maior número de cópias do VBI foi observada entre o quarto e sétimo dpi das aves correspondentes ao grupo BNV. Ainda neste contexto, podemos correlacionar que o aspecto decrescente do estado deletério no tecido traqueal em relação ao período pós-infecção, está intimamente ligado à carga viral neste tecido, assim como, houve menor presença viral com o decorrer do tempo. Outro fator plausível que pode ser aplicado aqui é a maior concentração de anticorpos locais e sistêmicos apresentados após o sétimo dia pós-infecção, fato este, que pode estar associado à neutralização do agente patogênico e sua consequente eliminação pelo hospedeiro. Seguindo este mesmo raciocínio, nota-se que com o decorrer do período pós-infecção, as lesões observadas microscopicamente na traqueia voltaram ao seu estado normal, ao mesmo tempo em que o número de cópias virais diminuía, sugerindo assim que as alterações patológicas traqueais estão relacionadas com a quantidade do vírus presente neste órgão.

6.5.2. Pulmão

Os grupos vacinados e desafiados tanto com M41 quanto IBVPR-12, apresentaram apenas leve infiltrado inflamatório ao redor dos parabronquios pulmonares (Figura 5, A) no quarto e sétimo dpi (Figura 5, B).

As alterações pulmonares foram muito semelhantes entre os grupos não vacinados, porém mais acentuadas nos grupos não vacinados. Em geral, as maiores alterações avaliadas corresponderam a leve broncopneumonia e leve infiltração de heterófilos na periferia dos parabronquios das aves com 4 dpi, evoluindo para moderada broncopneumonia e moderada infiltração de heterófilos adjacente ao lúmen parabronquial no sétimo dpi (Figura 5, C). Outra alteração evidente nas aves não vacinadas e desafiadas com a estirpe variante no sétimo dpi foi uma acentuada congestão pulmonar com dilatação dos vasos em várias regiões, caracterizando uma broncopneumonia multifocal (Figura 5, D).

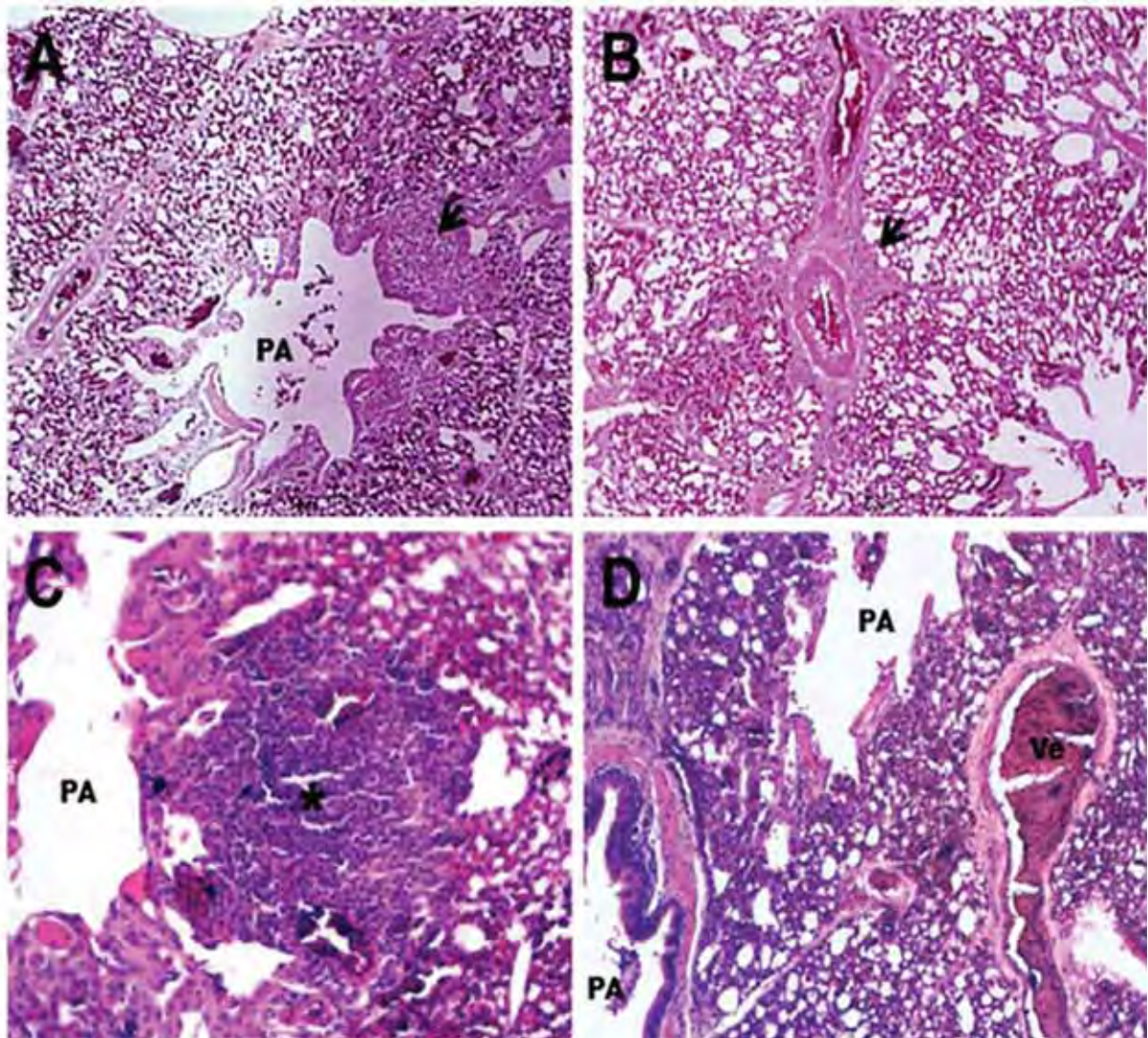


Figura 5. Foto micrografias das alterações pulmonares das aves pertencentes aos grupos desafiados com a variante IBVPR-12 e M41. A. Pulmão de ave pertencente ao grupo vacinado e desafiado com a estirpe M41 no quarto dpi, apresentando leve infiltrado de heterofilos (seta) ao redor dos parabronquios (PA). B. Pulmão de ave correspondente ao grupo vacinado e desafiado com a estirpe IBVPR-12 no sétimo dpi, demonstrando leve infiltrado inflamatório (seta). C. Moderado infiltrado inflamatório adjacente ao lúmen parabronquial no sétimo dpi de ave do grupo não vacinado e desafiado com a estirpe M41. D. Congestão multifocal em ave não vacinada e desafiada com estirpe IBVPR-12 sete dpi; Ve, veia de grande calibre. HE, obj. 20x.

6.5.3. Rim

Tem sido relatado que existem estirpes nefropatogênicas do vírus da bronquite infecciosa que, além de se replicarem e causarem lesões de maior ou menor intensidade, no trato respiratório, provocam lesões renais mais evidentes em galinhas (PURCELL et al., 1976; ALBASSAM et al., 1986, BUTCHER et al., 1989; KINDE et al., 1991). Estas estirpes nefropatogênicas se replicam nas células do epitélio renal, produzindo graves lesões nos túbulos contorcidos distais e proximais e inflamação intersticial, caracterizada como nefrite, o que resulta em insuficiência renal (KING; CAVANAGH, 1991). Deve-se salientar que a distribuição de antígenos do VBI, detectada pela IHQ, em diferentes segmentos dos túbulos renais e ductos estão intimamente relacionados com a patogênese renal causada pela infecção.

Um outro aspecto marcante é que as aves desafiadas com a estirpe M41 não apresentaram lesões renais, bem como nenhuma outra alteração significativa neste órgão. Por outro lado, no grupo ANV (desafiado com a estirpe IBVPR-12 e não vacinado), lesões que variaram de leve a moderada foram encontradas nos rins (Tabela 5).

Tabela 5. Média do índice de gravidade da lesão renal de três aves de cada grupo desafiado com a estirpe variante IBVPR-12; ANV= não vacinado; AV= vacinado. -, sem lesão; +, leve; ++, moderada.

Grupos	ANV		AV							
	Dias pós-infecção									
Lesão renal	4	7	11	14	21	4	7	11	14	21
Degeneração epitelial	+	++	++	-	-	-	+	+	-	-
Dilatação ducto-tubular	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-
Infiltração de heterofilo	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-
Infiltração linfoide	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-
Hiperplasia	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Ademais, as aves do grupo ANV desenvolveram lesões renais entre o quarto e décimo primeiro dpi. As lesões mais características foram relacionadas à degeneração das células epiteliais tubulares. Estas células apresentavam-se no exame histopatológico em diferentes fases de necrose, caracterizadas por picnose,

cariorrexe e cariólise, com as maiores intensidades no sétimo e décimo primeiro dpi com notável degeneração tubular difusa, apresentando-se com citoplasma das células epiteliais cúbicas tumefeitas e outras porções em fase necrótica, denominado nefrose (Figura 6, C). As aves também demonstraram moderado infiltrado inflamatório focal e difuso linfoplasmocitário de heterófilos, caracterizado como quadro de nefrite, entre o sétimo (Figura 6, D) e décimo primeiro dpi, além de leve dilatação tubular. A partir do décimo quarto dpi o tecido renal apresentava-se isento de infiltrado inflamatório e com pontos de regeneração epitelial. Estas características demonstram que a fase aguda de caráter nefropatogênico desencadeado pela estirpe variante IBVPR-12 ocorre entre o quarto e décimo primeiro dpi, regredindo após isso para um estado de convalescença e recuperação do tecido renal. Foi encontrada também uma lesão severa em uma das aves pertencente ao grupo ANV no sétimo dpi, caracterizada por intensa nefrite e hemorragia intersticial (Figura 6, B).

Bem como demonstrado na análise histopatológica da traqueia, o maior índice de lesão renal acompanhou a cinética de replicação do VBI neste órgão, que foi alcançado entre o quarto e décimo primeiro dpi. No entanto, as lesões regrediram e a carga viral permaneceu constante até o vigésimo primeiro dpi. Este fato pode ser explicado pela resposta do hospedeiro mais tardia para esta estirpe, que, no caso do grupo vacinado, desenvolveu uma resposta imune primária contra uma estirpe heteróloga, que no entanto não foi efetiva contra esta variante, o que impossibilitou a vírus-neutralização deste patógeno.

No entanto, o grupo vacinado AV, apresentou leve degeneração epitelial tubular entre o quarto e sétimo dpi, com recuperação mais precoce em relação ao grupo não vacinado. Este grupo também desenvolveu estado de nefrite intersticial e parenquimal leve, caracterizado por leve infiltrado de heterófilos e linfoplasmacelular entre o sétimo e décimo primeiro dpi, de maneira muito semelhante ao que ocorreu com o grupo não vacinado. Outra alteração evidente no grupo não vacinado com sete dpi foi a dilatação dos túbulos renais, como demonstrado na Figura 6, A.

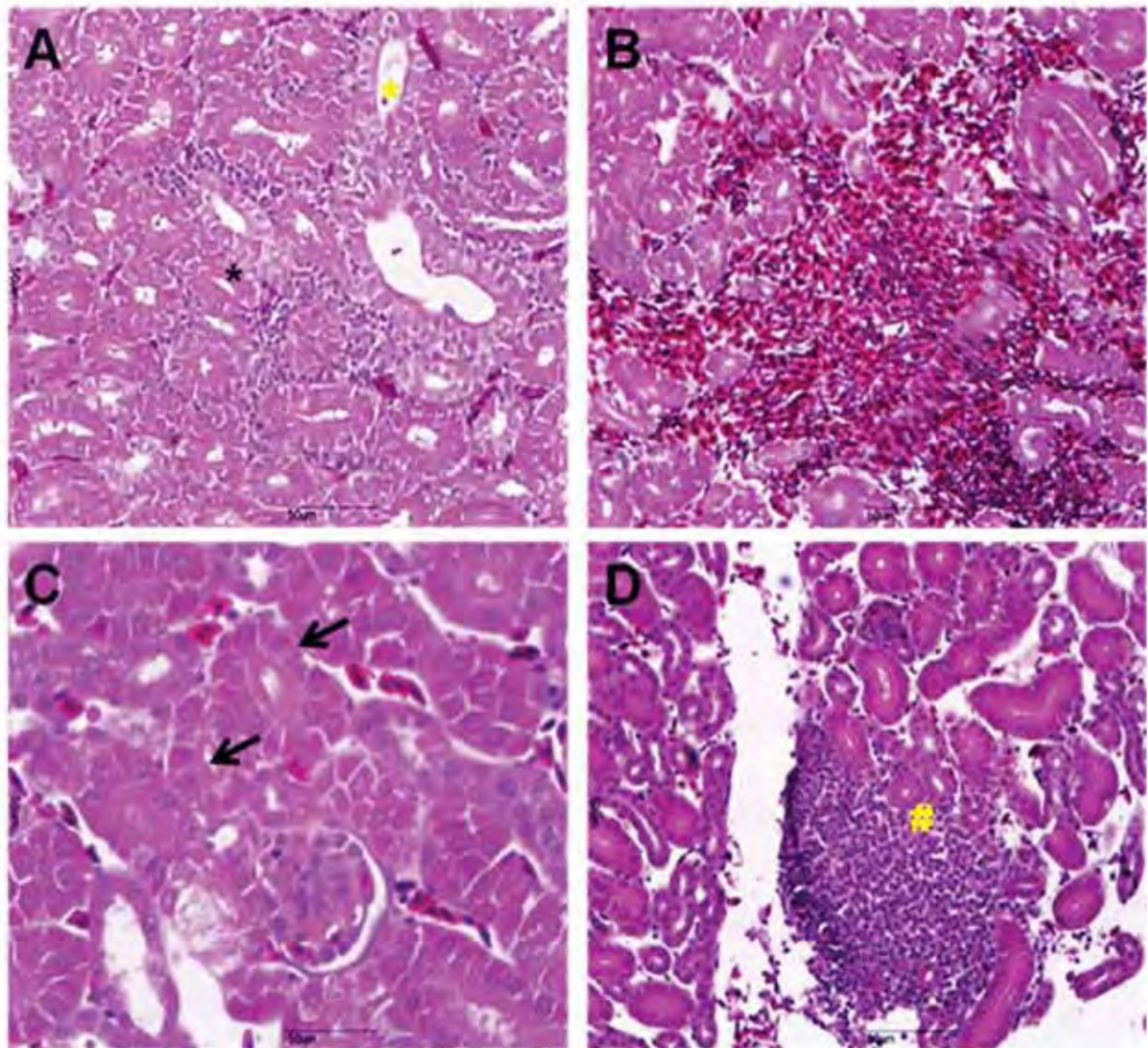


Figura 6. Foto micrografias das lesões renais das aves pertencentes aos grupos desafiados com a variante IBVPR-12. A. Rim de ave do grupo AV com sete dpi demonstrando leve infiltrado inflamatório ao redor dos túbulos contorcidos distais (*), característico de nefrite difusa; (*) dilatação tubular com espessamento da luz. obj. 10x. B. Rim de ave do grupo ANV apresentando nefrite aguda com severa infiltração de células inflamatórias com acentuada hemorragia intersticial, demonstrando um mescla de células inflamatórias e hemácias ao redor dos túbulos contorcidos. obj. 10x. C. Rim de ave do grupo ANV com sete dpi apresentando notável degeneração tubular difusa moderada. Notar citoplasma das células epiteliais cúbicas dilatados e outras porções em fase de necrose com desaparecimento total do núcleo das células epiteliais (cariólise) - (seta) denominado nefrose. obj. 40x. D. Fotomicrografia de rim de ave do grupo ANV, demonstrando moderado infiltrado inflamatório na região do parênquima renal (#). obj. 20x. Hematoxilina e Eosina.

Chen et al. (1996) ao testar uma estirpe de caráter nefropatogênico, chamada MA-87, encontrou as maiores lesões renais entre o sexto e oitavo dia pós-infecção. No entanto, as lesões ou alterações inflamatórias se mantiveram até o vigésimo dpi. Em parte, os nossos resultados obtidos no exame histopatológico dos rins das aves desafiadas com esta estirpe variante do VBI isolada de campo, corrobora com os resultados obtidos por Chen et al. (1996). Devido esta estirpe caracterizada como variante genética do gene S1 ainda não ter sido testada em relação à sua patogenia e nem relatada a sua associação com lesões renais, nossos resultados se mostram surpreendentes quanto ao caráter nefropatogênico, mesmo que moderado e não relacionado com mortalidade, devido a esta patogenia ser pouco relatada no Brasil.

No conjunto desses nossos resultados destaca-se a inadequada proteção ao parênquima renal desenvolvida pelas aves vacinadas com a estirpe Mass H120. Pois como observado pela análise de ciliostase, histopatologia e carga viral em relação à traqueia, a proteção foi tão eficiente para esta variante quanto para a estirpe homóloga. Esses achados podem ser justificados devido ao tropismo predominantemente renal da estirpe variante, o que faz com que esse vírus se replique mais nas células desse órgão e menos nos tecidos do trato respiratório, ou a heterogeneidade entre as estirpes aplicadas em nosso modelo experimental, ou ainda pela baixa virulência da vacina viva inativada utilizada, pois muitas vezes, estas vacinas não induzem uma proteção eficaz sistêmica, isto é, para outros tecidos, tais como o rim e oviduto, contra o desafio com estirpes que são nefropatogênicas ou patogênicas para o trato reprodutivo (DHINAKAR; JONES, 1996). Outro fator que também pode estar relacionado, é que o título de anticorpos desenvolvidos após a vacinação esteve em sua maior parte direcionado às características antigênicas da estirpe Mass, como demonstrado anteriormente. Isso pode ter contribuído para uma insuficiente neutralização viral, o que não impediu após a replicação viral primária no tecido respiratório, que este vírus desenvolvesse tropismo para outros órgãos, tal como o rim. Bouqdaoui et al (2005), ao testar a vacinação com a estirpe Mass frente a três estirpes geneticamente distintas e classificadas por RFLP como variantes do gene S1, também obteve resultados insatisfatórios quanto a proteção renal.

Alguns países, principalmente a China, que vem continuamente se deparando com casos de BI associada a quadros de nefrite, propõem o desenvolvimento de vacinas homólogas a estas variantes nefropatogênicas. A justificativa provém de testes da eficiência vacinal com formulações vacinais a partir dos vírus isolados de campo, como demonstrado por Qingmei et al. (2011) Outra abordagem de sucesso nesse contexto foi realizada por Lee et al. (2010), ao neutralizar uma estirpe coreana fortemente nefropatogênica, através de 170 passagens em ovos embrionados SPF, conseguindo atenuar por restringir a estirpe denominada K2/01 a replicar quase que somente no trato respiratório, e mesmo assim, ao aplicá-la como estirpe vacinal, ela pode desenvolver elevado índice de neutralização frente a estirpe heteróloga Mass e não permitiu alterações histológicas frente ao desafio com duas estirpes variantes com patotipo de caráter respiratório.

