

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

**DESENVOLVIMENTO E APLICAÇÃO DA TÉCNICA DE  
NESTED-RT-PCR PARA A DETECÇÃO E  
IDENTIFICAÇÃO DE VARIANTES BRASILEIRAS DO  
VÍRUS DA BRONquite INFECCIOSA**

**Caren Pavani**  
Médica Veterinária

**2017**

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

**DESENVOLVIMENTO E APLICAÇÃO DA TÉCNICA DE  
NESTED-RT-PCR PARA A DETECÇÃO E  
IDENTIFICAÇÃO DE VARIANTES BRASILEIRAS DO  
VÍRUS DA BRONQUITE INFECCIOSA**

**Caren Pavani**

**Orientador: Prof. Dr. Helio José Montassier**

Dissertação apresentada a Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Microbiologia Agropecuária.

**2017**

Pavani, Caren  
P337d Desenvolvimento e aplicação da técnica de Nested-RT-PCR para a  
detecção e identificação de variantes brasileiras do vírus da bronquite  
infecciosa / Caren Pavani. -- Jaboticabal, 2017  
ix, 43 p. : il. ; 29 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista,  
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2017  
Orientador: Helio José Montassier  
Banca examinadora: Cintia Hiromi Okino, Manoel Victor Franco  
Lemos  
Bibliografia

1. Bronquite infecciosa das galinhas. 2. Diagnóstico molecular  
direto. 3. Gene da glicoproteína S1. 4. Genótipo BR-I. I. Título. II.  
Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 576.8:636.6

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



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Jaboticabal



**CERTIFICADO DE APROVAÇÃO**

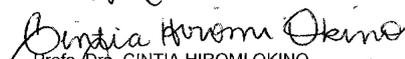
TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: DESENVOLVIMENTO E APLICAÇÃO DA TÉCNICA DE NESTED-RT-PCR PARA A DETECÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DE VARIANTES BRASILEIRAS DO VÍRUS DA BRONQUITE INFECCIOSA

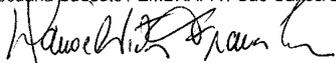
**AUTORA: CAREN PAVANI**

**ORIENTADOR: HÉLIO JOSÉ MONTASSIER**

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em MICROBIOLOGIA AGROPECUÁRIA, pela Comissão Examinadora:

  
Prof. Dr. HÉLIO JOSÉ MONTASSIER  
Departamento de Patologia Veterinária / FCAV / UNESP - Jaboticabal

  
Profa. Dr.ª CINTIA HIROMI OKINO  
Pecuária Sudeste / EMBRAPA / São Carlos/SP

  
Prof. Dr. MANOEL VICTOR FRANCO LEMOS  
Departamento de Biologia Aplicada à Agropecuária / FCAV / UNESP - Jaboticabal

Jaboticabal, 02 de agosto de 2017

## **DADOS CURRICULARES DO AUTOR**

**CAREN PAVANI** – Nascida em Julho de 1991 em Olímpia – SP. Graduada em Medicina Veterinária pela Faculdade Dr. Francisco Maeda (FAFRAM), Ituverava – SP, em dezembro de 2014. Realizou estágio curricular no setor de Patologia Animal e ambulatório de animais selvagens do Hospital Veterinário da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista - FCAV-UNESP Câmpus de Jaboticabal-SP, entre julho e outubro de 2014, sob orientação da Profa. Dra. Karin Werther. Em março de 2015 ingressou no Mestrado pelo Programa de Pós-graduação em Microbiologia Agropecuária, sob orientação do Professor Dr. Hélio José Montassier.

Dedico este trabalho à minha querida prima  
Cintia (*in memoriam*) toda sua alegria e  
bondade me serviram de exemplo.

“Que a vida é trem-bala, parceiro  
E a gente é só passageiro prestes a partir.”

Ana Vilela

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a Deus, que se mostrou criador, que foi criativo. Seu fôlego de vida em mim me foi sustento e me deu coragem para questionar realidades e propor sempre um novo mundo de possibilidades.

Agradeço a minha mãe Cineiri Aparecida Pagiato Pavani, ao meu pai Antonio Marcos Pavani e meu irmão Marcos Augusto Pavani, por acreditar e investirem em mim, com muito carinho e não mediram esforços para que eu chegasse até esta etapa da minha vida.

Ao meu orientador Prof. Dr. Hélio José Montassier, pela paciência, dedicação, esforço e pelos ensinamentos transmitidos que proporcionaram a conclusão desse trabalho.