Neste estudo não foi possível dimensionar o impacto desta estirpe variante sobre uma provável infecção em massa, devido à pequena amostragem utilizada no delineamento experimental. Contudo, os dados levantados nesse estudo sobre a patogenicidade dessa variante do VBI, ressaltam a importância de se investigar mais detalhadamente a evolução do VBI em território brasileiro em relação às alterações patogênicas, assim como vem acontecendo em países que, no período de 2 décadas, viram a indústria avícola dobrar sua capacidade de produção, como ocorreu com a China.

6.5.4. Gônadas, tonsila cecal e ceco

Não foi notada nenhuma alteração patológica nos ovários das aves de todos os grupos experimentalmente infectados. No entanto, foi observada leve infiltração de heterófilos nos testículos das aves vacinadas e desafiadas com a estirpe IBVPR-12. Uma moderada infiltração de células linfo-histiocitárias foi também encontrada no interstício ou no epidídimo do grupo não vacinado e desafiado com a estirpe variante, com onze e quatorze dpi, além de acentuada degeneração e difusa das células dos túbulos seminíferos associado a áreas multifocais de necrose do epitélio tubular (Figura 7, A). Além disso, foi detectada na avaliação da carga viral, uma maior quantidade de vírus entre o quarto e décimo primeiro dpi nas aves do grupo

ANV e com onze dpi no grupo AV, sendo que após este intervalo houve uma redução dessa carga viral. No entanto as alterações testiculares foram notadas em um período mais tardio após o desafio (quatorze dpi), sugerindo que a carga viral pode ter-se mantido alta até pouco antes do décimo quarto dpi, e com isso as lesões e a migração das células inflamatórias de defesa aumentaram até este período. Pode-se supor também, que as lesões e a inflamação diminuíram devido a eliminação do vírus após o décimo quarto dpi. Benyeda et al. (2009) demonstrou leve infiltrado linfo-plasmacelular intersticial nos testículos de aves não vacinadas e desafiadas com a estirpe Qx do VBI, que também estava associada com elevada carga viral neste órgão reprodutor, semelhante aos nossos resultados, porém a estirpe IBVPR-12 desencadeou moderado infiltrado inflamatório nas aves não vacinadas e leve nas aves previamente vacinadas. No entanto, neste mesmo trabalho foi constatado que uma estirpe QX de origem eslovaca estava relacionada com moderado infiltrado inflamatório e deposição de cálcio nos oócitos primários do ovário das aves desafiadas, fato este que não ocorreu em nosso experimento.

Recentemente, uma estirpe do VBI isolada no Brasil apresentando uma estreita relação genética com uma estirpe europeia, denominada D274, em conjunto com o metapneumovírus aviário, foi associada ao desenvolvimento de lesões no testículo, mais especificamente no epidídimo de galos reprodutores. O interessante é que essas lesões evoluíram para a formação de cálculos de cálcio no epidídimo destes galos e conseqüente redução da fertilidade dessas aves (VILLARREAL et al., 2007a). Em outro estudo Gallardo et al. (2011), avaliou a replicação viral nos testículos de galos previamente inoculados com estirpes virulentas Massachusetts e Arkansas, e detectou a presença viral em 100 e 96% respectivamente dessa gônada. Neste mesmo estudo, foi demonstrado que houve transmissão venérea do VBI por meio da inseminação artificial, tendo sido detectada a presença do VBI na traqueia de 50% das aves inseminadas, e por seguinte alterações na qualidade dos ovos dessas mesmas galinhas.

Com tudo isso, é de suma importância o monitoramento da presença de variantes do VBI que apresentam um amplo espectro de tropismo tecidual, mesmo em aves previamente vacinadas, no intuito de reduzir possíveis infecções venéreas e a perda na qualidade de ovos na indústria avícola brasileira. Mais uma vez, fica

evidente a importância da presença e circulação dessa variante do VBI nos plantéis avícolas brasileiros e a relevância de se desenvolver vacinas com estirpes homólogas e capazes de impedir a replicação desse vírus em outros tecidos além daqueles que compõem o trato respiratório, tais como, os do sistema urogenital ou reprodutor, a fim de reduzir potencial agravo ao hospedeiro e consequente perda econômica à produção avícola de nosso país.

Quanto à tonsila cecal, não há relatos mais detalhados de lesões ocasionadas neste compartimento linfóide associadas a infecção pelo VBI. No entanto, sabe-se que algumas estirpes do VBI realizam replicação em células semelhantes a histiócitos e células linfóides presentes nas tonsilas cecais (OWEN et al., 1991). Foi também demonstrado por imunofluorescência a presença do VBI em células epiteliais apicais das vilosidades no íleo e reto (AMBALI & JONES, 1990; DHINAKAR & JONES, 1996a). Em nossa avaliação foi encontrada alguma hiperplasia dos nódulos linfáticos de tonsilas cecais de duas aves com quatorze dpi (Figura 7 B). Estas lesões podem ser justificadas pelo aumento carga viral observada na tonsila destas aves nesse mesmo período, que corresponde ao sétimo dpi (Figura 15 E). A hiperplasia observada aqui, da mesma maneira que foi relatada para o tecido traqueal, na maioria das vezes pode ser devido a injúrias causadas por determinados patógenos ou corpos estranhos em um ambiente celular. No nosso caso, pode-se associar a moderada carga viral presente nos nódulos linfóides com o desenvolvimento de uma resposta imunomediada frente ao vírus neste órgão. A propósito, mais recentemente, algumas estirpes QX do VBI isoladas na França, China, Grécia e Hungria demonstraram títulos consideráveis nas tonsilas cecais até pelo menos o vigésimo oitavo dia pós-infecção (BENYEDA et al., 2009). No entanto, esses títulos infectantes não foram correlacionados com alterações patológicas nas tonsilas cecais. Neste sentido, verifica-se que maiores esclarecimentos são necessários sobre as alterações linfóides desencadeadas pelas estirpes variantes do VBI, especialmente nas tonsilas cecais.

Além disso, foi observado que os tecidos das tonsilas cecais possuíam boa parte de suas vilosidades com moderada concentração de células inflamatórias, bem como descamação das células mucosas de uma das aves, no sétimo dpi. Como foi descrito acima, sabe-se que o VBI algumas vezes pode-se replicar em células

apicais das vilosidades no íleo e reto (Ambali; Jones, 1990). No entanto, não foi detectada, nesse estudo, carga viral no ceco pela técnica de PCR em tempo real. Em suma, pode-se considerar que essa variante do VBI está se replicando em algumas regiões do sistema digestório, já que foi detectada a presença deste vírus nas tonsilas cecais, que é um órgão linfóide, que se encontra adjacente ao ceco. Deve ser lembrado que as aves desafiadas com a variante apresentaram quadros de diarreia na análise clínica, o que nos leva a considerar em adição ao tropismo renal e testicular, um possível o caráter enterotrópico desta variante do VBI.

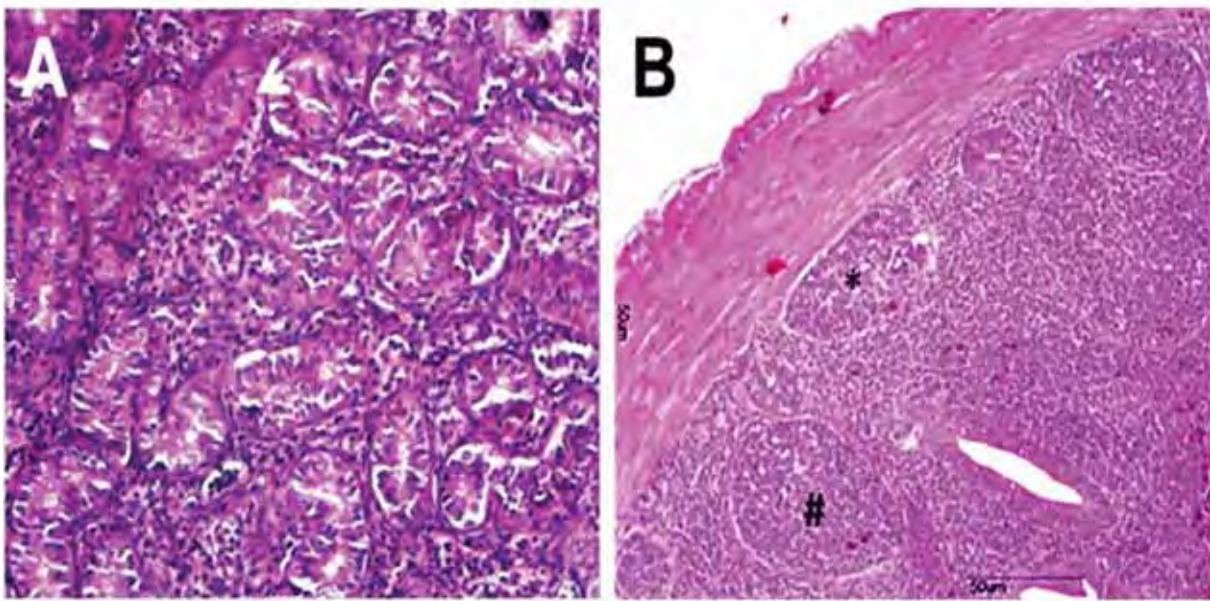


Figura 7. A. Testículo de ave pertencente ao grupo não vacinado e desafiado com a estirpe variante IBVPR-12 com onze dpi; nota-se acentuada degeneração difusa dos túbulos seminíferos associado a áreas multifocais de necrose do epitélio tubular (seta). Observa-se a presença de infiltrado inflamatório difuso em grau moderado no parênquima. obj. 20x. B. Tonsila cecal de ave não vacinada e desafiada com a estirpe IBVPR-12, demonstrado nódulo linfático de tamanho normal (*) e leve hiperplasia nodular (#). obj. 10x.

Uma estirpe variante do VBI já citada acima e isolada no Marrocos, a estirpe G, foi classificada como enterotrópica e com capacidade de persistir durante períodos mais prolongados no intestino das aves hospedeiras, em comparação com a traqueia (El HOUADFI et al., 1986). Quase uma década depois da descrição da estirpe G, verificou-se que uma variante do VBI causadora de surtos de BI de característica respiratória, denominada 793/B foi associada com diarreia em frangos

de corte (DHINAKAR; JONES, 1996a). No entanto é necessário que sejam caracterizadas essas novas variantes quanto aos possíveis tecidos alvo de replicação, em conjunto com o estudo da evolução fenotípica que essas estirpes vêm sofrendo, tal como foi investigado no presente estudo. Benyeda et al. (2009) relataram que uma estirpe QX isolada na China está associada com o desenvolvimento leve de sinais respiratórios e moderada diarreia aquosa em aves infectadas experimentalmente, além de ter sido demonstrado sua capacidade de promover infiltração de células mononucleares no íleo das aves desafiadas. Ao mesmo tempo foi verificado que essas aves continham altos títulos virais nas amostras de íleo.

6.6. Avaliação da resposta imune humoral local e sistêmica contra o VBI

6.6.1. Perfil cinético dos anticorpos Anti-VBI M41 dos isótipos IgM e IgG séricos

As amostras pertencentes as aves do grupo controle, que foram colhidas em todos os intervalos do delineamento experimental, não apresentaram positividade para nenhum dos isótipos de anticorpos anti-VBI testados no soro sanguíneo. Também não foi detectado nenhum aumento significativo da imunoglobulina A no soro dos animais de todos os grupos. Este resultado pode ter ocorrido pelo fato desta classe de imunoglobulina apresentar-se em maiores concentrações e suas principais atividades funcionais nas secreções mucosas (SNOECK et al., 2006)

Em relação aos grupos vacinados com a estirpe H120 do VBI, a primeira imunoglobulina a apresentar aumento nos níveis de anticorpos anti-VBI foi a IgM com pico no décimo dpv, seguindo-se uma redução dos níveis de IgM após o décimo quinto, chegando ao nível basal no vigésimo dpv, muito semelhante a um estudo realizado por Thompson et al. (1997). Em seguida, observou-se o aumento sérico de IgG, que atingiu a maior concentração no décimo quinto dpv, sendo que os níveis desse isótipo de anticorpos mantiveram-se em níveis semelhantes até um dia antes do desafio, no vigésimo dpv (Figura 8, Linhas azuis e amarelas). Toro et al. (1996) também evidenciaram o incremento de IgG sérica mais tardio em relação a IgA no compartimento de mucosa, onde as aves vacinadas com doses de 10^6

demonstraram pico de IgG no trigésimo dpv, enquanto que os níveis de IgA atingiram as mesmas proporções logo no quinto dpv. Nossos resultados foram em parte semelhante ao descrito por Mocket e Darbyshire, 1981, que verificou que a cinética das respostas imunes humorais induzidas após a vacinação contra o VBI, atinge as máximas intensidades dos anticorpos antivirais específicos do isotipo IgG no soro sanguíneo de aves vacinadas por volta dos 21 dias após a vacinação.

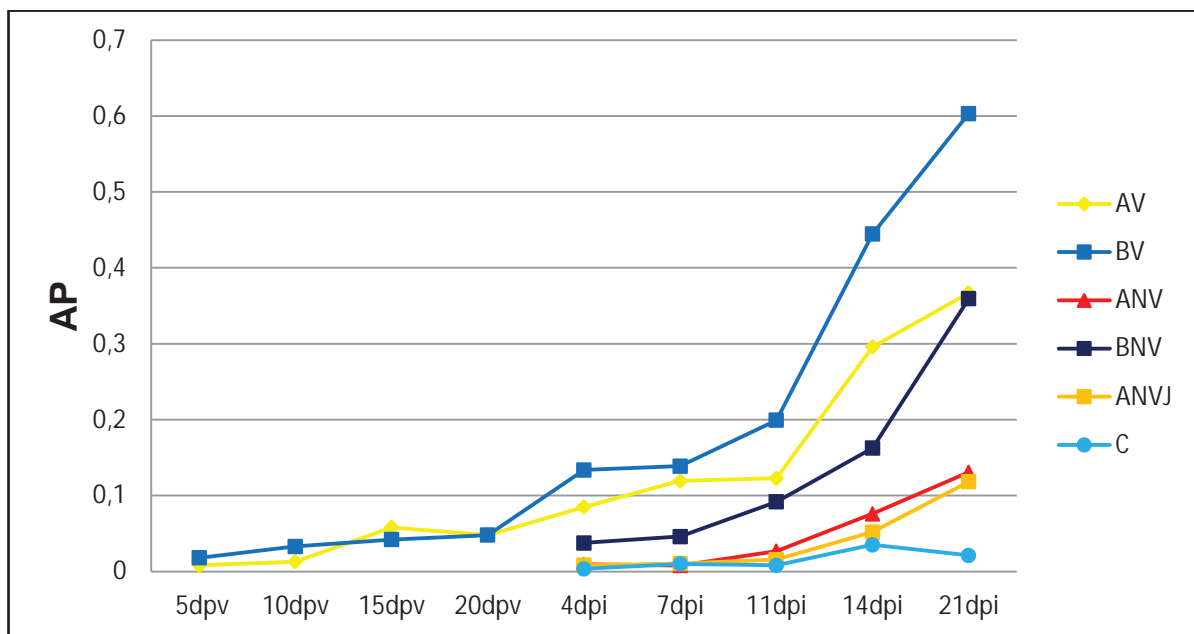


Figura 8. Perfil cinético (médias) da produção de anticorpos do isótipo IgG anti-VBI M41 detectados pelo SELISA-Con A nas amostras de soro das aves nos diferentes dias pós-vacinação (dpv) ou pós-infecção (dpi). Legenda: BV – aves SPF vacinadas com estirpe H120 no vigésimo primeiro dia de idade e desafiadas com estirpe M41 do VBI aos 42 dias de idade; AV– aves SPF vacinadas no vigésimo primeiro dia de idade com a estirpe H120 e desafiadas aos 42 dias de idade com estirpe variante IBVPR-12 do VBI ANV – aves SPF não imunizadas e desafiadas com a estirpe variante IBVPR-12 aos 21 dias de idade; BNV – aves SPF não imunizadas e desafiadas com a estirpe M41 aos 21 dias de idade; ANVJ - aves SPF não imunizadas e desafiadas com a estirpe variante IBVPR-12 aos 2 dias de idade; C- aves SPF tratadas com PBS (Controle negativo da infecção).

Com relação ao grupo vacinado e posteriormente desafiado com a estirpe M41, verifica-se que foi marcante o aumento de IgM, já no quarto dpi, chegando a atingir a máxima concentração sérica no sétimo dpi. Esse perfil cinético de resposta para os anticorpos IgM é de certa forma um fenômeno esperado, em razão de que

as imunoglobulinas IgM são de produção mais precoce, estando via de regra presentes em maiores teores em infecções recentes. Semelhante ao grupo vacinado, as aves apenas desafiadas seguiram a mesma cinética, no entanto é notável que o nível de IgM presente foi menos que a metade no quarto dpi das aves previamente vacinadas, e ainda mantiveram títulos inferiores durante todos os intervalos pós-infecção.

No grupo desafiado com a variante brasileira do VBI, a concentração atingida de IgM atingiu seu pico no sétimo dpi tanto para o grupo vacinado quanto para o não vacinado, porém como demonstrado na Figura 9, houve uma grande discrepância em relação aos grupos submetidos a infecção com a estirpe M41. Apesar de o grupo AV apresentar maior nível de IgM quando comparado ao grupo ANV e ANVJ, estes níveis estiveram distantes daqueles atingidos pelas aves desafiadas com a estirpe M41. A IgG também manteve uma menor concentração no grupo AV quando comparado ao grupo BV. O maior título foi atingido no vigésimo primeiro dpi com título crescente a partir do décimo quarto dia. Além disso, verifica-se que o pico da concentração de anticorpos anti-VBI do isótipo IgG foi alcançado no vigésimo primeiro dia do grupo AV, o que é bastante semelhante ao que ocorreu com o grupo BNV no mesmo período.

Apesar de existirem diversos estudos sobre as respostas imunes induzidas em aves vacinadas e/ou desafiadas com VBI, principalmente no que diz respeito às estirpes de referência como M41 e H120, pouco se sabe sobre as respostas humorais em aves desafiadas com as variantes emergentes em diferentes partes do mundo, inclusive no Brasil. Dentro desse contexto, tem sido demonstrado que, na maioria das vezes, a infecção ou a vacinação com o VBI estimulam a produção de anticorpos dos isótipos IgG, IgM e IgA, tanto no compartimento sanguíneo, como no compartimento das mucosas dos tratos respiratório e urogenital (CAVANAGH, 2007). A vacinação quando elaborada, permite à ave desenvolver uma imunidade primária, criando células de memória produtoras de anticorpos específicos, os plasmócitos, desencadeando assim uma imunidade mais efetiva, rápida e específica em uma eventual infecção posterior ao agente de interesse.

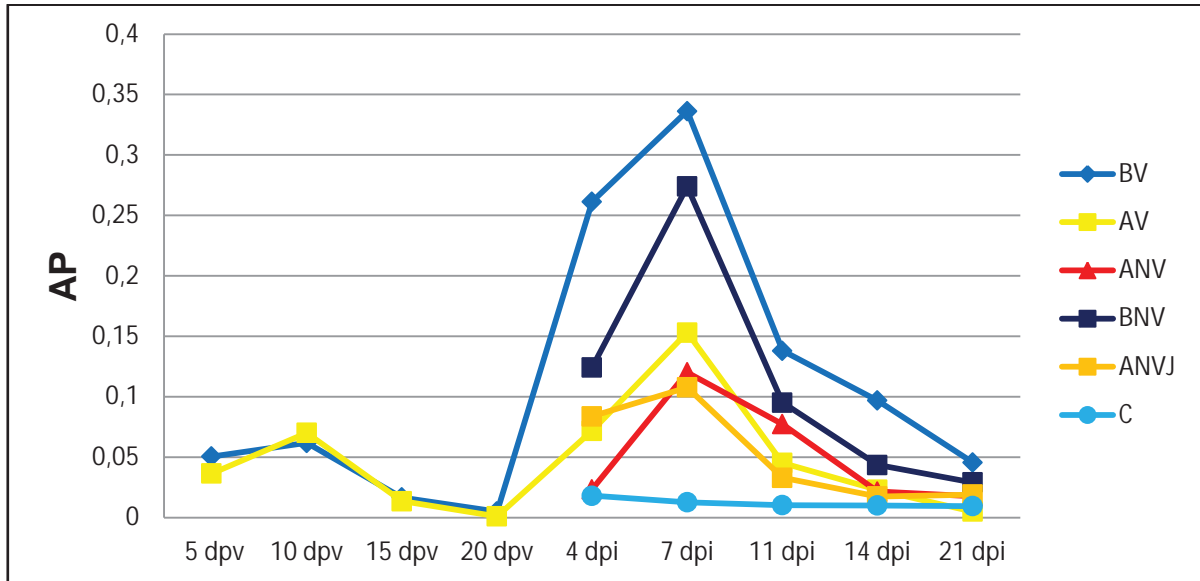


Figura 9. Perfil cinético (médias) da produção de anticorpos do isótipo IgM anti-VBI M41 detectados pelo SELISA- Con A nas amostras de soro das aves nos diferentes dias pós-vacinação (dpv) ou pós-infecção (dpi). Legenda: BV – aves SPF vacinadas com estirpe H120 no vigésimo primeiro dia de idade e desafiadas com estirpe M41 do VBI aos 42 dias de idade; AV– aves SPF vacinadas no vigésimo primeiro dia de idade com a estirpe H120 e desafiadas aos 42 dias de idade com estirpe variante IBVPR-12 do VBI ANV – aves SPF não imunizadas e desafiadas com a estirpe variante IBVPR-12 aos 21 dias de idade; BNV – aves SPF não imunizadas e desafiadas com a estirpe M41 aos 21 dias de idade; ANVJ - aves SPF não imunizadas e desafiadas com a estirpe variante IBVPR-12 aos 2 dias de idade; C- aves SPF tratadas com PBS (Controle negativo da infecção).

Em nosso estudo, foi possível verificar que a imunidade humoral ao nível de anticorpos IgM e IgG no compartimento sanguíneo desenvolvida pela vacinação com a estirpe Mass H120, foi satisfatória frente ao desafio com uma estirpe homóloga (M41), no qual os animais vacinados demonstraram boa capacidade de resposta secundária após o desafio com esta estirpe. No entanto, as aves do grupo vacinado e desafiado com a estirpe IBVPR-12, apesar de terem alcançado títulos superiores às aves apenas desafiadas com esta variante, não apresentaram uma concentração muito elevada, sendo menores do que aquelas observadas nas aves infectadas ou vacinadas e infectadas com a estirpe M41 do VBI destes isótipos na corrente sanguínea. Isto pode ser justificado pelo fato desta estirpe possuir antigenicidade distinta da estirpe vacinal, fazendo em parte, uma insuficiente resposta imune secundária.

No caso descrito acima, há de se considerar ainda, com base nos efeitos biológicos apresentados por esta estirpe, que muito provavelmente se trata de um sorotipo distinto da estirpe Mass, e que a imunização de aves com essa estirpe de referência não foi capaz de induzir níveis mais elevados de anticorpos como ocorreria para uma estirpe homóloga, isto é, pertencente ao mesmo sorotipo, como é o caso do que ocorreu com as respostas imunes humorais das aves vacinadas com a estirpe H120 do VBI e desafiadas com a estirpe M41. Cabe, ainda, nesse caso, se considerar que a estirpe IBVPR-12 é uma variante genética da glicoproteína da espícula S1 e que tal componente estrutural é um dos principais responsáveis pela antigenicidade e imunogenicidade do VBI, ou seja, ela se constitui no principal componente antigênico e estrutural desse vírus, uma vez que interage com receptores de células alvo e apresenta os sítios vírus-neutralizantes mais relevantes do VBI. Foram encontrados, na subunidade S1, sítios antigênicos indutores de anticorpos vírus-neutralizantes (VN) e inibidores da hemaglutinação (HI), levando a associação desta proteína como a principal estrutura antigênica responsável pela indução de respostas protetoras nas aves imunizadas, após convalescença de infecção ou vacinação, ou ainda pela caracterização dos diferentes sorotipos do VBI (KOCH et al., 1990; IGNJATOVIC; GALLI, 1994; GELB et al., 1997; LAI; CAVANAGH, 1997; WANG et al., 2002). Com isso, o fato de ter havido uma fraca resposta humoral das aves vacinadas frente ao desafio com a estirpe IBVPR-12, pode em tese, estar intimamente relacionado com a diferença genética da glicoproteína S1.

6.6.2. Perfil cinético dos anticorpos Anti-VBI M41 dos isótipos IgA, IgM e IgG na secreção lacrimal

Foi possível determinar também o perfil cinético da produção de anticorpos do isótipo IgA contido na secreção lacrimal nos diferentes intervalos observados neste experimento. A Figura 10, ilustra que as aves que receberam uma dose vacinal em seu 21º dia de idade, apresentaram o maior incremento nos níveis de IgA na secreção lacrimal no décimo quinto dia pós-vacinação, tendo demonstrado um declínio deste isótipo até o vigésimo dpv. De forma já esperada, as aves vacinadas e desafiadas com a estirpe M41 apresentaram um aumento de aproximadamente 1/3

na concentração desta imunoglobulina frente ao período pós-vacinação logo no sétimo dpi, e com aumento crescente no decorrer dos intervalos, até atingir nível máximo no décimo quarto dpi. No entanto o grupo não vacinado e desafiado com a estirpe M41, apesar do pico na concentração de anticorpos IgA ter sido alcançado no décimo quarto dpi e de ter sido maior que o grupo vacinado, nota-se que o incremento de anticorpos foi mais tardio e menor no período compreendido entre o sétimo e décimo primeiro dpi. O fato de o grupo BV apresentar uma resposta mais rápida e com menor pico de IgA em relação ao grupo BNV, pode ser devido à resposta imune de memória desenvolvida após a vacinação, a qual cria no hospedeiro um repertório de células de memória capazes de identificar o agente de forma mais rápida e específica, com consequente síntese de anticorpos mais precoce do que o grupo que não foi vacinado e não possui este aparato imune. Estas vacinas induzem a síntese de anticorpos e a diferenciação para células T efetoras, assim como os linfócitos B de memória, nos tecidos infectados por este vírus (Cavanagh, 2007). Estes anticorpos locais anti-VBI, particularmente anticorpos do isotipo IgA e células T citotóxicas, foram demonstrados em estudos separados como componentes cruciais para restringir ou eliminar o VBI do hospedeiro (Gillette 1981, Toro & Fernandez, 199; Collison et al., 2000, Mondal & Naqi, 2001).

Assim como foi encontrado nos resultados de ciliostase, histopatologia e carga viral da traqueia, no décimo quarto dpi os animais do grupo BV já estavam em fase de recuperação, voltando ao seu estado normal e com baixa carga viral, com isso, podemos explicar o fato do pico de IgA não ter alcançado um nível tão alto quanto ao do grupo BNV, isto é, pelo simples fato de haver maior concentração mais precoce devida a existência de células produtoras de anticorpos (células de memória), capaz de socorrer o hospedeiro na eliminação do antígeno de maneira mais rápida e específica por uma síntese semelhante a síntese “de novo”.

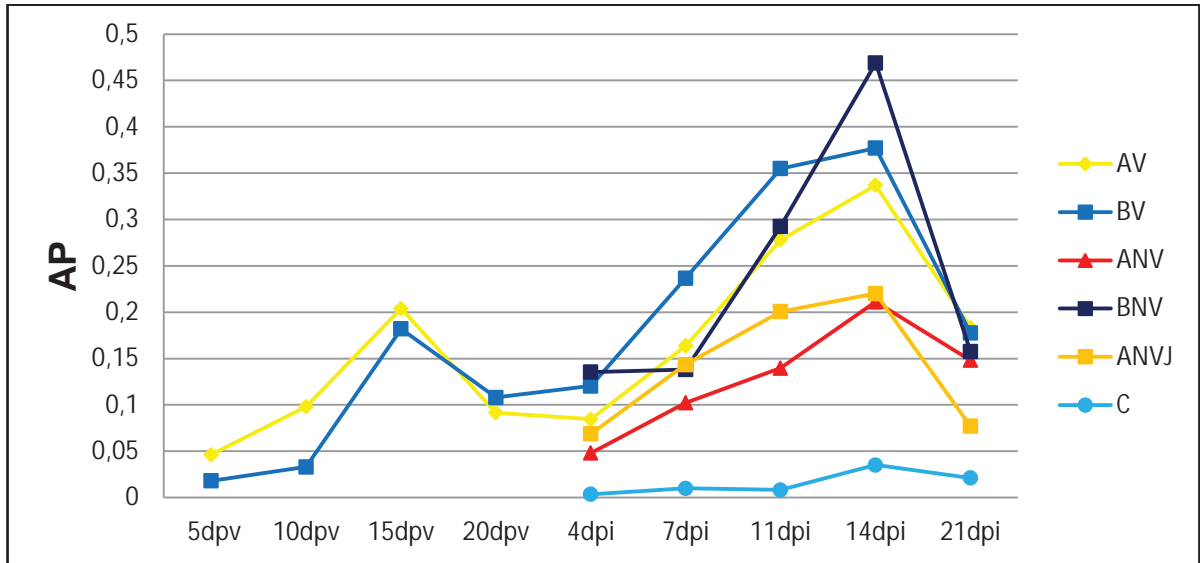


Figura 10. Perfil cinético (médias) da produção de anticorpos do isótipo IgA anti-VBI M41 detectados pelo SELISA- Con A nas amostras de lágrima das aves nos diferentes dias pós-vacinação (dpv) ou pós-infecção (dpi). Legenda: BV – aves SPF vacinadas com estirpe H120 no vigésimo primeiro dia de idade e desafiadas com estirpe M41 do VBI aos 42 dias de idade; AV – aves SPF vacinadas no vigésimo primeiro dia de idade com a estirpe H120 e desafiadas aos 42 dias de idade com estirpe variante IBVPR-12 do VBI ANV – aves SPF não imunizadas e desafiadas com a estirpe variante IBVPR-12 aos 21 dias de idade; BNV – aves SPF não imunizadas e desafiadas com a estirpe M41 aos 21 dias de idade; ANVJ - aves SPF não imunizadas e desafiadas com a estirpe variante IBVPR-12 aos 2 dias de idade; C- aves SPF tradas com PBS (Controle negativo da infecção).

Com relação aos grupos desafiados com a variante IBVPR-12, os resultados obtidos demonstram que, tanto o grupo ANV quanto o ANVJ, não apresentaram uma boa concentração de anticorpos anti-VBI do isótipo IgA. Vale lembrar, que a análise feita por ELISA, utilizou como antígeno a estirpe M41, que pode explicar o baixo título de IgA nestes grupo. Porém, o perfil cinético foi semelhante ao grupo BNV, apresentando uma máxima concentração no décimo quarto dpi. Já o grupo vacinado, apresentou um nível de anticorpos IgA mais elevado, porém menor do que o grupo BV. Apesar de estes ensaios sugerirem que a estirpe IBVPR-12 possivelmente é um sorotipo distinto da estirpe Massachusetts (M41), o perfil cinético das aves vacinadas e desafiadas, apontam para uma resposta humoral parcial, com respeito a produção de IgA, após a vacinação com o sorotipo Massachusetts H120, semelhante ao que ocorreu com o isótipo IgG sérico.

A respeito da resposta de anticorpos IgM na secreção lacrimal, os resultados se mostraram muito semelhantes aos encontrados nas amostras de soro. As maiores concentrações foram obtidas no sétimo dpi em todos os grupos (Figura 11). Os grupos vacinados e desafiados apresentaram maior concentração deste isótipo em todos os intervalos em relação aos grupos não vacinados. Da mesma forma que ocorreu com as amostras de soro, as aves do grupo AV não desenvolveram um aumento significativo de IgM na secreção lacrimal após o desafio, no entanto o perfil cinético apresentado foi o mesmo do grupo desafiado com a estirpe M41. A imunoglobulina IgM foi a primeira a apresentar uma resposta após o desafio, atingindo seu pico no décimo dpv e sétimo dpi, e diminuiu antes que houvesse um aumento dos isótipos IgA e IgG, que foram maiores no décimo quarto e vigésimo primeiro dpi respectivamente. Estes resultados foram semelhantes aos descritos por Mockett et al. (1986) e Martins et al. (1991).

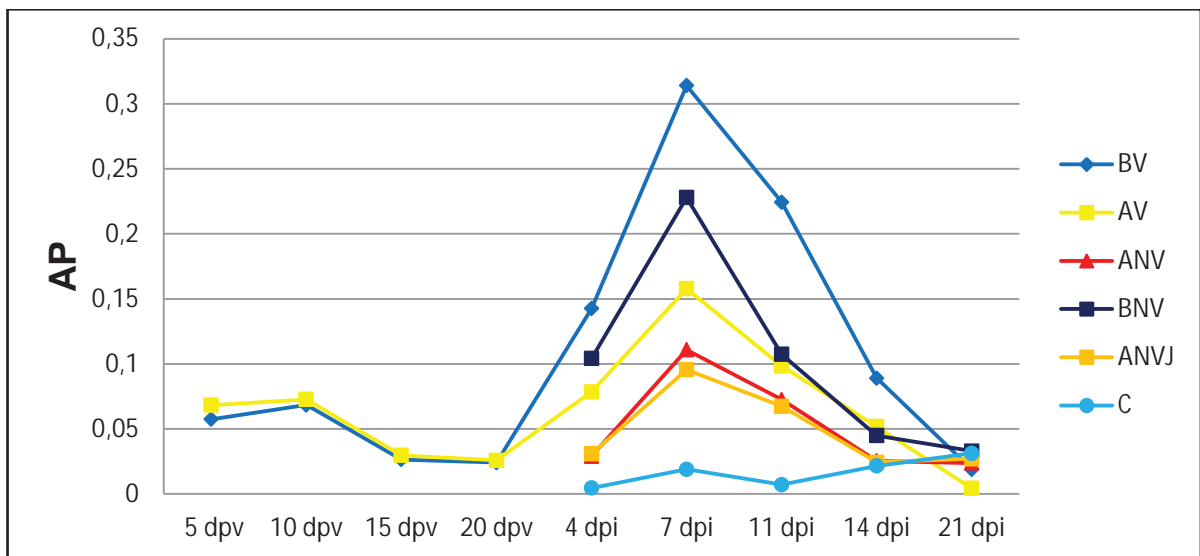


Figura 11. Perfil cinético (médias) da produção de anticorpos do isótipo IgM anti-VBI M41 detectados pelo SELISA- Con A nas amostras de lágrima das aves nos diferentes dias pós-vacinação (dpv) ou pós-infecção (dpi). Legenda: BV – aves SPF vacinadas com estirpe H120 no vigésimo primeiro dia de idade e desafiadas com estirpe M41 do VBI aos 42 dias de idade; AV – aves SPF vacinadas no vigésimo primeiro dia de idade com a estirpe H120 e desafiadas aos 42 dias de idade com estirpe variante IBVPR-12 do VBI ANV – aves SPF não imunizadas e desafiadas com a estirpe variante IBVPR-12 aos 21 dias de idade; BNV – aves SPF não imunizadas e desafiadas com a estirpe M41 aos 21 dias de idade; C- aves SPF tradas com PBS (Controle negativo da infecção).

Os anticorpos anti-VBI do isótipo IgG foi o último a apresentar o maior pico de concentração, tanto nas amostras de soro quanto de lágrima. Como pode ser observado na Figura 12, todos os grupos demonstraram o maior nível desses anticorpos no vigésimo primeiro dia, sendo que o grupo BV foi o que atingiu a maior concentração em relação aos demais grupos experimentais. Além disso, foi notório o aumento deste isótipo no vigésimo dpv dos grupos vacinados, e apesar destes grupos manterem uma considerável concentração desta imunoglobulina até um dia antes do desafio, o nível desses anticorpos apresentou um aumento gradativo, influenciado pelo tempo pós-infecção. Estes resultados mais uma vez corroboram com os descritos por Martins et al. (1991) ao testar em amostras de soro de galinhas desafiadas com a estirpe Massachusetts M41 e uma estirpe heteróloga denominada IBV-9, demonstrou um aumento de concentração de IgG mais tardiamente em relação a IgM, onde a IgG apresentou a maior concentração no décimo quarto dpi e a IgM no nono dpi. Ainda neste contexto, vimos que a IgG teve um aumento já no décimo quarto dia tanto pós-vacinação quanto pós-infecção, aparecendo de forma mais abundante assim que a concentração de IgM voltava aos níveis basais.

Neste estudo, apesar de todos os isótipos testados nas aves desafiadas com a variante IBVPR-12 demonstrarem baixa reatividade com a estirpe M41, devido ao fato desta estirpe ser muito provavelmente heteróloga sob o ponto de vista antigênico, ainda assim podemos detectar um aumento da concentração destes isótipos em todos os períodos de maior concentração correspondente às aves desafiadas com a estirpe M41. A propósito, um estudo feito por De Wit et al. (1998), após avaliar a concentração de IgM em 168 soros de campo provenientes de frangos de corte coletados durante a fase aguda de uma infecção por VBI, no qual utilizou a estirpe M41 como antígeno de captura no ELISA, foi capaz de detectar as respostas de IgM para os sorotipos de VBI que não estavam relacionados com a estirpe Massachusetts. Nesse mesmo estudo referido acima, a especificidade do teste (ELISA-IgM α IBV) foi de 99% e a sensibilidade variou de 83 a 100%, dependendo do dia pós-vacinação. Comparando com nosso modelo experimental, pode-se dizer que a detecção pelo método de ELISA-Com A de IgM e IgG como ferramenta de diagnóstico de infecções por VBI pode ser utilizada para a estirpe variante IBVPR-12, de modo a considerar um limiar de detecção ou títulos mais

baixos. A resposta de IgM foi mais rápida e transiente e, portanto, indicativa da ocorrência de infecções agudas causadas pelo VBI.