Aos colegas de laboratório de Imunologia e Virologia: Fátima, Priscila, Viviane, Romeu, Mariana, Filipe, Thaianne e Lurdinha pela colaboração, parceria e amizade.

Aos laços de amizade que a Unesp me proporcionou, em especial: Priscila, Viviane, Daniele, Thaianne e Olívia. Obrigada pelas alegrias, tristezas e dores compartilhadas.

Agradeço a todos os funcionários desta instituição em especial: Edna, Dona Rô, Branca e Hugo.

Ao CNPq pelo financiamento deste projeto.

A todas as aves que me cederam um pouco de suas amostras biológicas para que eu pudesse realizar este estudo.

Agradeço a minha maritaca Maricota que foi a responsável por despertar em mim esse amor e curiosidade pelas aves.

Agradeço ao mundo pela constante evolução, por nunca fazer as coisas serem da mesma forma, pois assim não teríamos o quê pesquisar e o quê descobrir.

A todos, muito obrigada.

## SUMÁRIO

	<b>Página</b>
CERTIFICADO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS.....	iii
RESUMO .....	iv
ABSTRACT .....	v
LISTA DE ABREVIATURAS.....	vi
LISTA DE FIGURAS .....	vii
LISTA DE TABELAS .....	ix
1 INTRODUÇÃO .....	1
2 REVISÃO DE LITERATURA .....	3
2.1 Bronquite infecciosa aviária .....	3
2.2 Etiologia e Morfologia Viral.....	3
2.3 Patogenia .....	4
2.4 Epidemiologia.....	6
2.5 Diagnóstico.....	6
2.6 Prevenção e Controle.....	8
2.7 A Bronquite Infecciosa e suas variantes no Mundo e no Brasil.....	8
2.8 O coronavírus do VBI em outras aves.....	11
3 OBJETIVOS .....	12
3.1 Objetivo Geral .....	12
3.2 Objetivos específicos.....	12
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	12
4.1 Vírus e amostras clínicas .....	12
4.2 Extração do RNA total .....	13
4.3 Reação de transcrição reversa (RT).....	14
4.4 Oligonucleotídeos iniciadores .....	14
4.5 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) .....	16
4.6 Técnica de Nested-RT-PCR universal.....	16
4.7 Técnica de BR-Nested-RT-PCR específica para o genótipo BR-I.....	17
4.8 Eletroforese em gel de agarose.....	18
4.9 Determinação da especificidade analítica .....	18
4.9.1 Determinação da especificidade analítica com amostras de vírus heterólogos.....	18

4.9.2 Determinação da especificidade analítica com variantes brasileiras do VBI e as pertencentes a outros genótipos.....	18
4.10 Determinação da sensibilidade analítica.....	19
4.10.1 Determinação da sensibilidade analítica a partir da diluição do LCA .....	19
4.10.2 Determinação da sensibilidade analítica a partir da diluição do cDNA ...	19
4.11 Análise estatística.....	19
4.12 Determinação de sequências nucleotídicas e análises do gene S1 de estirpes identificadas no genótipo BR-I pela técnica de BR-Nested-RT-PCR .....	19
5 RESULTADOS.....	20
5.1 Otimização da temperatura de pareamento na PCR dos oligonucleotídeos iniciadores do gene S1 para o Genótipo BR-I do VBI .....	20
5.2 Determinação da especificidade analítica com vírus heterólogos ao VBI.....	21
5.3 Determinação da especificidade analítica com as diferentes estirpes do VBI....	23
5.4 Determinação da sensibilidade analítica.....	23
5.5 Comparação da BR-Nested-RT-PCR com a Nested-RT-PCR universal para a detecção do VBI em amostras de campo.....	24
5.6 Análise das sequências nucleotídicas do gene S1 de isolados de VBI identificadas como positivas para o genótipo brasileiro através da técnica de BR-Nested-RT-PCR .....	26
6 DISCUSSÃO .....	31
7 CONCLUSÕES .....	35
8 REFERÊNCIAS.....	35

## CERTIFICADO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS



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



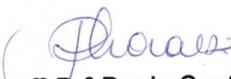
### CEUA – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

#### CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "**Desenvolvimento e aplicação da técnica de nested-RT-PCR do gene S1 para detecção e identificação de estirpes variantes brasileiras do vírus da bronquite infecciosa**", protocolo nº 17545/15, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Hélio José Montassier, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao Filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008, no decreto 6.899, de 15 de junho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA), da FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS, UNESP - CÂMPUS DE JABOTICABAL - SP, em reunião ordinária de 14 de setembro de 2015.