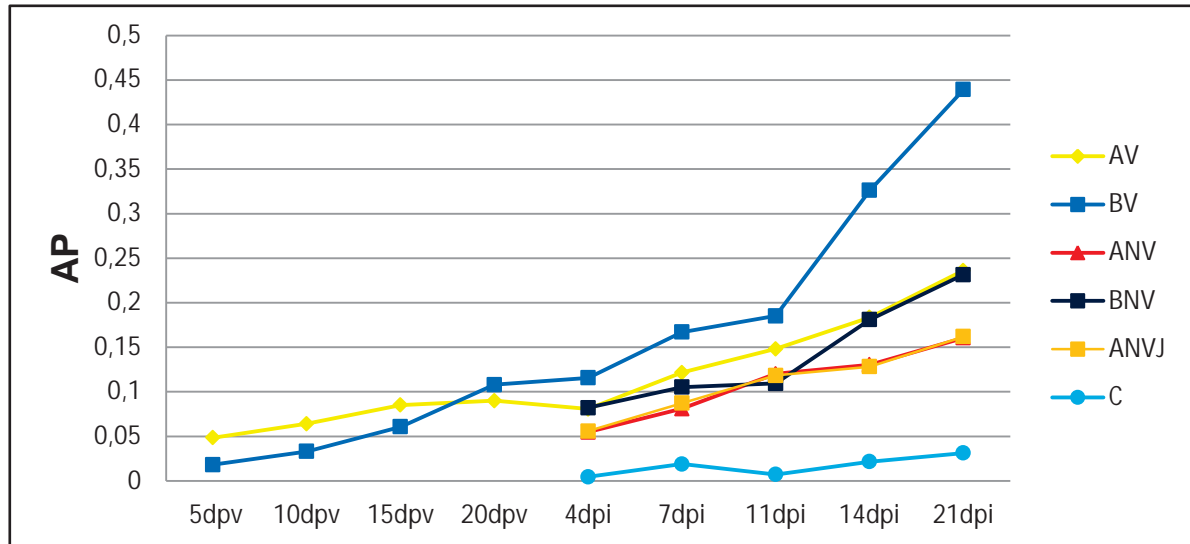


Figura 12. Perfil cinético (médias) da produção de anticorpos do isótipo IgG anti-VBI M41 detectados pelo SELISA- Con A nas amostras de lágrima das aves nos diferentes dias pós-vacinação (dpv) ou pós-infecção (dpi). Legenda: BV – aves SPF vacinadas com estirpe H120 no vigésimo primeiro dia de idade e desafiadas com estirpe M41 do VBI aos 42 dias de idade; AV– aves SPF vacinadas no vigésimo primeiro dia de idade com a estirpe H120 e desafiadas aos 42 dias de idade com estirpe variante IBVPR-12 do VBI ANV – aves SPF não imunizadas e desafiadas com a estirpe variante IBVPR-12 aos 21 dias de idade; BNV - aves SPF não imunizadas e desafiadas com a estirpe M41 aos 21 dias de idade; ANVJ - aves SPF não imunizadas e desafiadas com a estirpe variante IBVPR-12 aos 2 dias de idade; C- aves SPF tradas com PBS (Controle negativo da infecção).

Ainda, no tocante às respostas imunes após o desafio com VBI, sabe-se que anticorpos locais contra esse vírus são indispensáveis para conferir proteção a galinhas submetidas a re-infecções. Estes anticorpos em conjunto com os linfócitos T citolíticos ou citotóxicos, foram bem demonstrados como uma “maquinaria imunitária” crucial na restrição e na eliminação do VBI pelas aves infectadas (COOK et al., 1992; GUO et al., 2008; MONDAL; NAQI, 2001; RAJ; JONES, 1997; TORO; FERNANDEZ, 1994). Sendo assim, nossos resultados corroboram com esses achados anteriores no que diz respeito a estes anticorpos locais, tendo em vista que as aves vacinadas e que eram portadoras de maiores níveis de anticorpos e também de células imunes de memória, foram capazes de restringir um maior dano tecidual,

bem como a replicação destes vírus, como demonstrado na análise histopatológica e de carga viral nas amostras de tecidos e órgãos que foram analisadas.

6.6.3. Perfil cinético dos anticorpos Anti-VBI IBVPR-12 do isótipos IgG no soro sanguíneo

Para se avaliar o perfil cinético da resposta imune cruzada frente a variante IBVPR-12, foi utilizada esta estirpe variante como antígeno na reação de S-ELISA-Con A. Quanto à avaliação cinética, nossos resultados, mais uma vez verifica-se que foram semelhantes aos descritos por Mocket e Darbyshire, 1981, no sentido de que a cinética das respostas imunes humorais induzidas após a vacinação contra o VBI, atinge as máximas intensidades dos anticorpos antivirais específicos do isotipo IgG no soro sanguíneo de aves vacinadas com aproximadamente 21 dias após a vacinação.

No entanto, é possível observar na Figura 13, que a concentração de anticorpos anti-VBI do isótipo IgG presente no soro sanguíneo foi maior para a estirpe homóloga (IBVPR-12) do que para a estirpe heteróloga (M41) nos grupos desafiados com a variante IBVPR-12, enquanto que os grupos desafiados com a estirpe M41 apresentaram um menor nível de anticorpos do isótipo IgG para a estirpe IBVPR-12.

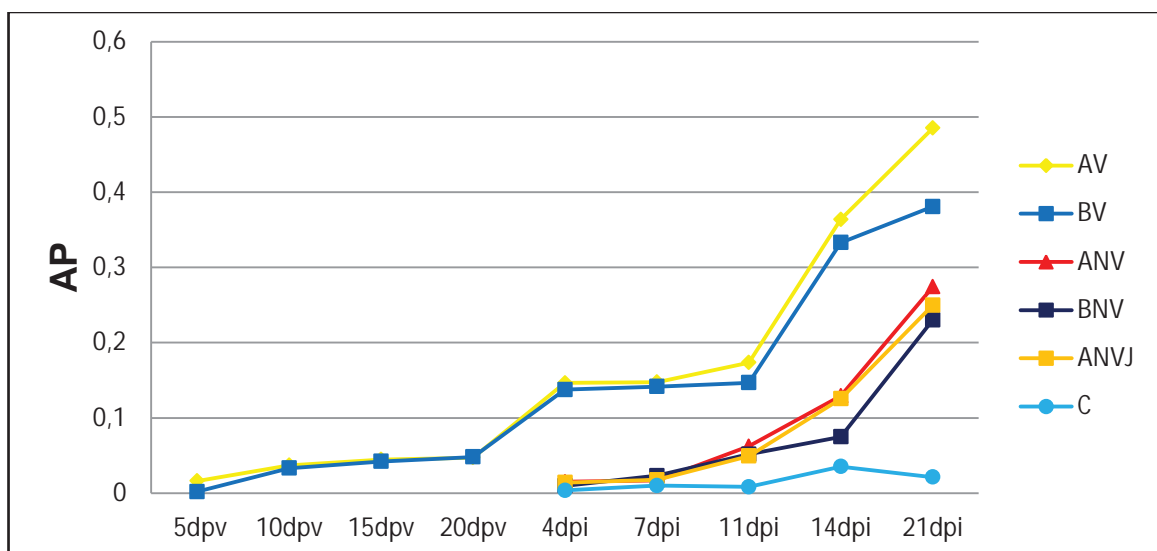


Figura 13. Perfil cinético (médias) da produção de anticorpos do isótipo IgG anti-VBI IBVPR-12 detectados pelo SELISA-Con A nas amostras de soro das aves nos diferentes dias pós-vacinação (dpv) ou pós-infecção (dpi).

Estes resultados reafirmam que o nível de proteção cruzada tende a diminuir a medida que a identidade de aminoácidos entre as glicoproteínas da espícula diminuem entre diferentes estirpes do VBI (Gelb et al., 2005). Com isso, podemos concluir que o direcionamento da síntese de anticorpos são primordialmente baseados nos antígenos de superfície (S) do VBI, perfazendo uma menor reatividade contra antígenos heterólogos, mesmo após a vacinação.

6.7. Quantificação absoluta da replicação viral

6.7.1. Construção da curva padrão para quantificação absoluta da replicação viral

A equação gerada a partir da análise de regressão linear feita com os dados obtidos a partir da técnica de RT-PCR quantitativa em tempo real com diferentes concentrações do gene S1 inserido no DNA plasmidial foi $y = -0,3191x + 10,98$ com correlação (r) = 0,992 (Figura 14). Foi verificado, nessa análise, que a linearidade foi mantida por, no mínimo, seis ordens de magnitude e, usando-se o coeficiente angular da equação linear, a eficiência do teste foi estimada em 108,49%. O desvio padrão dos valores de C(T) obtidos para cada reação a partir de nove corridas independentes variou de 0,11 a 1,40 ciclos.

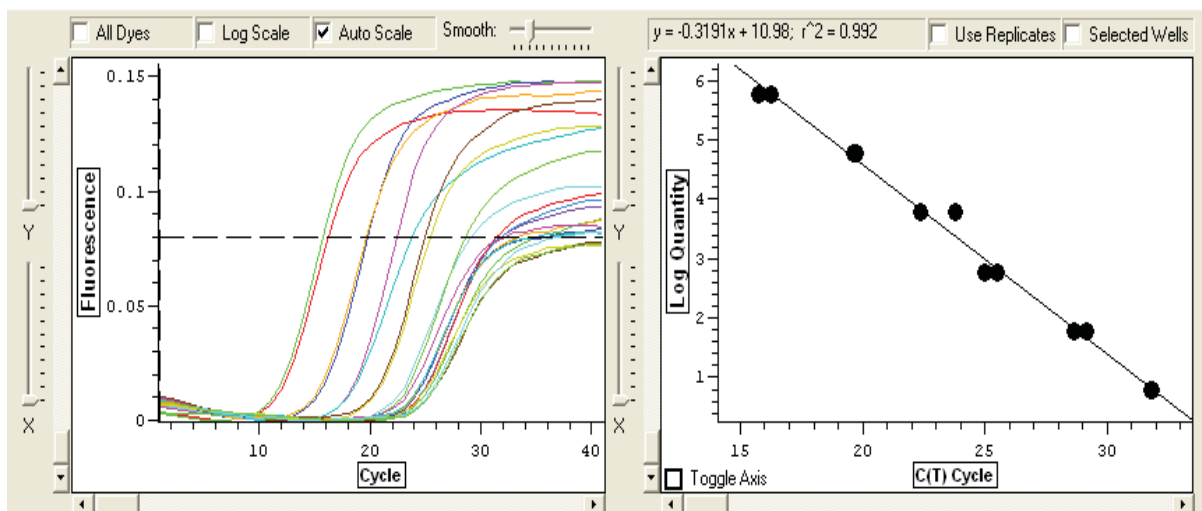


Figura 14. Curva padrão gerada com uso dos valores de C(T) vs. Log_{10} das diluições seriadas de razão 10 (10^{-4} a 10^{-9}) do DNA plasmidial correspondente ao gene S1 do VBI. A eficiência da reação foi de 108,49%, estimada com base no coeficiente angular da reta como indicado pela fórmula.

6.7.2. Quantificação absoluta da replicação viral em diferentes órgãos

Com respeito à avaliação da replicação viral em diferentes órgãos e correspondentes a cada um dos intervalos após a infecção, ou mais especificamente a carga viral contida nos órgãos analisados, constata-se que a maior carga viral apresentada foi na traqueia das aves do grupo não vacinado desafiado com a estirpe M41, no quarto dpi (Figura 15 A). Este resultado confirma o tropismo respiratório mais acentuado desta estirpe do VBI. Ainda neste contexto, pode-se observar que no mesmo período pós-infecção deste grupo, as amostras de pulmões destas aves também demonstraram maior quantidade deste vírus em relação às amostras obtidas de qualquer dos outros grupos analisados (Figura 15 B). Com relação a detecção viral nos rins das aves desafiadas com a estirpe M41, apenas foi aferida a presença do vírus em uma ave no sétimo dpi e uma ave no décimo primeiro dpi, ambas não vacinadas. Porém a carga viral presente nestes animais não ultrapassou $1 \log_{10}$ (Figura 15 C). Tal dado reafirma a mínima tendência de tropismo para o tecido renal desta estirpe, bem como a incapacidade lesiva a este órgão.

Ainda, com respeito ao grupo desafiado com a estirpe M41, nota-se uma diferença marcante no número de cópias virais presentes na traquéia dos grupos vacinados e não vacinados no quarto dpi. As aves vacinadas demonstraram ainda capacidade de eliminar o vírus mais precocemente no vigésimo primeiro dpi, enquanto que as aves não vacinadas persistiam com cargas virais mais elevadas nesse mesmo intervalo pós-desafio. Esses resultados permitem inferir que a vacina H120 foi eficiente na estimulação e desenvolvimento de células de memória contra uma estirpe virulenta (M41) de sorotipo homólogo Massachusetts. Já o grupo desafiado com a estirpe IBVPR-12, apresentaram nas amostras da traqueia colhidas no 4ºdpi, quantidades do VBI, mensurada como número de cópias de DNA plasmideal contendo o inserto do gene S1, muito semelhantes às quantidades detectadas no grupo vacinado nesse mesmo intervalo pós-desafio. Além disso, ambos os grupos desafiados com a IBVPR-12 eliminarem o VBI no mesmo período (Figura 15 A). Há de se levar em conta que a carga viral contida nas traquéias do grupo BNV foi maior que a do grupo ANV, indicando que mesmo com a menor carga

viral na traqueia desenvolvida pela variante, a imunidade desencadeada pela vacina não foi eficiente para impedir alta replicação viral na traqueia destas aves, como demonstrado na Figura 15 A. A carga viral contida na traqueia das aves dos grupos ANV e AV são muito semelhantes até a eliminação do vírus no vigésimo primeiro dpi.

Apesar dos resultados observados na avaliação da carga viral na traqueia, a variante IBVPR-12 desenvolveu elevada replicação viral nos pulmões das aves não vacinadas e manteve sua presença neste órgão até o período final do experimento no vigésimo primeiro dpi (Figura 15 B). Ao se analisar a quantidade da variante do VBI nas amostras de rins provenientes dos grupos ANV e AV, verifica-se que não houve diferença significativa entre eles. Esses resultados reforçam as indicações da ineficiência da vacina formulada com a estirpe H120 do sorotipo Massachusetts em conferir proteção dos tecidos que não compõem o sistema respiratório contra uma variante do VBI como a IBVPR-12. Em uma observação mais aprofundada, nota-se que a maior carga viral nos rins ocorreu no décimo primeiro dpi, que é um intervalo imediatamente após a detecção da maior concentração dessa variante do VBI que foi detectada nos pulmões das aves apenas desafiadas. Assim como observado na figura 15 A, B e C, o comportamento de replicação dessa variante do VBI parece indicar que os órgãos do sistema respiratório servem apenas como porta de entrada e para uma fase inicial de replicação viral, devido ao fato de que depois do sétimo dpi a presença do vírus neste sistema regrediu linearmente, enquanto a replicação nos rins ascendeu de forma a manter altas concentrações até o vigésimo primeiro dpi.

Todos esses achados podem ser explicados ao menos em parte pela variabilidade da glicoproteína S desta variante do VBI. Assim como demonstrado por Casais et al. (2003), ao gerar um vírus recombinante da bronquite infecciosa (BeaudetteR-M41-S), no qual a região de ectodomínio do gene S do VBI M41-CK substituiu a região correspondente do genoma do VBI BeaudetteR-M41-S, este vírus recombinante adquiriu a capacidade de tropismo para as mesmas células que o VBI M41-CK tem em sua forma natural, demonstrando que a glicoproteína S é um dos determinantes do tropismo celular. O que em partes, pode suportar a teoria da variabilidade das características fenotípicas da variante IBVPR-12, no que diz

respeito ao tropismo, em função das alterações genéticas dentro do gene codificador da glicoproteína de superfície S, grande responsável pela replicação e tropismotecidual do VBI (Casais et al. 2003).

Apesar de nem sempre altos títulos virais do VBI em determinados tecidos não demonstrarem quadros de patogenicidade, assim como demonstrado por Ambali et al. (1990), a estirpe aqui estudada além de apresentar elevada carga viral em outros órgãos em adição aqueles do sistema respiratório, também foram capazes de desenvolver lesões nesses mesmos órgãos, como será melhor explanado nas análises histopatológicas feitas nos tópicos subsequentes.

Embora o número de cópias virais nas tonsilas cecais terem-se apresentados em magnitudes inferiores aquelas encontradas nos demais órgãos testados, foram observados resultados interessantes, pois poucos estudos têm-se detido em analisar mais pormenorizadamente a quantificação viral neste órgão. O pico de carga viral nas tonsilas foi alcançado pelo grupo ANV com sete dpi e a carga viral se manteve alta até o décimo quarto dpi, regredindo a níveis próximos de zero, no vigésimo primeiro dpi (Figura 15 D). Já o grupo AV, iniciou com cargas virais menores até o sétimo dpi, as quais se elevaram até o décimo primeiro dia, até que por fim regrediram até níveis próximos a zero, indicando a eliminação do vírus de desafio. A presença do VBI na tonsila pode estar associada ao estado de latência no hospedeiro, devido à eliminação do patógeno durante longos períodos após a infecção. Owen et al, 1991, demonstraram a replicação viral nos tecidos da parte inferior do tubo digestivo em células semelhantes a histiócitos e células linfóides nas tonsilas cecais. Até o momento, não se sabe sobre a persistência viral na tonsila cecal ou no intestino de aves infectadas com variantes do VBI, o que torna intrigante o conhecimento da ação e estado de eliminação dessas estirpes variantes do VBI do organismo hospedeiro.

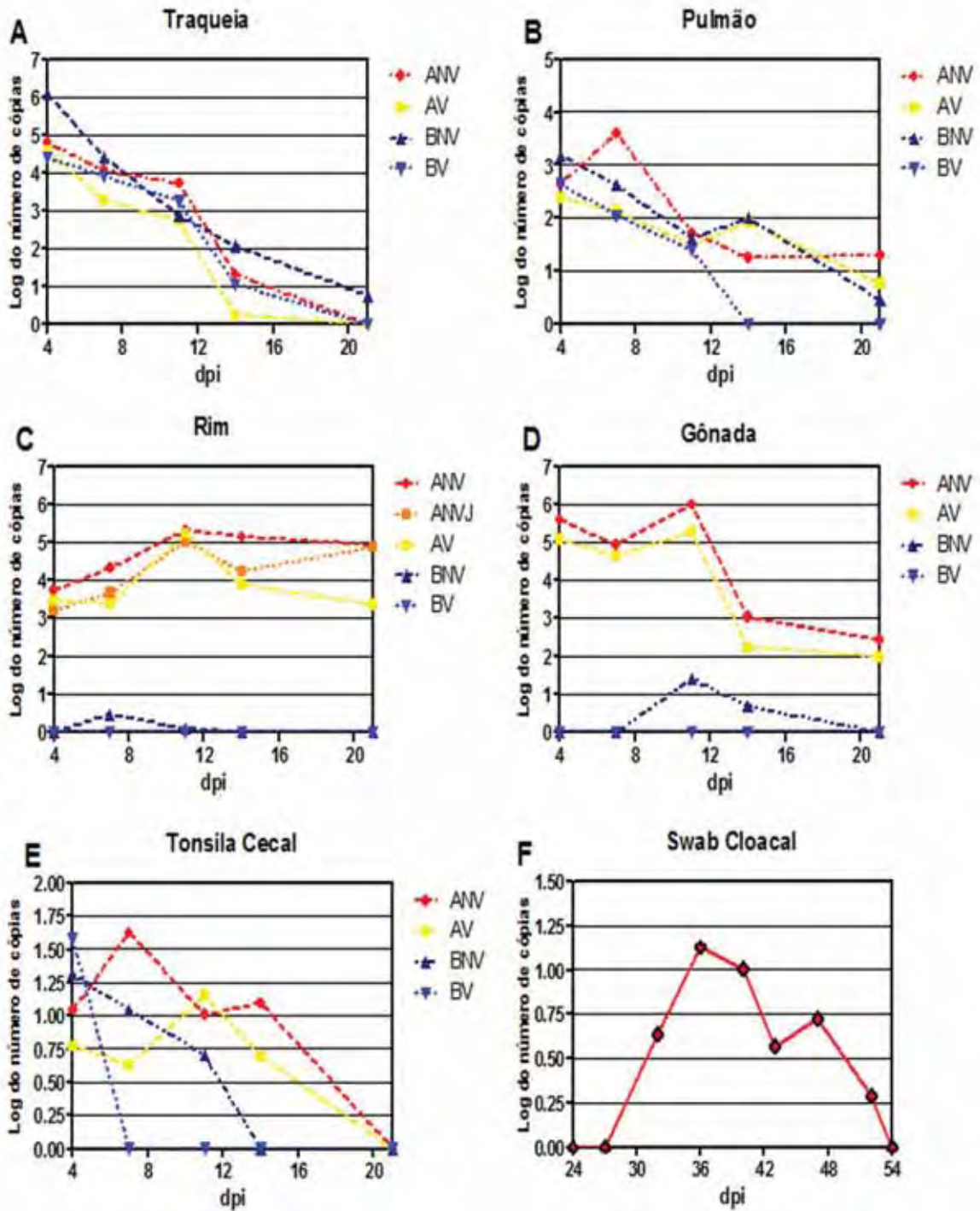


Figura 15. Número de cópias do gene S1 do VBI (Log_{10}) detectados nas traqueias (A), pulmões (B), rins (C), gônadas (D), tonsilas cecais (E) e suabes cloacais (F) das aves dos grupos ANV, ANVJ, AV, BNV e BV nos diferentes intervalos pós-desafio.

Os resultados mais interessantes observados referem-se, entretanto, à carga viral detectada nas gônadas das aves desafiadas com a estirpe variante IBVPR-12, tanto o grupo vacinado quanto o não vacinado. Pode-se notar na Figura 15, E, que no quarto dpi, os testículos e ovários atingiram uma elevada replicação viral, a qual se assemelhou à carga viral encontrada nas traqueias das aves desafiadas com a estirpe M41 neste mesmo intervalo. Essa replicação viral atingiu ainda uma maior carga viral no décimo primeiro dpi, e caiu pela metade no décimo quarto dpi. Ainda mais interessante foi que a carga viral nas gônadas se mantiveram elevada, entre $2 \log_{10}$ e $3 \log_{10}$ até o final do experimento, mesmo no grupo previamente vacinado e desafiado com a estirpe IBVPR-12.

Com relação ao grupo não vacinado e desafiado com a estirpe M41, uma ave demonstrou baixa carga do vírus apenas no décimo primeiro e décimo quarto dpi, sendo que não foi detectada presença viral nas gônadas do grupo vacinado.

Desde a primeira vez que a forma respiratória da bronquite infecciosa foi relatada na década de 1930 (FABRICANT, 1998), estirpes nefropatogênicas, enterotrópicas e estirpes que possuem afinidade para o sistema reprodutor têm sido descritos (ALBASSAM et al., 1986; AMBALI; JONES, 1990; CAVANAGH; NAQI, 2003). No entanto, ao contrário de estudos anteriores onde foi encontrado dano renal grave (BUTCHER et al., 1990; CHEN et al., 1996) ou de alterações no sistema reprodutor (CRINION & HOFSTAD, 1971), foram relatadas após infecção por M41; em nosso estudo foi detectada apenas uma presença mínima da estirpe M41 em outros órgãos que não a traqueia e o pulmão, bem como não houve lesões notáveis nestes outros órgãos.

Nossos resultados indicam que a variante brasileira do VBI ora investigada apresenta uma abrangência de comportamento e predileção de infecção para outros tipos celulares, tais como os que compõem os rins e as gônadas. A alta carga viral nestes tecidos não se baseia apenas na alteração de patogenicidade, mas também pela seleção de células mais vulneráveis a infecção por essa variante do VBI, devido, muito provavelmente a um mecanismo de escape desenvolvido pelo IBVPR12. O VBI infecta primeiramente as células epiteliais da traqueia, que serve de porta de entrada e replicação primária. Estes vírus encontram ambientes variados no hospedeiro e então podem entrar em um processo de tropismo e resistência nas

células epiteliais renais e do sistema reprodutor. Toro et al. (2010), após infectar galinhas com a estirpe Ark, isolou populações geneticamente diferentes da estirpe Ark do organismo de uma mesma ave infectada experimentalmente, indicando que este vírus passa por um processo de ajuste fenotípico, no curso de sua replicação dentro do hospedeiro, o que acarreta a diferenciação no tropismo celular e a possível manutenção da carga viral nestas células, a ponto de a população conhecida ser menor do que as novas populações que surgiram dentro hospedeiro. Esta descoberta indicou que uma subpopulação distinta de vírus foi rapidamente selecionada positivamente pelo trato respiratório superior de galinha. A propósito e para reforçar essa hipótese, os vírus que possuem seu genoma composto por RNA, tal como os coronavírus, podem alterar seus antígenos por mutações pontuais ou por rearranjo dos genomas; devido a pressão de seleção encontrada no microambiente (DOMINGO, 2006). Estes vírus podem ser alvos de anticorpos ou células T, e devido à alteração antigênica, podem se tornar resistentes à imunidade gerada na população por infecções prévias.

Outro fator que ajuda a explicar a capacidade do VBI se replicar no sistema respiratório, intestinal e outras células epiteliais pertencentes a estrutura de diferentes órgãos do hospedeiro, é que o VBI seja dependente do ácido N-acetilneuramínico (ácido siálico) presente na superfície da célula. Estudos de hemaglutinação por VBI demonstraram o papel do ácido neuramínico no processo de ligação. Além disso, o VBI é ligado preferencialmente quando a ligação do ácido neuramínico às membranas celulares (SCHULTZE et al., 1992). Estudos mais recentes confirmaram que $\alpha 2,3$ - ligado ao ácido N-acetilneuramínico é também preferencialmente utilizado pelo VBI para fixação às células hospedeiras nas quais o vírus possui tropismo (WINTER et al., 2006). Neste mesmo estudo, foi demonstrado que o número de células infectadas foi bastante reduzido quando as células não foram tratadas com neuraminidase de *Vibrio cholerae*. Em segundo lugar, foi demonstrado que os tipos de células que eram suscetíveis à estirpe do VBI Beaudette possuíam ácido $\alpha 2,3$ -N-acetilneuramínico ligada às células. Ao contrário disso, as linhagens celulares não tratadas com a neuraminidase não apresentaram susceptibilidade à infecção pelo VBI. Embora a afinidade para $\alpha 2,3$ -N-acetilneuramínico ajude a explicar tropismo tecidual do VBI no hospedeiro, este fator

não parece ser o único determinante de susceptibilidade, pois esta substância está presente em células que não estão infectadas pelo VBI.

Trazendo para o nosso contexto, pode-se imaginar que as alterações genéticas nas variantes do VBI estão relacionadas ao aumento da afinidade para certos receptores celulares de superfície. No caso da variante IBVPR-12 por ser uma variante do gene S1, pode ter ocorrido variações pontuais que aumentaram a predileção e afinidade para as células renais e do sistema reprodutor. Isso tudo poderia ser melhor avaliado se houvesse uma descrição dos receptores celulares presentes nestas células, e aí então poderiam ser correlacionados estes fatores de forma independente.

Em vista de todo o exposto, é possível questionar a origem da variante IBVPR-12, podendo esta ter sua população ancestral semelhante às estirpes vacinais utilizadas no Brasil, as quais sofreram alterações genéticas ocasionadas pela seleção natural no hospedeiro para dar origem a essa variante do VBI. Sendo assim, é muito difícil controlar o surgimento de variantes genéticas do VBI, bem como o prever as características de tropismo e patogenia desenvolvida por essas novas variantes virais. No entanto, o presente estudo pode contribuir de maneira ímpar na compreensão de propriedades biológicas desse vírus no Brasil, além de poder oferecer novos conhecimentos para o futuro desenvolvimento de vacinas formuladas com as estirpes variantes mais predominantes no Brasil e avaliar de forma mais acurada a eficiência dessas vacinas contra as estirpes do VBI mais prevalentes nas criações avícolas do Brasil.

6.7.3. Avaliação da persistência da estirpe IBVPR-12 através da detecção viral em amostras de suabe cloacal

Para avaliar a persistência da variante IBVPR-12 nas aves desafiadas (não vacinadas), foi realizada a coleta de swabs cloacais durante 62 dias após o desafio, sendo coletados nos intervalos de 24, 27, 32, 36, 40, 43, 47, 52, 54, 58, 62 dpi.

Assim como demonstrado na Figura 20, foi possível detectar a presença viral entre o 32^o e 52^o dpi. Ainda que a eliminação viral após a fase aguda parece ser intermitente, pois foi constatado que no 24^o e 27^o dpi as aves apresentaram ausência viral nos suabes cloacais. Isto pode ter ocorrido devido a ausência da

eliminação viral pelas fezes durante estes intervalos, uma vez que neste período as aves apresentaram a maior concentração sérica de IgG, o que sugere a neutralização do vírus e ausência de excreção fecal desse agente. Há de se notar também que a completa ausência viral veio a acontecer no 54^o dpi, uma vez que esse vírus não foi mais detectado até o 62^o dpi, revelando uma provável eliminação desse vírus pelo hospedeiro.

A presença do VBI pôde ser detectada em períodos de 4 a 7 semanas após o desafio. A detecção de VBI no período de até 4 semanas após o desafio pode estar relacionada à excreção e circulação dos vírus, conforme demonstrado em relatos anteriores, obtidos do monitoramento da excreção do vírus vacinal em lotes comerciais (MATTHIJS et al., 2003).

Um estudo anterior destaca que resultados positivos na detecção do VBI que forem encontrados após 4 semanas da vacinação devem ser relacionados à presença de variantes ou ainda a uma nova circulação do vírus vacinal nos plantéis (TORO, 2010). No entanto as aves utilizadas em nosso estudo para avaliação da persistência não foram vacinadas, indicando que este vírus possui uma persistência por um tempo relativamente prolongado no hospedeiro, sugerindo que estas características podem ter sido adquiridas por alterações genotípicas que tenham ocorrido nessa variante do VBI e que podem estar conferindo uma maior capacidade de persistência a esse vírus.

Ademais, um estudo anterior demonstrou que galinhas SPF, mantidas em isoladores, quando desafiadas com a estirpe virulenta M41 do VBI, podem apresentar excreção viral por até 63 dpi, a qual foi detectada em amostras de suabe cloacal e traqueal (NAQI et al., 2003). Ainda, esses autores relataram que essas aves podem manter esse vírus no baço, gônadas, rins, pulmões, tonsila cecal e bursa de Fabricius por até até 163 dpi (NAQI et al., 2003).

Outro fato interessante reportado por Naqi et al. (2003) é que aves dotadas de anticorpos contra a estirpe M41 do VBI previamente ao desafio com essa mesma estirpe, apresentaram eliminação viral por via traqueal e cloacal até 77 dpi, porém o vírus foi detectado em apenas uma das aves desafiadas nas amostras de pulmão e rim até o 175^o dpi. Esses mesmos autores, em razão desses achados, sugerem que

a presença de anticorpos durante a infecção protege os órgãos internos de infecção pelo VBI.

Em vista disso tudo, verifica-se que os nossos resultados demonstrando a presença do isolado IBVPR-12 em suabes cloacais até 54 dpi em aves SPF experimentalmente infectadas, apresentam similaridade com os obtidos no estudo de Naqi et al. (2003) com a estirpe M41, com a diferença de que não foi avaliada em nosso estudo a persistência e a eliminação viral nos órgãos internos, nem o comportamento desses parâmetros em aves previamente vacinadas.

6.8. Imuno-histoquímica

6.8.1. Análise imuno-química pela técnica de “Western blotting” do antissoro de cabra anti-proteína N recombinante do VBI

A análise pela técnica de “Western blotting” da especificidade do antissoro de cabra anti-proteína N recombinante do VBI foi testada contra as preparações antigênicas concentradas das estirpes M41, IBVPR-05 e IBVPR-12 concentradas com PEG. Os resultados revelaram a reatividade desse antissoro, apenas com as bandas correspondentes às da proteína N com peso molecular de cerca de 54 kDa, de todas as três estirpes do VBI testadas (vide setas Figura 16).

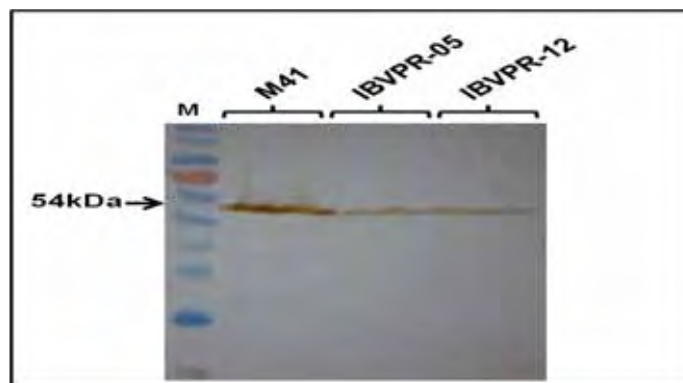


Figura 16. Membrana de western blotting com soro policlonal de cabra anti Nr/ VBI, demonstrando a reatividade do antissoro produzido contra a proteína N do VBI frente a uma estirpe de referência vacinal e mais dois diferentes isolados de campo desse mesmo vírus. Todas as amostras foram concentradas com PEG. Na canaleta 1, 7 µl do marcador de peso molecular de proteína (Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder, Thermo Scientific); na canaleta 2, a estirpe de referência vacinal M41; na canaleta 3, o isolado de campo do VBI IBVPR-05; e na canaleta 4 o isolado de campo IBVPR-12.

Em vista desses resultados da técnica de “Western blotting” (Figura 16), foi evidenciado que a proteína recombinante N do VBI clonada a partir do gene N da estirpe M41 do VBI e expressa por Gibertoni et al. (2010) em *E. coli* apresenta elevado grau de homologia antigênica com relação às proteínas N derivadas de preparações concentradas das estirpes homóloga (M41) e heterólogas (IBVPR-05 IBVPR-12) do VBI, já que o soro policlonal de cabra hiperimunizada com a proteína N recombinante do VBI reagiu com a fração da proteína N desses diferentes isolados do VBI e também com a N recombinante. Dessa forma, pode-se considerar que o soro policlonal produzido em cabra com proteína N recombinante do VBI, aqui produzido, tem atributos satisfatórios para ser aplicado em técnicas de imunodiagnóstico para o VBI, e em nosso caso por imuno-histoquímica. Essa reatividade cruzada era de certa forma esperada para anticorpos poli ou monoclonais contra a proteína N do VBI, uma vez que o gene codificador dessa proteína é bastante conservado entre várias estirpes desse vírus e essa proteína é bastante imunogênica, além de ser produzida em grande quantidade nos processos infecciosos causados por esse vírus (NDIFUNA et al., 1998). Nesse sentido, verifica-se também na literatura que predominam publicações sobre a detecção do VBI por técnicas imuno-histoquímicas, usando anticorpos monoclonais contra a proteína N desse vírus (revisado por DE WIT, 2000).

6.8.2. Detecção do VBI em tecidos por Imuno-histoquímica

A utilização do anticorpo policlonal produzido em cabra imunizada com a proteína N recombinante do VBI se mostrou sensível e específica, para detecção do VBI em amostras de tecidos colhidos de aves experimentalmente infectadas, proporcionando a exploração dessa técnica em um formato de aplicação diferente daquele mais frequentemente usado e descrito na literatura, e no qual são empregados diferentes preparações de anticorpos monoclonais contra o VBI que requerem o uso de cortes histológicos obtidos por congelamento, não permitindo a utilização de cortes teciduais incluídos em parafina. Isso representa, por conseguinte, uma limitação de tais tipos de anticorpos monoclonais, além do custo elevado de algumas poucas preparações comerciais que se encontram disponíveis,

devida a laboriosa tarefa de se manter culturas de celulares compostas por hibridomas monoespecíficos para síntese destes anticorpos.

A análise dos resultados da técnica imuno-histoquímica revela que nas células que apresentaram a presença de antígenos do VBI, o citoplasma celular foi marcado com a cor marrom, devido ao cromógeno DAB. Não foi evidenciada a presença de antígenos do VBI no citoplasma das células traqueais e renais dos tecidos das aves mantidas como controle negativo. Porém, houve uma leve marcação inespecífica demonstrada como “fagulhas” amarronzadas na cartilagem das traqueias das aves do controle negativo, o que, entretanto, não trouxe nenhuma confusão maior quanto a análise da especificidade, pois a marcação foi meramente inconstante e não marcou o citoplasma celular.