Vigência do Projeto	02/10/2015 a 02/08/2017
Espécie / Linhagem	<i>Gallus gallus domesticus</i> / comercial de corte
Nº de animais	200
Peso / Idade	Indeterminado / 1 a 42 dias
Sexo	Macho e fêmea
Origem	Criação comercial – abatedouros do estado de São Paulo

Jaboticabal, 14 de setembro de 2015.

  
**Prof.ª Dr.ª Paola Castro Moraes**  
Coordenadora – CEUA

## DESENVOLVIMENTO E APLICAÇÃO DA TÉCNICA DE NESTED-RT-PCR PARA A DETECÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DE VARIANTES BRASILEIRAS DO VÍRUS DA BRONquite INFECCIOSA

**RESUMO** - Em plantéis avícolas, é frequente a ocorrência de doenças infecciosas respiratórias e dentre estas, destaca-se a Bronquite Infecciosa (BI), uma doença aguda e altamente contagiosa de aves. A BI é causada pelo vírus da bronquite infecciosa (VBI), cujo processo infeccioso geralmente provoca perdas econômicas significativas para as criações avícolas. A extensa variação genética, especialmente nas regiões hipervariáveis (HVRs) do gene S1, é uma das principais características da evolução do VBI, e resulta no surgimento de diversas variantes, que requerem um diagnóstico molecular que inclua a detecção dessas novas estirpes, como o genótipo brasileiro (BR-VBI), pois a detecção e identificação do agente etiológico são essenciais para o controle dessa enfermidade. Para tanto, é necessário que os métodos de diagnóstico empregados sejam sensíveis, específicos e de baixo custo. Foi então desenvolvida e avaliada neste estudo uma técnica de Nested-RT-PCR (BR-Nested-RT-PCR) utilizando um conjunto de oligonucleotídeos iniciadores desenvolvido dentro da região HVR3 do gene S1 de estirpes variantes brasileiras do VBI para a detecção e identificação de linhagens do genótipo brasileiro do VBI presentes em amostras biológicas de aves e comparada com a Nested-RT-PCR universal, utilizando oligonucleotídeos iniciadores universais para a mesma região do gene S1. Os resultados demonstraram que a técnica BR-Nested-RT-PCR apresentou uma elevada sensibilidade na detecção de estirpes do genótipo BR-I do VBI e não gerou produtos amplificados a partir de amostras de vírus heterólogos testados (vírus da doença de Newcastle, metapneumovírus aviário, reovírus e vírus da doença de gumboro), nem de estirpes do VBI classificadas em outros genótipos.). Ademais, quando foram comparadas as técnicas BR-Nested-RT-PCR com a técnica universal de Nested-RT-PCR foram obtidas boa concordância ( $k = 0,67$ ), sensibilidade relativa de 85,4% e especificidade relativa de 81,6% para a detecção direta e identificação de estirpes do genótipo BR em amostras de campo. Em conclusão, a técnica de BR-Nested-RT-PCR desenvolvida no presente estudo, oferece uma opção de menor custo e menor complexidade do que a técnica de RT-PCR em tempo real para detectar e diferenciar estirpes do genótipo BR-I do VBI, sem comprometer a especificidade ou a sensibilidade, tendo, assim, o potencial de viabilizar a adoção de meios mais efetivos para o diagnóstico direto de estirpes do genótipo BR-I do VBI em amostras colhidas de aves mantidas em criações comerciais.

**Palavras-chave:** bronquite infecciosa das galinhas, diagnóstico molecular direto, gene da glicoproteína S1, genótipo BR-I.

## DEVELOPMENT AND APPLICATION OF THE NESTED-RT-PCR TECHNIQUE FOR THE DETECTION AND IDENTIFICATION OF BRAZILIAN VARIANTS OF INFECTIOUS BRONCHITIS VIRUS

**ABSTRACT** - Infectious bronchitis (IB) is an acute and highly contagious disease of birds. IB is caused by infectious bronchitis virus (IBV), which usually results in significant economic losses for poultry farms. The extensive genetic variation, especially in the hypervariable regions (HVRs) of the S1 gene, is one of the main characteristics of the evolution of IBV, and results in the appearance of several variants that require a molecular diagnosis which includes the detection of these new strains, such as Brazilian I genotype (BR-I), since the detection and identification of the causative agent are essential for the control of the disease. Therefore, the diagnostic methods used must be sensitive, specific and inexpensive. A Nested-RT-PCR (BR-Nested-RT-PCR) technique was developed and evaluated in this study using a set of primers designed for the HVR3 region of the S1 gene for the detection and identification of Brazilian genotype strains of IBV present in biological samples from birds and compared with universal Nested-RT-PCR using universal primers for the same region of the S1 gene. The results demonstrated that the BR-Nested-RT-PCR technique had a high sensitivity to detect IBV strains from BR-I genotype and did not generate amplified products from heterologous virus samples tested (Newcastle disease virus, avian metapneumovirus, Reovirus and Gumboro disease virus), neither from IBV strains of other genotypes. In addition, the comparison between BR-Nested-RT-PCR techniques with the universal Nested-RT-PCR technique revealed good agreement ( $k = 0.67$ ), relative sensitivity of 85.4% and relative specificity of 81.6 % for the direct detection and identification of BR-I genotype strains in field samples. In conclusion, the BR-Nested-RT-PCR technique developed in the present study offers a lower cost and less complex option than the real-time RT-PCR technique to detect and differentiate strains of the BR-I genotype of IBV without compromising specificity or sensitivity, and has the potential to provide a more effective mean for the direct diagnosis of BR-I IBV strains in samples collected from birds reared in commercial flocks.

**Keywords:** Avian Infectious Bronchitis, Molecular Direct Diagnosis, S1 glycoprotein gene, BR-I genotype.

## LISTA DE ABREVIATURAS

- ABPA – Associação brasileira de proteína animal  
DEPC – Dietil-pirocarbonato  
DIE – Dose Infectante Embrionária  
dNTP - Desoxirribonucleotídeos Fosfatados  
dpi – dia pós-infecção  
H120 – Holland 120  
HE – Hematoxilina-Eosina  
HI – Inibição da Hemaglutinação  
IBV - infectious bronchitis virus  
Kb – Quilobases ou 1000 unidades de bases  
kDa - Kilodalton  
LCA – Líquido Cório Alantóide  
M41 – Massachussets 41  
ng – Nanograma  
OIE – Organização Mundial de Saúde Animal  
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  
S – “Spike” - Glicoproteína de Superfície  
SPF – “Specific Pathogen Free” – Livre de patógenos específicos  
TA – Temperatura Ambiente  
Tm – “Melting temperature” – Temperatura de dissociação  
VBI – vírus da Bronquite Infecciosa

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Representação esquemática do Genoma do VBI adaptado de Cavanagh (2005) e Gorbalenya et al. (2006). Gene S e subunidades S1 e S2, com as regiões de hipervariabilidade (HRV1, HRV2 e HVR3) localizadas no gene S1, com as respectivas combinações de oligonucleotídeos iniciadores utilizados na técnica de BR-Nested-RT-PCR..... 15
- Figura 2.** Visualização em gel de agarose dos produtos amplificados após o gradiente de temperatura de pareamento dos oligonucleotídeos indicadores BRV1+ e BRV2-. Na canaletas 1, 5 µL Marcador de tamanho molecular 1Kb plus DNA Ladder (Invitrogen). Nas canaletas de 1 a 12, os produtos de RT-PCR com 5 µl provenientes das seguintes temperaturas 48°C (canaleta 1), 48,3°C (canaleta 2), 49,1°C (canaleta 3), 50°C (canaleta 4), 51,4°C (canaleta 5), 53,1°C (canaleta 6), 55,2°C (canaleta 7), 56,9°C (canaleta 8), 58,2°C (canaleta 9), 59,1°C (canaleta 10), 59,8°C (canaleta 11) 60°C (canaleta 12), respectivamente. A melhor temperatura para pareamento desse par de oligonucleotídeos iniciadores correspondeu a 53,1°C (seta branca) que gerou o produto amplificado da canaleta 6. Nas canaletas 13 e 14 foram incluídos os controles negativos da reação..... 21
- Figura 3.** Eletroforese em gel de agarose para a avaliação da especificidade analítica com vírus heterólogos não pertencentes ao VBI. Foi obtido apenas um produto de 133 pb que amplificou a estirpe IBVPR05\* utilizando o conjunto de oligonucleotídeos iniciadores BRV1+/BRV2-. (M) Marcador de tamanho molecular (100 pb), (canaleta 1) estirpe La Sota do VDN, (canaleta 2) estirpe Ulster do VDN, (canaleta 3) estirpe B1do VDN, (canaleta 4) estirpe VG do VDN, (canaleta 5) estirpe S-706 do VDG, (canaleta 6) estirpe 1133 do Reovirus, (canaleta 7) estirpe PL do Metapneumovírus aviário, (canaletas 8 e 9) *E.coli*, (canaletas 10 e 11) Controles negativos, (canaleta 12) estirpe IBVPR05 do genótipo BR-I do VBI, (canaleta 13) estirpe H120 do genótipo Massachusetts do VBI..... 22
- Figura 4.** Eletroforese em gel de agarose para a avaliação da especificidade analítica com as diferentes estirpes do VBI. (A) Foram obtidos produtos de 393 pb para a amplificação de todas as estirpes testadas utilizando o conjunto SX3+ /SX4-. (B) Um produto de 133 pb foi obtido para a amplificação de estirpes de genótipo BR utilizando o conjunto BRV1+/BRV2-. (canaleta 1) IBVPR05\*, (canaleta 2) estirpe H120, (canaleta 3) estirpe Ma5, (canaleta 4) estirpe M41, (canaleta 5) estirpe Connecticut, (canaleta 6) estirpe Arkansas, (canaleta 7), estirpe Beaudette, (canaletas 8 e 9) Controle Negativo.  
\*IBVPR05 é uma estirpe de genótipo BR..... 23