Todas as traqueias dos grupos desafiados e/ou e vacinados e desafiados com o VBI demonstraram a presença do VBI no citoplasma das células epiteliais da mucosa, variando somente em relação à intensidade e ao número de células marcadas para a presença antigênica. As traqueias que apresentaram maior intensidade de marcação foram as pertencentes ao grupo desafiado com a estirpe M41 com quatro dpi, o que concorda com os resultados obtidos pela quantificação absoluta da replicação viral neste órgão. No entanto, não foi estabelecida uma contagem de células positivas em relação aos grupos e aos diferentes intervalos, sendo estes resultados meramente subjetivos. Há de se salientar que o objetivo da aplicação da IHQ neste trabalho foi a sua padronização e a identificação topográfica do VBI em cada órgão avaliado. A Figura 17 A representa a traqueia de ave incluída no grupo ANV com sete dpi, onde há marcação das células epiteliais de mucosa e células em processo de hiperplasia. Um fator que demonstra o sucesso desta técnica como alternativa de diagnóstico, foi que a detecção do VBI na traqueia se deu até o décimo quarto dpi, período este em que o número de cópias detectadas por PCR quantitativa estava chegando ao fim, chegando a pouco mais de 1 em \log_{10} .

Com relação ao pulmão, as células apresentando marcação para o VBI foram detectadas até o sétimo dpi em todos os grupos. De modo geral, as marcações foram restritas as células que revestem os parabronquios (pneumócitos). A Figura 17, B mostra um corte histológico de pulmão de ave do grupo ANV com sete dpi,

resultados semelhantes aos obtidos por Kapczynski et al. (2002). Podemos observar que há presença de infiltrado inflamatório ao redor dos pneumócitos infectados com o VBI, sugerindo com isso, que a migração das células de defesa segue um gradiente quimiotático ao local específico onde está o sítio de infecção bem como a maior concentração de mediadores quimiotáticos para células inflamatórias. Miura et al. (2007), utilizando como modelo experimental um coronavírus de rato, destacou que células alveolares infectadas induzem uma maior produção de CINC-2, CINC-3 e LIX, mediadores quimiotáticos para neutrófilos, e ao mesmo tempo, induzem de maneira parácrina as células alveolares a produzirem fatores quimiotáticos. Este evento, embora não devidamente avaliado no estudo em apreço, pode estar relacionado com a quantidade de células de defesa presentes ao redor do sítio infectado.

Assim como os resultados obtidos pela técnica de PCR em tempo real, não foi detectada a presença viral nos rins das aves desafiadas com a estirpe M41. Porém, todas as amostras testadas dos grupos ANV e AV demonstraram a presença de antígenos do VBI em suas células tubulares, principalmente no interstício (Figura 17, C). Sabe-se que o VBI infecta principalmente os néfrons e as células do ducto coletor, e ainda podem ser encontrados nos túbulos contorcidos distais e a alça de Henle (CHEN et al., 1996). A estirpe variante testada neste estudo foi capaz de infectar de maneira difusa o tecido renal, principalmente as células constituintes dos túbulos contorcidos distais e proximais. No entanto, não foi evidenciada a infecção das células epiteliais da alça de Henle. Como foi demonstrado anteriormente, a carga viral nos rins seguiu um perfil constante de número de cópias até o vigésimo primeiro dia, o que parece explicar a razão de não ter havido diferença na intensidade de células infectadas demonstradas por IHQ. Algumas estirpes isoladas e caracterizadas podem possuir elevados títulos virais em determinados órgãos e mesmo assim não desenvolvem lesões evidentes (AMBALI & JONES, 1990). Essa situação, porém, não foi encontrada em nosso estudo, pois esta estirpe variante demonstrou alta capacidade de replicação nos rins, bem como desenvolveu lesões moderadas e estimulou a infiltração de células inflamatórias. A técnica de IHQ confirma essa atividade patogênica dessa variante do VBI, sobretudo no que se

refere ao comportamento invasivo e de infecção apresentado por essa nova variante isolada de campo.

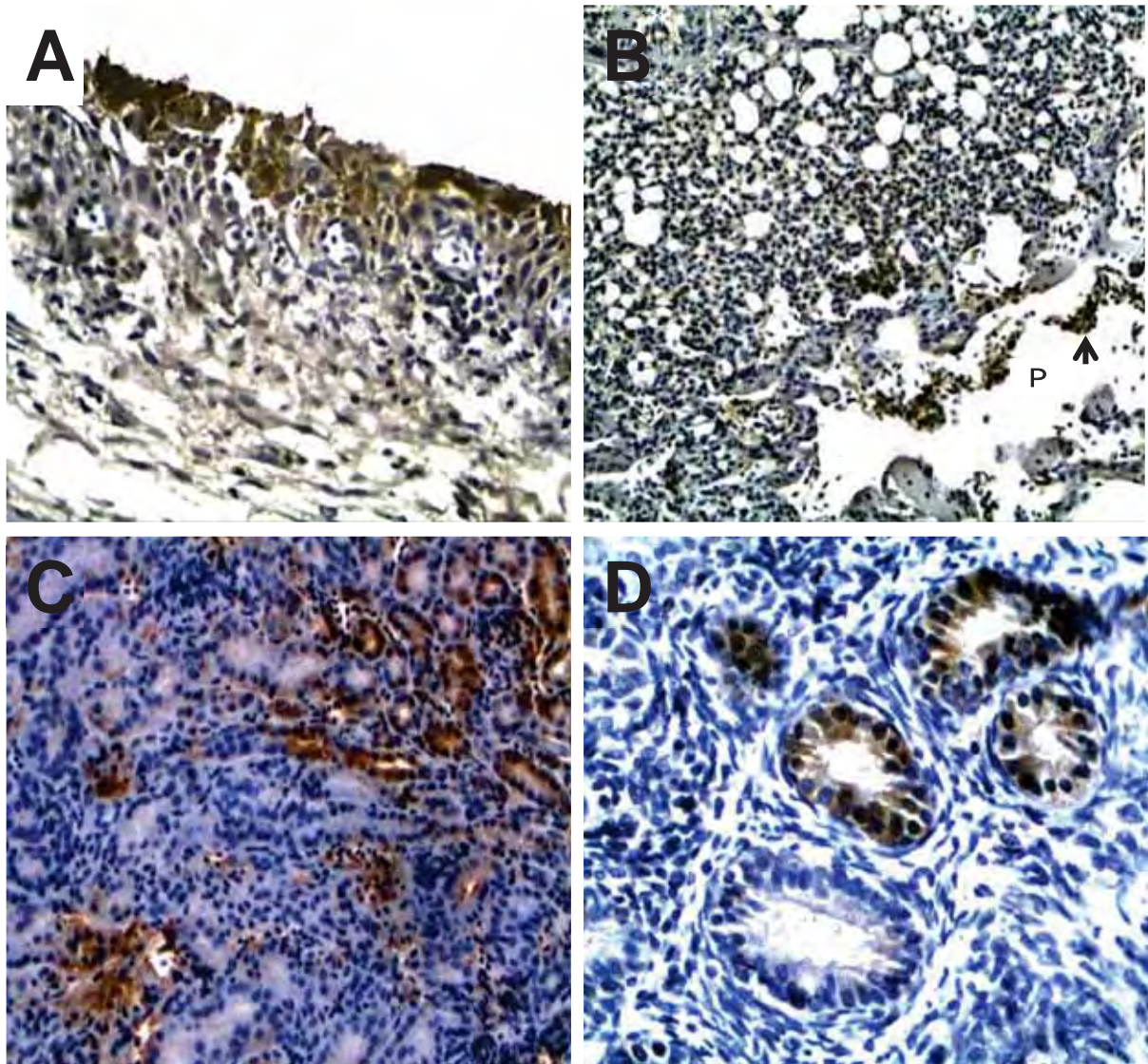


Figura 17. A. Fotomicrografia de traqueia de ave do grupo ANV com sete dpi; células epiteliais da mucosa demonstrando presença da variante IBVPR-12 no citoplasma (obj. 20x). B. Pulmão de ave do grupo ANV com sete dpi; nota-se marcação antigênica (seta) dos pneumócitos na periferia de um parabronquio (PA) com leve infiltrado linfoplasmacelular ao redor (obj. 10x). C. Rim de ave correspondente ao grupo ANV com sete dpi; em marrom – células epiteliais tubulares com citoplasma marcado (obj. 20x). D. Testículo de ave do grupo AV com onze dpi, demonstrando presença do VBI no citoplasma das células tubulares dos túbulos seminíferos. É possível observar um túbulo isento de marcação, demonstrando grande especificidade da técnica (obj. 40x). Polímero ligado a peroxidase.

Até o momento não há relatos sobre a detecção do VBI por IHQ em testículo de galos. Nosso trabalho faz uma contribuição relevante no estudo da patogenia de uma variante do VBI ao demonstrar a detecção deste patógeno no testículo das aves vacinadas e desafiadas e também de aves apenas desafiadas com a variante IBVPR-12. Em ambos os grupos, a presença viral se restringiu às células epiteliais cúbicas, que são componentes do epitélio simples tubular dos túbulos seminíferos. A Figura 17 D retrata um fragmento de testículo de ave do grupo AV no décimo primeiro dia pós-infecção. Similarmente ao que ocorreu nos demais órgãos analisados, foi possível observar o infiltrado inflamatório ao redor dos túbulos seminíferos infectados pelo VBI. Pode-se também inferir que a vacinação com a estirpe Mass H120 não impediu o tropismo desta estirpe variante para os órgãos reprodutores das aves experimentalmente infectadas.

Ainda, com respeito à técnica de IHQ, ficou evidente a sua sensibilidade na detecção do VBI nesse órgão, sendo que mesmo com uma menor taxa de replicação viral no testículo das aves vacinadas foi possível detectar a presença desse vírus, o que indica que a vacina formulada com a estirpe H120 não induziu proteção efetiva contra a infecção por essa estirpe nesse órgão.

Com relação aos métodos convencionais para diagnóstico da BI, sabe-se que eles incluem o isolamento viral através da inoculação em ovos embrionados e titulação de anticorpos contra o VBI (LUKERT, 1980). Apesar de essas técnicas serem recomendadas como os principais métodos de diagnóstico laboratorial da BI, eles exigem intenso domínio da técnica e levam maior tempo, além de usualmente não fornecerem informações sobre a quantidade de vírus presente e sobre o tropismo viral para diferentes tecidos.

A técnica de IHQ traz então grandes benefícios para o diagnóstico da BI, já que permite a detecção de antígenos do VBI presentes em diferentes tecidos e em diferentes fases de infecção, e ainda reduz o trabalho laborioso e tempo para o diagnóstico quando comparado ao isolamento viral (NAQI, 1990; BENYEDA et al., 2009).

A IHQ é uma ferramenta comumente utilizada com o uso de anticorpos monoclonais para marcação de antígenos do VBI em membrana corio-alantóide e em diferentes tecidos de embriões fixados em parafina. Esta técnica foi padronizada

primeiramente para detecção do VBI em ovos previamente infectados com o sorotipo Massachusetts (M41) (NAQI, 1990). Estes métodos sugerem uma maior sensibilidade para detecção do VBI utilizando anticorpo monoclonal em relação ao antissoro policlonal, sugerindo ainda que a detecção do VBI por IHQ utilizando mAc, pode ser feita com uma menor dose infectante inoculada em ovos embrionados (ABDEL-MONEIN et al., 2009). Devido a escassez de estudos utilizando a aplicação da IHQ com anticorpos policlonais para o diagnóstico da BI e em aves adultas, este trabalho pôde demonstrar a aplicação desta ferramenta para detecção da estirpe M41 e de uma variante de campo. O método utilizado nesse trabalho com aplicação de anticorpo policlonal, foi capaz de detectar sítios antigênicos do VBI na traqueia, pulmão, tonsila cecal, ceco, testículo e rim, demonstrando ainda grande sensibilidade e especificidade antigênica. Como já era esperada, devido à capacidade de conservação e elevada imunogenicidade da nucleoproteína N do VBI, a aplicação deste anticorpo policlonal permitiu a detecção viral tanto para a estirpe de referência M41 quanto para a variante de campo. As diferenças encontradas quanto à presença do antígeno viral detectada pela técnica IHQ em diferentes órgãos colhidos de aves experimentalmente infectadas com cada uma dessas estirpes do VBI, possivelmente se deve às diferenças de patogenicidade entre elas, o que leva predileção e tropismo para diferentes órgãos e que nos incita, ainda mais, a investigar as características patogênicas desta estirpe variante do VBI isolada no Brasil.

Outro aspecto que vale salientar, é que quando comparada a técnica de IHQ para detecção do VBI com método de PCR em tempo real neste trabalho, os resultados demonstraram uma boa correlação entre essas técnicas, assim como foi demonstrado em uma correlação com a aplicação da IHQ com a técnica de PCR convencional (HANDBERG et al., 1999).

Sendo assim, pode-se concluir que o método de IHQ desenvolvido nesse estudo com o uso de anticorpos policlonais de cabra contra a proteína N recombinante do VBI não pode distinguir diferentes sorotipos, mas demonstrou alta sensibilidade e especificidade para detecção do VBI em aves infectadas experimentalmente. A técnica demonstrou ainda, fácil aplicação, menor tempo em

comparação aos métodos convencionais e baixo custo em comparação com a utilização de anticorpos monoclonais contra antígenos do VBI.

6.9. Análise de patotipo e protectotipo do isolado IBVPR-12

As aves correspondentes ao grupo vacinado com a estirpe H120 viva atenuada e posteriormente desafiada com a variante isolada de campo no Brasil do VBI, reportada como importante diferencial na variabilidade na replicação e tropismo pelo VBI, não atingiram uma imunidade satisfatória frente ao desafio com a estirpe variante IBVPR-12. Haja visto que, o vírus variante desenvolveu alto índice de replicação no sistema respiratório compreendido pela traqueia e pulmão (Figura 14, A e B, respectivamente) principalmente entre o quarto e décimo primeiro dpi. Estes dados conduzem a uma interpretação mais objetiva da habilidade desta estirpe em evadir-se da imunidade previamente adquirida pelas aves, pois possivelmente, a imunidade induzida pela vacinação com a estirpe H120 não desenvolveu reatividade cruzada suficiente com os principais antígenos dessa nova variante do VBI, especialmente a glicoproteína S1. Essa resposta imune menos efetiva, possivelmente permitiu que essa variante do VBI realizasse uma maior replicação, atingindo conseqüentemente altas cargas virais nos órgãos geniturinários, tais como gônadas e rins (Figura 15, D e C).

Além da habilidade de replicação e tropismo em órgãos distintos do trato respiratório, o isolado de campo IBVPR-12, ainda induziu grau leve a moderado de lesões para os rins (Figura 6 A) e para os testículos (Figura 7 A) respectivamente, das aves vacinadas. No conjunto, estes resultados levam-nos a considerar que essa estirpe variante é um patotipo e um protectotipo distinto do sorotipo Massachusetts, pois ao avaliar a efetividade da vacinação formulada com a estirpe H120 contra os desafios feitos, ou com a estirpe homóloga Mass M41, ou com a estirpe variante brasileira, verifica-se que a imunidade induzida pela vacinação foi suficiente para conferir uma proteção completa para impedir a patogenia pelo vírus homólogo (M41), mas não para a estirpe variante. Sendo assim, o presente estudo permitiu a caracterização de um novo protectotipo brasileiro muito provavelmente gerado pelas alterações genéticas no gene S1, que haviam sido identificadas (MONTASSIER et al., 2006, 2008).

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A estirpe IBVPR-12, previamente caracterizada como um genótipo variante brasileiro do VBI (MONTASSIER et al., 2006, 2008), após ter sido investigada em protocolos de infecção experimental em aves SPF vacinadas ou não, demonstrou amplo tropismo tecidual, tendo sido detectada por técnicas moleculares ou por IHQ em órgãos como traqueia, pulmão, rins, testículos, ovários e tonsila cecal, embora as quantidades mensuradas pela carga viral pela técnica de RT-PCR em tempo real, diferissem em cada um desses órgãos, tendo sido maior nos rins e nas gônadas, bem como as alterações patológicas tenham sido também de intensidades diversas em cada um desses órgãos, tendo sido menores na traqueia, tanto no que concerne à ciliostase, como à histopatologia desse órgão. Além disso, essa estirpe variante do VBI não pode ser classificada no mesmo prototipo das estirpes do sorotipo Massachusetts (H120 e M41), pois foi parcial a proteção induzida pela vacina atenuada H120 contra essa variante viral. O conjunto desses resultados caracterizou um novo patotipo e um novo prototipo do VBI, ressaltando a importância de que novos estudos sejam futuramente realizados com essa e com outras variantes do VBI que tenham sido isoladas de campo no Brasil.

8. CONCLUSÕES

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

- A estirpe variante isolada de campo no Brasil do VBI (IBVPR-12) é um patotipo diferente daquele apresentado pela estirpe M41 do VBI, revelando-se uma estirpe nefropatogênica e patogênica para o trato reprodutor e com um menor tropismo para o trato respiratório.
- A estirpe variante isolada de campo no Brasil do VBI (IBVPR-12) induz anticorpos sistêmicos e locais nas aves infectadas experimentalmente, os quais apresentam maior reatividade com a estirpe variante homóloga do que com a estirpe M41 heteróloga.
- A estirpe variante isolada de campo no Brasil do VBI (IBVPR-12) é um prototipo diferente daquele em que é classificada a estirpe Massachusetts (estirpe vacinal H120 do VBI), pois as aves vacinadas com essa última estirpe vacinal revelam proteção parcial, em termos de escores de ciliostase traqueal e de histopatologia traqueal e renal, bem como de cargas virais, quando desafiadas com a estirpe variante IBVPR-12 e, portanto as vacinas formuladas com estirpes Massachusetts não induzem proteção efetiva contra essa variante do VBI.

9. REFERÊNCIAS

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

ABREU, J. T., RESENDE, J. S., FLATSCHART, R. B., FOLGUERAS-FLATSCHART, A. V., MENDES, A. C., MARTINS, N.R., DILVA, C. B.; FERREIRA, B. M.; RESENDE, M. Molecular analysis of Brazilian infectious bronchitis field isolates by reverse transcription- polymerase chain reaction, restriction fragment length polymorphism, and partial sequencing of the N gene. **Avian Dis.**, v. 50, p. 494-501, 2006.

ALBASSAM, M. A., WINTERFIELD R. W.; THACKER H. L. Comparison of the nephropathogenicity of four strains of infectious bronchitis vims. **Avian Dis.**, v. 30, p. 468-476, 1986.

ALEXANDER, D. J.; GOUGH R. E. Isolation of avian infectious bronchitis vims from experimentally infected chickens. **Res. Vet. Sci.**, 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. **Res. Vet. Sci.**, London, v. 24, p. 228-233, 1978.

ALVARADO, I. R.; VILLEGAS, P.; MOSSOS, N.; JACKWOOD, M. W. Molecular characterization of avian infectious bronchitis virus strains isolated in Colombia during 2003. **Avian Dis.**, v. 49, p. 494-499, 2005.

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.

ANDRADE, L. F.; VILLEGAS, A. P.; FLETCHER, O. J.; LAUDENCIA, R. Evaluation of ciliary movement in tracheal rings to assess immunity against infectious bronchitis virus. **Avian Dis.**, v.26, n.4, p. 805-814, 1982.