- Figura 5.** Gel de agarose para a avaliação da sensibilidade analítica da BR-Nested-RT-PCR para a detecção da estirpe IBVPR05. (A) diluições seriadas de razão dez do cDNA da estirpe IBVPR05 a partir de 100 a  $10^{-6}$ , (canaleta M) DNA ladder 100pb, (canaleta 1)  $10^7$  cópias/ $\mu$ l (não diluído), (canaleta 2 a canaleta 7)  $10^6$ ,  $10^5$ ,  $10^4$ ,  $10^3$ ,  $10^2$  e  $10^1$  cópias/ $\mu$ l, (canaleta 8) Controle negativo. (B) séries de diluição de razão dez, de LCA contendo  $10^7$  DIE<sub>50</sub>/ml, começando de 100 a  $10^{-6}$ . (canaleta M) DNA ladder 100pb, (canaleta 1) 100 (não diluído), (canaleta 2 a canaleta 7)  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$  e  $10^{-6}$  cópias/ $\mu$ l, (canaleta 8) Controle negativo..... 24
- Figura 6.** Comparação da BR-Nested-RT-PCR com a Nested-RT-PCR universal para detecção do VBI em amostras de campo..... 25
- Figura 7.** Alinhamento múltiplo das sequências de nucleotídeos da porção intermediária do gene S1, obtidas dos dois isolados de campo do VBI (IBVSP05-16 e IBVSP06-16) destacados com molduras de linhas verdes, juntamente com as seqüências desse mesmo gene de estirpes de referência obtidas do GENBANK. Os resíduos de nucleotídeos idênticos são representados por pontos (.) e as posições das deleções ou ausências de sequenciamento são representadas por traços (-). A moldura com linhas vermelhas destaca a sequência de nucleotídeos do oligonucleotídeo iniciador BRV1+ e a moldura com linhas azuis destaca a sequência de nucleotídeos do oligonucleotídeo iniciador BRV2-... 28
- Figura 8.** Dendrograma construído a partir da análise filogenética feita com base na sequência parcial de nucleotídeos do gene S1 (nts. 730 a 1085) de diferentes estirpes e isolados do VBI usando o algoritmo Neighbor-Joining e o método de Kimura 2 Parameter. As sequências parciais do gene S1 dos isolados IBVSP05-16 e IBVSP06-16 do VBI foram identificadas com moldura vermelha, sendo apresentadas também as demais sequências desse mesmo gene de outras estirpes de referência do VBI que foram obtidas do GenBank, e que estão identificadas com seus respectivos números e/ou nomes. Os 10 principais genótipos que foram caracterizados nessa análise filogenética estão individualizados por chaves, os quais estão identificados ou em relação às estirpes de referência mais conhecidas que compõem esses genótipos, ou aos países de origem dos quais essas estirpes do VBI são originárias. Os nós em cada chave representam 1000 réplicas para a determinação dos valores de bootstrap (somente valores de bootstrap  $\geq 50$  são mostrados). A barra embaixo do dendrograma representa o número de substituições de nucleotídeos por sítio..... 30

## LISTA DE TABELAS

	<b>Página</b>
<b>Tabela 1.</b> Oligonucleotídeos utilizados para a reação de RT-PCR e Nested-RT-PCR.....	16
<b>Tabela 2.</b> Comparação entre as reações de RT-PCR universal e BR-Nested-RT-PCR.....	17
<b>Tabela 3.</b> Comparação dos resultados da BR-Nested-RT-PCR e universal para a detecção do Vírus de Bronquite Infecciosa Aviária em amostras de campo colhidas de granjas comerciais de aves de corte.....	25
<b>Tabela 4.</b> Identidades de nucleotídeos (diagonal de baixo) e de aminoácidos (diagonal de cima), em valores percentuais de sequências parciais do gene / proteína S1 dos dois novos isolados de campo do VBI em relação às sequências análogas de estirpes de genótipos de referência desse vírus.....	29

## 1 INTRODUÇÃO

A cadeia de produção de carne de frango brasileira é uma das mais importantes do mundo. A produção de carne de frango vem acompanhando o crescimento da demanda interna e externa decorrente do aumento da competitividade e produtividade, mas também pelo aumento no nível de urbanização e renda da população, da diversificação das dietas e da mudança de hábitos alimentares. A produção de carne de frango no Brasil superou 13,1 milhões de toneladas, assumindo o segundo lugar mundial, que antes era da China e ocupa a liderança mundial na exportação. Quanto à produção de ovos, foram 39 bilhões de unidades produzidas (ABPA, 2015).

No entanto, as doenças infecciosas, especialmente as de etiologia viral e relacionadas ao sistema respiratório, exercem um impacto significativo em termos de perdas econômicas na avicultura do mundo todo. Tais perdas se refletem na diminuição do crescimento e consequente redução na produção de carne, comprometimento da qualidade e da produção de ovos e em alguns casos resultam na morte das aves. Entre os patógenos respiratórios, o vírus da bronquite infecciosa aviária é um dos mais relevantes, devido à sua ampla disseminação entre os hospedeiros suscetíveis e grande potencial de variabilidade genética e antigênica (CAVANAGH, 2005; JONES, 2010).

O vírus da bronquite infecciosa (VBI), acomete frangos, matrizes e poedeiras da espécie *Gallus gallus* de qualquer idade. Por seu potencial de ampla disseminação entre as criações avícolas, possui importância socioeconômica e implicações sanitárias (CAVANAGH, 2005; JONES, 2010).

O VBI 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 dos tratos urinário, reprodutor e digestório das aves infectadas. Esta característica esta 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 de referência desse vírus, incluindo aquelas mais usadas na produção de vacinas (CAVANAGH, 2007).

A bronquite infecciosa está amplamente disseminada entre as criações avícolas comerciais e é uma das enfermidades virais que mais tem causado perdas econômicas à produção avícola. A constante evolução deste vírus leva a alterações em genes que codificam as proteínas estruturais e não estruturais do VBI. Dessa forma, essas mutações podem modificar importantes epítomos neutralizantes desse vírus, gerando continuamente novas estirpes e até mesmo sorotipos do VBI (CAVANAGH, 2007; DE WIT et al., 2011). Essa alta variabilidade dificulta a detecção molecular e identificação de estirpes variantes (UMAR et al., 2016).

Portanto, a rápida e eficiente detecção e identificação do VBI são imprescindíveis para que medidas mais eficazes de controle sejam prontamente tomadas assim como a utilização de métodos de diagnóstico sensíveis, específicos e de baixo custo. Para isso, as técnicas de biologia molecular como a reação em cadeia da polimerase antecedida pela transcrição reversa (RT-PCR) é uma ferramenta muito utilizada na detecção de diversos RNA vírus, inclusive o VBI e, em conjunto com o sequenciamento de genes específicos, pode ser rotineiramente utilizada com o objetivo de discriminar diferentes estirpes virais (DE WIT, 2000; FRAGA et al., 2013; UMAR et al., 2016; VILLARREAL et al., 2007; WORTHINGTON et al., 2008).

Apesar de a RT-PCR ser uma técnica extremamente sensível, a sua sensibilidade pode ser aumentada através da realização da técnica de "Nested"-PCR que combina alta sensibilidade com condições de execução simples e barata (WORTHINGTON et al., 2008).