ASSAYAG, M. S. Bronquite infecciosa das galinhas. In: SIMPÓSIO BRASIL SUL DE AVICULTURA 5., 2004, Chapecó, SC. **Anais.**, p. 43-46, 2004.

BANKFALVI, A; NAVABI, H.; BIER, B.; ET.; BÖCKER, W.; JASANI, B.; SCHMID, K. W. Wet autoclave pretreatment for antigen retrieval in diagnostic immunohistochemistry. **J Pathol.**, v. 174, n. 3, p. 223–228, 1994.

BHATTARCHARJEE, 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 Pathol.**, Cambs, v. 23, n. 1, p.471-480, 1994.

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 Pathol.**, v. 38, n. 6, p. 449-456, 2009.

BENYEDA, Z.; SZEREDI, L.; MATÓ, T.; SÜVEGES, T.; BALKÁ, G.; ABONYI-TÓTH, 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. **J. Comp. Path.**, v. 143, n. 4, p. 276-283, 2010.

BOX, P. G.; ROBERTS, B.; BERESFORD, A. V. Infectious bronchitis-preventing loss of egg production by emulsion vaccine at point-of-lay. **Dev. Biol. 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. **Rev. Bras. Ciên. Ávi.**, Campinas, v.12, n. 2, p. 121-124, 2010.

BRANDEN, R. C.; DA SILVA, E. N. Ocorrência de “nuevos” serotipos de bronquitis infecciosa en Brasil. In **Proceedings of VI Seminario Internacional de Patologia aviar**, 6., 1986, Athens, GA, USA.

BRONZONI, R. V. M.; MONTASSIER, M. F. S.; PEREIRA, G.T.; GAMA, N.M.; SAKAI, V.; MONTASSIER, H. J. Detection of infectious bronchitis virus and specific anti-viral antibodies using a concanavalin A-sandwich-ELISA. **Viral Immunol.**, v.18, n.3, p.569-578, 2005.

BUTCHER, G. D., WINTERFIELD, R. W.; SHAPIRO, D. P. Pathogenesis of H13 nephropathogenic infectious bronchitis virus. **Avian Dis.**, v. 34, p. 916-921, 1990.

CALLISON, S. A., JACKWOOD, M. W.; HILT, D. A. Molecular characterization of infectious bronchitis virus isolates foreign to the United States and comparison with United States isolates. **Avian Dis.**, v. 45, n. 2, p. 492-499, 2001

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. **J. Virol. Methods.**, Amsterdam, v.138, p. 60-65, 2006.

CNPSA. A produção de ovos no Brasil. Disponível em: www.cnpsa.embrapa.br/cias/index.php?option=com_content&view=article&id=15&Itemid=17. Acesso em 10 jan. 2013.

CAPUA, I.; GOUGH, R. E.; MANCINI, M.; CASACCIA, C.; WEISS, C. A “novel” infectious bronchitis strain infecting broiler chickens I Italy. **Zentralbla Veterinarmed Reihe Berlin.**, v. 41, p. 83-89, 1994.

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 Pathol.**, Cambs, v. 28, n. 5, p.587-92, 1999.

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 Rev. Res.**, 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. **Rev. Microbiol.**, v. 27, p. 64-69, 1996b.

CASAI, R.; DAVIES, M.; CAVANAGH, D.; BRITTON, P. Gene 5 of the avian coronavirus infectious bronchitis virus is not essential for replication. **J. Virol.**, London v. 79, p. 8065–8078, 2005.

CASAI, R.; DOVE, B.; CAVANAGH, D.; BRITTON, P. Recombinant avian infectious bronchitis virus expressing a heterologous spike gene demonstrates that the spike protein is a determinant of cell tropism. **J. Virol.**, London, v. 77, p. 9084–9089, 2003.

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

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

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

CAVANAGH, D.; NAQI, S. A. Infectious Bronchitis. In: (Ed) **Dis. Polt.** University Press, 2003. p. 101-119.

CAVANAGH, D. Coronavirus IBV: structural characterization of the spike protein. **J. Gen. Virol.**, v. 64, p. 2577-2583, 1983.

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, n. 1, p. 63-74, 1997.

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

CAVANAGH, D. Coronavirus avian infectious bronchitis virus. **Vet. Res.**, v. 38, n. 2, p.281-297, 2007

CHACON, J. L.; ASSAYAG, M. S; REVOLLEDO, L.; IVO, M.; PEDROSO, A. C.; VEJARANO, M. P.; FERREIRA, A. J. P. Pathogenic patterns in chicken challenged with variant strains of infectious bronchitis virus isolated from chickens flocks with defferent clinical manifestations. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON AVIAN CORONAVIRUS, 5. 1, 2009, Rauschholzhausen, Germany. **Proceedings...** p. 411-415, 2009.

CHEN, B. Y.; HOSI, S.; NUNOYA, T.; ITAKURA, C. Histopathology and immunohistochemistry of renal lesions due to infectious bronchitis virus in chicks. **Avian Pathol.**, v. 25, n. 2, p.269-283, 1996.

CHONG K.T. & APOSTOLOV K. The pathogenesis of nephritis in chickens induced by infectious bronchitis virus. **J. comp. Pathol.**, 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 bronquites using in situ hybridization and recombinant DNA. **Vet. Microbiol.**, Amsterdam, v. 24, n. 3, p.261-271, 1990.

COLLISSON, E. W.; PARR, R. L.; WANG, L.; WILLIAMS, A. K. An overview of molecular characteristics of avian infectious bronchitis virus. **Poult. Sci. Rev.**, v. 4, n. 1, p. 41-55, 1992.

COOK, J. K. Duration of experimental infectious bronchitis in chickens. **Res. Vet. Sci.**, 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. **J. Comp. Pathol.**, 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. **Arch. Virol.**, v. 50, p.109-118, 1976.

COOK, J. K. A. The classification of new serotypes of infectious bronchitis virus isolated from poultry flocks in Britain between 1981 and 1983. **Avian Pathol.**, v.13, n. 4, p. 733-741, 1984.

COOK, J. K. A.; OTSUKI, K.; DA SILVA MARTINS, N. R.; ELLIS, M. M.; HUGGINS, M. B. The secretory antibody response of inbred lines of chicken to avian infectious bronchitis virus infection. **Avian Pathol.**, v. 21, p. 681-692, 1992.

COOK, J. K. A.; ORBELL, S. J.; WOODS, M. A.; HUGGINS, M. B. Breadth of protection of the respiratory tract provided by different live-attenuated infectious bronchitis vaccines against challenge with infectious bronchitis viruses of heterologous serotypes. **Avian Pathol.**, v. 28, p. 477-485, 1999.

COOK, J. Coronaviridae. In: JORDAN, F.; PATTISON, M.; ALEXANDER, D.; FARAGHER, T. (Ed.). **Poultry diseases**. New York: WB Saunders, 2002. p. 298–306.

COOK, J. K. A.; CHESHER, J.; BAXENDALE, W.; GREENWOOD, N.; HUGGINS, N. B.; ORBELL, S. J. Protection of chickens against renal damage caused by a nephropathogenic infectious bronchitis virus. **Avian Pathol.**, Colchester, v. 30, n. 4, p. 423-426, 2001. Disponível em: <[http://dx.doi.org/ 10.1080/03079450120066421](http://dx.doi.org/10.1080/03079450120066421)>.

CRINION, R. A. P.; HOFSTAD, M. S. Pathogenicity of four serotypes of avian infectious bronchitis virus for the oviduct of young chickens of various ages. **Avian Dis.**, v. 16, n. 21, p. 351-363, 1971.

CUBILLOS, A.; ULLOA, J.; CUBILLOS, V.; COOK, J. K. A. Characterisation of strains of infectious bronchitis virus isolated in Chile. **Avian Pathol.**, v. 20, n. 1, p. 85-99, 1991.

CUMMING, R.B. Infectious avian nephrosis (uraemia) in Australia. **Aust. J. Vet.**, 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 vims. **Avian Dis.**, v. 14, p. 191-195, 1970.

CUNNINGHAM, C. H.; SPRING, M. P.; NAZERIAN, K. Replication of avian infectious bronchitis vims in African green monkey kidney cell line VERO. **J. Gen. Virol.**, v. 16, p. 423-427, 1972.

DARBYSHIRE, J. H.; PETERS, R. W. Humoral antibody response and Assessment of protection following primary vaccination of chickens with maternally derived antibody against avian infection bronchitis virus. **Res. Vet. Science.**, v.38, n. 1, p.14-21, 1985.

DAWSON, P. S.; GOUGH, R. E. Antigenic variation in strains of avian infectious bronchitis virus. **Arch. Gesamte Virusforsch.**, v. 34, p. 32-39, 1971.

DE VRIES, A. A. F.; HORZINEK, M. C.; ROTTIER, P. J. M.; DE GROOT, R. J. The genome organisation of the Nidovirales: similarities and differences between and coronaviruses. **Semin. Virol.**, San Diego, v. 8, p. 33–547, 1997

DE WIT, J. J. Detection of infectious bronchitis virus. Technical review. **Avian Pathol.**, v. 29, p. 71-93, 2000.

DE WIT, J. J. Infectious Bronchitis Virus in Asia, Africa, Australia and Latin America - History, Current Situation and Control Measures. **Rev. Bras. Ciên. Avícola.**, v. 12, n. 2, p. 97-106, 2010.

DHINAKAR, R. G.; JONES, R. C. Infectious bronchitis virus: immunopathogenesis of infection in chickens. **Avian Pathol.**, v. 26, p. 677-706, 1997.

DI FÁBIO, J.; ROSSINI, L. I. Bronquite infecciosa das galinhas. In : BERCHIERI JR., A.; MACARI, M. **Doença das aves**. Campinas: FACTA, 293-300, 2000. p. 293-300.

DOMINGO, E. Quasispecies theory in virology. **J Virol.**, v. 76, n. 1, p. 463–465, 2002 .

EL-BOUQDAOUI, M.; MHAND, R. A.; BOUAYOUNE, H.; ENNAJI, M. Genetic grouping of nephropathogenic avian infectious bronchitis virus isolated in Morocco. **Int J Poultry Sci.**, v. 4, p.721-727, 2005.

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 Pathol**, 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 Dis.**, v. 42, p. 613-617, 1998.

ESCORCIA, M.; JACKWOOD, M. W.; LUCIO, B.; PETRONE, V. M.; LOPEZ, C.; FEHERVARI, T. & TELLEZ, G. Characterization of Mexican strains of avian infectious bronchitis isolated during 1997. **Avian Dis.**, v. 44, p. 944-947, 2000.

FABRICANT, J. The early history of infectious bronchitis. **Avian Dis.**, v. 42, p. 648-650, 1998.

FELIPPE, F. A. N.; da SILVA, L. H. A.; SANTOS, M. M. A. B.; SPILKI, F. R.; ARNS, C. W. Genetic diversity of avian infectious Bronchitis vírus isolated from domestic chicken flocks and coronaviruses from feral rigeus in Brazil between 2003 and 2009. **Avian Dis.**, v. 54, n. 4, p. 1191-1198, 2010.

FERNANDO, F. S.; GONÇALVES, M. C. M.; MONTASSIER, M. F. S.; RODRIGUES, K. S.; FERNANDES, C. C.; MONTASSIER, H. J. Caracterização da atividade biológica de um novo isolado de campo do vírus da bronquite infecciosa das galinhas. **O Biológico**, São Paulo, v. 72, p. 106, 2010.

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 Dis.**, v. 55, n. 3, p. 422-428, 2011.

GALLARDO, R. A.; HOERR, F. J.; BERRY, W. D.; VAN SANTEN, V. L.; TORO, H. Infectious bronchitis virus in testicles and venereal transmission. **Avian Dis.**, v. 55, n. 2, p. 25-28, 2001.

GALLARDO, R. A.; VAN SANTEN, V. L.; TORO, H. Host intraspatial selection of infectious bronchitis virus populations. **Avian Dis.**, v. 54, n. 2, p. 807-13, 2010.

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 Dis.**, Kennet Square, v. 25, p.121-130, 1981.

GELHAUSEN, 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 Dis.**, v. 33, p. 764-769, 1989.

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

GELB Jr, J.; KEELER, C. L.; NIX, W. A.; ROSENBERGER, J. K.; CLOUD, S. S. Antigenic and S-1 genomic characterization of the Delaware variant serotype of infectious bronchitis virus. **Avian Dis.**, v. 41, p. 661–669, 1997.

GELB, J.; LADMAN, B.S.; TAMAYO, M.; GONZALEZ, M.; SIVANANDAN, V. Novel infectious bronchitis virus S1 genotypes in Mexico 1998-1999. **Avian Dis.**, v. 45, n. 4, p.1060-1063, 2001.

GIBERTONI, A. M.; MONTASSIER, H. J. Development and Application of a *Saccharomyces cerevisiae*-Expressed Nucleocapsid Protein-Based Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Detection of Antibodies against Infectious Bronchitis Virus. **J. Clin. Microbiol**, Washington, DC, v. 43, n.4, p. 1982-1984, 2005.

GIBERTONI, A. M.; GONÇALVES, M. C. M.; MONTASSIER, M. F. S.; FERNANDES, C. C.; MONTASSIER, H. J. Clonagem, expressão e caracterização da

nucleoproteína Recombinante do vírus da bronquite infecciosa em *Escherichia coli* e em *pichia pastoris*. **Arq. Inst. Biol.**, v. 77, n. 1, p. 1-9, 2010.

GOUGH, R. E.; RANDALL, C. J.; DAGLESS, M.; ALEXANDER, D. J.; COX, W. J.; PEARSON, D. A “new” strain of infectious bronchitis virus infecting domestic fowl in Great Britain. **Vet. Rec.**, London, v. 130, n. 22, p. 493-494, 1992.

GOUGH, R. E.; COX, W. J.; GUTIERREZ, E.; MACKENZIE, G.; WOOD, A. M.; DAGLESS, M. D. Isolation of “variant” strains of infectious bronchitis virus from vaccinated chickens in Great Britain. **Vet. Rec.**, London, v. 139, n. 22, p. 552, 1996.

GUO, X.; ROSA, A. J.; CHEN, D. G.; WANG, X. Molecular mechanisms of primary and secondary mucosal immunity using avian infectious bronchitis virus as a model system. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, v. 122, n. 3-4, p. 332-343, 2008.

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

HIDALGO, H.; GALLARDO, R.; ROSENDE, S. Isolation of infectious bronchitis virus from broiler chickens in Chile. **Avian Dis**, v. 20, p. 601-603, 1976.

HIDALGO, H.; GALLARDO, R.; TORO, H. Antigenic and pathogenic properties of three isolates of infectious bronchitis virus obtained from vaccinated chickens. **J. Vet. Med.**, v. 33, p. 26-35, 1986.

HIPÓLITO, O. Isolamento e identificação do vírus da bronquite infecciosa das galinhas no Brasil. **Arq. Esc. Sup. Vet. (MG)**, v. 10, p. 131-63, 1957.

HIPÓLITO, O.; BOTTINO, J. A.; PINTO, A. A. Estudos de duas amostras de vírus isoladas de casos da “síndrome nefrite-nefroze” das galinhas no Brasil. **Ciênc. Cult.**, v. 25, p. 569, 1973.

HODGSON, T.; CASAIS, R.; DOVE, B.; BRITTON, P.; CAVANAGH, D. Recombinant infectious bronchitis coronavirus Beaudette with the spike protein gene of the pathogenic M41 strain remains attenuated but induces protective immunity. **J. Virol.**, v. 78, n. 2, p. 13804–13811, 2004.

HODGSON, T.; BRITTON, P.; CAVANAGH, D. Neither the RNA nor the proteins of open reading frames 3a and 3b of the coronavirus infectious bronchitis virus are essential for replication. **J. Virol.**, v. 80, p. 296–305, 2006.

HOPKINS, S. R. Serological comparisons of strains of infectious bronchitis virus using plaque purified isolants. **Avian Dis.**, 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 Dis.**, v. 30, p. 221-223, 1986.

HOFSTAD, M. S. Immune response to infectious bronchitis vims. **Am. J. Vet. Res.**, v. 36, p. 520-521, 1975.

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 Dis.**, v. 48, p. 581-589, 2004.

HUANG, Y. P.; WANG, C. H. Development of attenuated vaccines from Taiwanese infectious bronchitis virus strains. **Vaccine.**, v. 24, p. 785-791, 2006.

HYUN JEONG LEE, H. J.; YOUN, H. N.; KWON, J. S.; LEE, Y. J.; KIM, J. H.; LEE, J. B. PARK, S. Y.; CHOI, I. S.; SONG, C. S. Characterization of a novel live attenuated infectious bronchitis virus vaccine candidate derived from a Korean

nephropathogenic strain. **Vaccine**, London, v. 28, n. 16, p. 2887–2894, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.vaccine.2010.01.062>>.

IGNJATOVIC, J.; GALLI, L. The S1 glycoprotein but not the N or M proteins of avian infectious bronchitis virus induces protection in vaccinated chickens. **Arch. Virol.**, v. 138, p. 117–134, 1984.

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

IGNJATOVIC, J.; SAPATS, S. I.; ASHTON, F. A long-term study of Australian infectious bronchitis viruses indicates a major antigenic change in recently isolated strains. **Avian Pathol.**, v. 26, p. 535-552, 1997.

IGNJATOVIC, J.; ASHTON, D. F.; REECE, R.; SCOTT, P.; HOOPER, P. Pathogenicity of Australian strains of avian infectious bronchitis virus. **J. Comp. Pathol.**, v. 126, p. 115-123, 2002.

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

ITO, N. M. K.; MIYAJI, C. I.; OKABAYASHI, S. Controle de variantes do vírus da bronquite infecciosa das galinhas. In: CONFERÊNCIA APINCO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLAS, 2006, Santos, São Paulo. Brasil. **Anais...** p. 55- 99.

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 Dis.**, 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 Dis.**, 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 Dis.**, v. 47, p. 718-724, 2003.

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

JONES, R. C. Viral respiratory diseases (ILT, aMPV infections, IB): are they ever under control?. **Br. Poul Sci.**, 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. **J. Appl. Bacteriol.**, v. 36, p. 335-341, 1973.

JUNGHERR, E. L.; CHOMIAK, T.W.; LUGINBUHL, R. E. Immunologic differences in strains of infectious bronchitis virus. In Annual Meeting of the United States Livestock Sanitary Association, Chicago, IL, USA. Proceedings... p. 203-209.

KANT, A.; KOCH, G.; VAN ROOZELAAR, D. J.; KUSTERS, J. G.; POELWIJK FAJ, VAN DER ZEIJST, B. A. Location of antigenic sites defined by neutralizing monoclonal antibodies on the S1 avian infectious bronchitis virus glycopolyptide. **J. Gen. Virol.**, v. 73, p. 591-596, 1992.

KAPCZYNSKI, D. R.; SELLERS, H. S.; ROWLAND, G. N.; JACKWOOD, M. W. Detection of In Ovo–Inoculated Infectious Bronchitis Virus by Immunohistochemistry and In Situ Hybridization with a Riboprobe in Epithelial Cells of the Lung and Cloacal Bursa. **Avian Dis.**, v. 46, n. 3, p. 679-685, 2002.

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

KINDE, H.; DAFT, B. M.; CASTRO, A. E.; BICKFORD, A. A.; GELB Jr, J.; REYNOLDS, B. Viral pathogenesis of a nephrotoxic infectious bronchitis virus isolated from commercial pullets. **Avian Dis.**, v. 35, p. 415-421, 1991.

KING, D. J.; CAVANAGH, D. Infectious bronchitis. In: CALNEK, B. W.; BARNES, H. J.; BERAD, C. W.; REID, W. M.; YODER, J. R. **Diseases of poultry**. 9 ed. Ames Iowa: Iowa State University Press, 1991. p.471-484.

KISS, I.; KECSKEMETI, S.; TANYI, J.; KLINGEBORN, B.; BELAK, S. Preliminary studies on feline coronavirus distribution in naturally and experimentally infected cats. **Res. Vet. Sci.**, v. 68, p. 237-242, 2000.

KLIEVE, A. V.; CUMMING, R. B. Immunity and cross-protection to nephritis produced by Australian infectious bronchitis viruses used as vaccines. **Avian Pathol.**, v. 17, p. 829-839, 1988.

KOCH, G.; HARTOG, L.; KANT, A.; VAN ROOZELAAR, D.; DE BOER, G. F. Antigenic differentiation of avian bronchitis virus variant strains employing monoclonal antibodies. **Isr. J. vet. Med.**, v. 42, p. 89-97, 1986.

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

KUO, S. M.; WANG, C. H.; HOU, M. H.; HUANG, Y. P.; KAO, H. W.; SU, H. L. Evolution of infectious bronchitis virus in Taiwan: characterisation of RNA recombination in the nucleocapsid gene. **Vet. Microbiol.**, Amsterdam, v. 144, n. 3-4, p. 293-302, 2010.

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

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during assembly of the head of T₄ bacteriophage. **Nature.**, London, v. 227, n. 5259, p. 680-681, 1970.

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

LAI, M. M. C, HOLMES, K.V. Coronaviridae: the viruses and their replication. In: KNIPE, D. M.; HOWLEY, P. M.; GRIFFIN, D. E.; LAMB, R.A.; MARTIN, M. A.; ROIZMAN, B.; STRAIS, S. E. (Ed.). **Fields virology**. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins; 2001. p. 1163-1185.

LAMBRECHTS, C.; PENSAERT, M.; 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 Pathol.**, v. 22, p. 577-590, 1993.

LEE, H. J.; YOUN, H. N.; KWON, J. S.; LEE, Y. J.; KIM, J. H.; LEE, J. B.; PARK, S. Y.; CHOI, I. S.; SONG, C. S. Characterization of a novel live attenuated infectious bronchitis virus vaccine candidate derived from a Korean nephropathogenic strain. **Vaccine.**, v. 28, p. 2887–2894, 2010.

LE GROS, F. X. Serotyping studies on recent IBV isolates from France and various regions of the world. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON INFECTIOUS BRONCHITIS AND PNEUMOVIRUS INFECTIONS IN POULTRY, 1998, Rauschholzhausen, Germany. **Proceedings**... p. 205- 209.

LIM, T. H.; LEE, H. J.; LEE, D. H.; LEE, Y. N.; PARK, J. K.; YOUN, H. N.; KIM, M. S.; LEE, J. B.; PARK, S. Y.; CHOI, I. S.; SONG, C. S. An emerging recombinant cluster of nephropathogenic strains of avian infectious bronchitis virus in Korea. **Infect., Genet. Evol.**, Amsterdam, v. 11, n. 3, p. 678-685, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.meegid.2011.01.007>>.

LIM, T. H.; LEE, H. J.; LEE, PARK, YOUN, KIM, M. S.; LEE, J. B.; PARK, S. Y.; CHOI, I. S.; SONG, C. S. An emerging recombinant cluster of nephropathogenic strains of avian infectious bronchitis virus in Korea. **Infect., Genet. Evol.**, Amsterdam, v. 11, n. 3, p. 678-685, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.meegid.2011.01.007>>.

LIU, S. W.; Zhang, Q. X.; Chen, J. D.; Han, Z. X.; Liu, X.; Feng, L.; SHAO, Y. H.; RONG, J. G.; KONG, X. G.; TONG, G. Z. Genetic diversity of avian infectious bronchitis coronavirus strains isolated in China between 1995 and 2004. **Arch. Virol.**, Vienna, p. 151, n. 6, p. 1133-1148, 2006. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s00705-005-0695-6>>.

LIU, X. L.; SU, J. L.; ZHAO, J. X.; ZHANG, G. Z. Complete genome sequence analysis of a predominant infectious bronchitis virus (IBV) strain in China. **Virus Genes**, Secaucus, v. 38, p. 56-65, 2009.

LOHR, J. E. Infectious bronchitis in New Zealand, Asia, East Europe. In: International Symposium on Infectious Bronchitis, Rauschholzhausen, Germany, 1. 1988, Proceedings... p. 70-75.

LUKERT, P. D: Infectious bronchitis. In Isolation and identification of avian pathogens 2nd edition. Edited by: Hitchner SB, Domermuth CH, Purchase HG, Williams JE. American Association of Avian Pathologists, Kennett Square, PA, 1980:70-72.

MACKAY, I. M.; ARDEN, K. E.; NITSCHKE, A. Survey and summary: Real-time PCR in virology. **Nucleic Acids Res.**, Oxon, v. 30, n. 6, p. 1292-1305, 2002.

MARTINS, N.R.; MOCKETT, A. P.; BARRETT, A. D.; COOK, J. K. IgM responses in chicken serum to live and inactivated infectious bronchitis virus vaccines. **Avian Dis.**, v. 35, p. 470– 475, 1991.

MASE, M.; INOUE, T.; YAMAGUCHI, S.; IMADA, T. Existence of avian infectious bronchitis virus with a European-prevalent 4/91 genotype in Japan. **J. Vet. Med. Sci.**, v. 70, p. 1341-1344, 2008.

MASE, M.; TSUKAMOTO, K.; IMAI, K.; YAMAGUCHI, S. Phylogenetic analysis of avian infectious bronchitis virus strains isolated in Japan. **Arch. Virol.**, v. 149, p. 2069-2078, 2004.

MCFERRAN, J. B.; CAHILL, H. T.; YOUNG, J. A.; WRIGHT, C.L. Isolation of infectious bronchitis virus from newborn chicks and dead-in-shell embryos. **Vet. Rec.**, v. 89, p. 560-561, 1971.

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

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.**, London, v. 26, p.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 Dis.**, v. 48, p. 635-641, 2004.

MEULEMANS, G.; CARLIER, M. C.; GONZE, M.; PETIT, P.; VANDENBROECK, M. Incidence, characterisation and prophylaxis of nephropathogenic avian infectious

bronchitis viruses. **The Vet. Rec.**, London, v. 120, p. 205-206, 1987. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1136/vr.120.9.205>>.

MIURA, T. A.; WANG, J.; HOLMES, K. V.; MASON, R. J. Rat coronaviruses infect rat alveolar type I epithelial cells and induce expression of CXC chemokines. **Virology.**, Maryland Height, v. 369, n. 2, p. 288-98, 2007. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.virol.2007.07.030>>.

MOCKETT, A. P. A.; DARBYSHIRE, J. H. Comparative studies with an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for antibodies to avian infectious bronchitis virus. **Avian Pathol.**, v. 10, p. 1-10, 1981.

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

MONTASSIER, M. F. S.; Brentano, L.; Richtzenhain, L. J.; Montassier, H. J. Genetic diversity on S1 glycoprotein of avian infectious bronchitis virus strains isolated in Brazil between 1988-2000. In: THE INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON AVIAN CORONAVIRUS, 2006, Rauschholzhausen, Germany. **Proceedings...** v.1, p. 119-131.

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. **Pesq. Vet. Bras.**, v. 28, p. 190-194, 2008.

MONTASSIER, H. J. Molecular Epidemiology and Evolution of Avian Infectious Bronchitis Virus. **Rev. bras. Ciên. Avícola.**, v. 12, n. 2, p.87-96, 2010.

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 Pathol.**, 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 Dis.**, 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 Pathol.**, Cambs, v. 22, p. 555-564, 1993.

NAQI, S.; GAY, K.; PRASAD, P.; MONDAL .; S.; LIU, R. Establishment of Persistent Avian Infectious Bronchitis Virus Infection in Antibody-Free and Antibody-Positive Chickens. **Avian Dis.**, v. 47, p. 594-601, 2003

NIESTERS, H. G. M. Molecular and diagnostic clinical virology in real time. **Clin. Microbiol. Infect.**, Oxford, v. 10, n. 1, p. 5-11, 2004.

NIX, W. A.; TROEBER, D. S.; KINGHAM, B. F.; KEELER, C. L. J.; GELB, J.J. Emergence of subtype strains of the Arkansas serotype of infectious bronchitis virus in Delmarva broiler chickens. **Avian Dis.**, v. 44, p. 568- 581, 2000.

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.

ORTEGO, J; SOLA, I.; ALMAZAN, F.; CERIANI, J. E.; RIQUELME, C.; BALASCH, M.; PLANA, I.; ENJUANES, L. Transmissible gastroenteritis coronavirus gene 7 is not essential but influences in vivo virus replication and virulence. **Virology.**, v. 308, n. 11, p. 13–22, 2003.

OTSUKI, K.; YAMAMOTO, H.; TSUBOKURA, M. Studies on avian infectious bronchitis virus (IBV). I. Resistance of IBV to chemical and physical treatments. **Arch. Virol.**, v. 60, p. 25-32, 1979.

OWEN R.L.; COWEN, B. S.; HATTEL, A. L.; NAQI, S. A.; WILSON, R. A. Detection of viral antigen following exposure of one-day-old chickens to the Holland-52 strain of IBV. **Avian Pathol.**, v. 20, n. 4, p. 663-73, 1991.

PARSONS, D.; ELLIS, M. M.; CAVANAGH, D.; COOK, J. K. A. Characterisation of an infectious bronchitis virus isolated from vaccinated broiler breeder flocks. **Vet. Rec.**, v. 131, p. 408-411, 1992.

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

PILERI, S. A.; RONCADOR, G.; CECCARELLI, C. Antigen retrieval techniques in immunohistochemistry: comparison of different methods. **J. Pathol.**, v. 183, p. 116-123, 1997.

POHUANG, T.; CHANSIRIPORNCHAI, N.; TAWATSIN, A.; SASIPREEYAJAN, J. Detection and molecular characterization of infectious bronchitis virus isolated from recent outbreaks in broiler flocks in Thailand. **J. Vet. Sci.**, v. 10, p. 219-223, 2009.

PURCELL, D. A.; THAM, V. L.; SURMAN, P. G. The histopathology of infectious bronchitis in fowls infected with a nephrotropic "T" strain of virus. **Aust. Vet. J.**, v. 52, p. 85-91, 1976.

PURCHASE, H. G.; CUNNINGHAM, C. H.; BURMESTER, B. R. Identification and epizootiology of infectious bronchitis in a closed flock. **Avian Dis.**, 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.

RIMONDI, A.; CRAIG, M. I.; VAGNOZZI, A.; KONIG, G.; DELAMER, M.; PEREDA, A. Molecular characterization of avian infectious bronchitis virus strains from outbreaks in Argentina (2001-2008). **Avian Pathol.**, v. 38, p. 149-153, 2009.

ROWE, C. L.; BAKER, S. C.; NATHAN, M. J.; SGRO, J. Y.; PALMENBERG, A. C.; FLEMING, J. O. Quasispecies development by high frequency RNA recombination during MHV persistence. **Adv. Exper. Med. Biol.**, v. 440, p. 759-765, 1998.

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

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

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. **J. Virol.**, 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. **J. Virol.** v. 71, n. 7, p. 5173–5177, 1997.

SHIMAZAKI, Y.; HORIUCHI, T.; HARADA, M.; TANIMURA, C.; SEKI, Y.; KURODA, Y.; YAGYU, K.; NAKAMURA, S.; SUZUKI, S. Isolation of 4/91 type of infectious bronchitis virus as a new variant in Japan and efficacy of vaccination against 4/91 type field isolate. **Avian Dis.**, v. 52, p. 618-622, 2008.

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.

SILVA, E. M. Infectious bronchitis in brazilian chickens: current data and observations of field service personnel. **Rev. Bras. Ciên. Aví.** v.12, n.3, p: 197 – 203, 2010.

SNOECK, V.; PETERS, I.; COX, E. "The IgA system: a comparison of structure and function in different species". **Vet. Res.**, v. 37, n. 3, p. 455–67, 2006.

SONG, C. S.; LEE, Y.J.; KIM, J.H.; SUNG, H. W.; LEE, C.W.; IZUMIYA, Y.; MIYASAWA, T. Epidemiological classification of infectious bronchitis virus isolated in Korea between 1986 and 1997. **Avian Pathol.**, v. 27, p. 409-416, 1998.

TORO, H.; FERNANDEZ, I. Avian infectious bronchitis: specific lachrymal IgA level and resistance against challenge. **J. Vet. Med.**, v. 41, p. 467-473, 1994.

TOWBIN, H.T.; STAHELIN, T.; GORDON, J. Eletrophoretic transfer of protein from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. **Proc. Natl. Acad. Sci., USA**, Washington, v. 76, n. 1, p. 4350-4354, 1979.

USDA. Usda: Produção, exportação, importação e consumo de carne de frango no mundo em 2011. Disponível em: www.aveworld.com.br/estatisticas/post/usda-producao-exportacao-importacao-e-consumo-de-carne-de-frango-no-mundo. Acesso em 10 jan. 2013.

VILLARREAL, L. Y. B.; BRANDÃO, P. E.; CHACÓN, J. L.; ASSAYAG, M. S.; MAIORKA, P. C.; RAFFI, A. B. S.; SAIDENBERG, A. B. S.; JONES, R. C.; FERREIRA, A. J. P. Orchitis in Roosters with Reduced Fertility Associated with Avian

Infectious Bronchitis Virus and Avian Metapneumovirus Infections. **Avian Dis.** v. 51, p. 900-904, 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 Dis.**, v. 51, p. 974- 978, 2007b.

VILLARREAL, L. Y. B. Diagnosis of Infectious Bronchitis: An Overview of Concepts and Tools. Workshop: Infectious Bronchitis (IB) in the Brazilian Poultry Industry. **Rev. Bras. Ciên. Aví.**, v. 12, n. 2, p. 111 – 114, 2010.

XIE, Q.; JI, J.; XIE, J.; CHEN, F.; CAI, M.; SUN, B.; XUE, C.; JINGYUN, M.; YINGZUO, B. I. Epidemiology and immunoprotection of nephropathogenic avian infectious bronchitis virus in southern China. **Virology**, London, v. 8, p. 484, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1186/1743-422X-8-484>>.

YACHIDA, S.; IRITANI, Y.; KATAGIRI, K. Effect of incubation temperature on infectivity titration of mouse brain-passaged avian infectious bronchitis virus in laboratory host systems. **Acta Virologica**, v. 23, p. 398-402, 1979.

YASHIDA, S.; AOYAMA, S.; SAWAGUCHI, K.; TAKAHASHI, N.; IRITANI, Y.; HAYASHI, Y. 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.

YOUNT, B.; ROBERTS, R. S.; SIMS, A. C.; DEMING, D.; FRIEMAN, M. B. Severe acute respiratory syndrome coronavirus group-specific open reading frames encode nonessential functions for replication in cell cultures and mice. **J. Virology**, London, v. 79, n. 23, p. 14909–14922, 2005. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1128/JVI.79.23.14909-14922.2005>>.

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

YUDONG, W.; YONGLIN, W.; ZICHUN, Z.; GENCHE, F.; YIHAI, J.; XIANGE, L. Isolation and identification of glandular stomach type IBV (QX IBV) in chickens. **Chin. J. Anim. Quarant.**, v. 15, p. 1-3, 1998.

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

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

WANG, X. Q.; SCHNITZLEIN, W. M.; TRIPATHY, D. N.; GIRSHICK, T.; KHAN, M. I. Construction and immunogenicity studies of recombinant fowl poxvirus containing the S1 gene of Massachusetts 41 strain of infectious bronchitis virus. **Avian Dis.**, v. 46, p. 831–838, 2002.

WEI, P. L. M.; WEI, Z. J.; WANG, X. Y.; MO, M. L.; CHEN, Q. Y. Genotyping and serotyping of Guangxi IBV isolates during 1985_ 2008. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON AVIAN CORONA- AND PNEUMOVIRUSES AND COMPLICATING PATHOGENS, 6. 2009, Rauschholzhausen, Germany, **Proceedings...**p. 59-66.

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

WINTER, C.; SCHWEGMANN-WESSELS, C.; CAVANAGH, D.; NEUMAN, U.; HERRLER, G. Sialic acid is a receptor determinant for infection of cells by avian infectious bronchitis virus, **J. Gen. Virol.**, v. 87, p. 1209–1216, 2006.

WORTHINGTON, K. J.; CURRIE, R. J.; JONES, R. C. A reverse transcriptase-polymerase chain reaction survey of infectious bronchitis virus genotypes in Western Europe from 2002 to 2006. **Avian Pathol.**, v. 37, p. 247-257, 2008.

WU, Z. Q.; YANG, Q. W.; FU, C.; ZHAO, X. Y.; IGNJATOVIC, J. Antigenic and immunogenic characterization of infectious bronchitis virus strains isolated in China between 1986 and 1995. **Avian Pathol.**, v. 27, 578-585, 1998.

ZANELLA, A.; COARO, R.; FABRIS, G.; MARCHI, R.; LAVAZZA, A. Avian infectious bronchitis virus: isolation of an apparently new variant in Italy. **Vet. Rec.**, v. 146, n. 191-193, 2000.

ZELLEN, G. H.; THORSEN, J. Standardization and application of the enzyme-linked immunosorbent assay for Infectious Bronchitis. **Avian Dis.**, 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 Dis.**, v. 46, p. 847–858, 2002.

ZOU, N. L.; ZHAO, F. F.; WANG, Y. P.; LIU, P.; CAO, S. J.; WEN, X. T.; HUANG, Y. Genetic analysis revealed LX4 genotype strains of avian infectious bronchitis virus became predominant in recent years in Sichuan area, China. **Virus Genes.**, v. 41, p. 202-209, 2010.

ZULPERI, Z. M.; OMAR, A. R.; ARSHAD, S. S. Sequence and phylogenetic analysis of S1, S2, M, and N genes of infectious bronchitis virus isolates from Malaysia. **Virus Genes.**, v. 38, p. 383-391, 2009.