Em vista disso, foi desenvolvida e aplicada uma nova técnica de Nested-RT-PCR, utilizando um conjunto de oligonucleotídeos iniciadores construídos neste estudo e específicos para parearem com sequências de nucleotídeos da Região Hipervariável-3 (HVR3) do gene S1 apresentadas pelas estirpes de genótipo brasileiro do VBI (genótipo BR-I). A eficácia deste método na diferenciação das estirpes BR-I do VBI foi analisada através da detecção e identificação direta do vírus em amostras previamente isoladas de ovos embrionados infectados e em amostras clínicas colhidas de aves comerciais.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. Bronquite infecciosa aviária

A Bronquite Infecciosa (BI) é causada por um coronavírus aviário chamado Vírus da Bronquite Infecciosa (VBI), que foi o primeiro coronavírus a ser isolado. A descoberta desse vírus foi na década de 1930 no estado de Dakota do Norte, localizada nos Estados Unidos. No Brasil a ocorrência de BI foi relatada pela primeira vez em 1956 por Hipólito (1957) e desde então, vem acometendo aves de todas as idades, em diferentes regiões do país (DE WIT et al., 2011).

Este vírus é um patógeno de grande importância na avicultura, sendo capaz de provocar infecções em frangos de corte, galinhas poedeiras comerciais e aves reprodutoras. A bronquite infecciosa é uma doença aguda, contagiosa caracterizada principalmente por sinais respiratórios, mas dependendo da estirpe pode ser acometido o trato urogenital causando lesões nos rins e/ou ovidutos e gônadas, trazendo como principais consequências uma diminuição na produção de carne e ovos (CAVANAGH, 2007). A organização Mundial de Saúde Animal (OIE) mantém a Bronquite Infecciosa em sua lista de doenças de importância socioeconômica (OIE, 2017).

### 2.2. Etiologia e Morfologia Viral

O VBI pertence à ordem *Nidovirales*, família *Coronaviridae*, gênero *Gammacoronavirus* (ICTV, 2015). Seu genoma é composto por uma fita simples de RNA de sentido positivo, não segmentado com 27,6 kilobases (Kb) e que codifica proteínas estruturais e não estruturais do vírus. Dessa forma, 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) (CAVANAGH, 2007; DE WIT et al., 2011).

O gene S codifica a principal proteína estrutural do VBI, a glicoproteína S que é clivada, após ser traduzida, em duas subunidades, a subunidade amino-terminal S1 composta por aproximadamente 500 aminoácidos e a subunidade S2 compreendendo cerca de 600 aminoácidos (CAVANAGH, 2007).

O gene S1 é o mais variável entre as diferentes estirpes e/ou isolados do VBI e pode apresentar mutações em torno de 20 a 25% na sua sequência de nucleotídeos, que acarretam alterações nas sequências de aminoácidos da glicoproteína S1 e, conseqüentemente na antigenicidade e no tropismo tecidual das estirpes variantes do VBI (CAVANAGH, 2007).

A subunidade da glicoproteína S1 é responsável pela infectividade viral, devido à presença de sítios que se ligam a receptores de células alvo da infecção pelo VBI. Ademais, as mutações neste gene modificam importantes epítomos alvos de anticorpos vírus-neutralizantes de vírus, gerando uma variedade de tipos antigênicos e, conseqüentemente de diferentes sorotipos e variantes do VBI. Essas variações gênicas especialmente aquelas correspondentes à codificação dos aminoácidos que compõem os principais sítios de vírus-neutralização desse vírus, constituem-se no principal mecanismo do VBI para escapar das respostas imunes de defesa do hospedeiro (CAVANAGH, 2007; DE WIT et al., 2011; JACKWOOD et al., 2012).

### **2.3. Patogenia**

O Vírus da Bronquite Infecciosa infecta principalmente as células do trato respiratório. No entanto, algumas variantes e diversos isolados de campo desse vírus podem afetar os sistemas reprodutivo, urinário e digestório dessas aves, o que dá origem aos diferentes patótipos desse vírus. A patogênese da doença difere de acordo com o sistema ou o tipo celular constituinte de determinado órgão envolvido, assim como na dependência da estirpe do vírus (CAVANAGH, 2007). Porém, a replicação desses vírus em um dado tipo celular, pode nem sempre desencadear alterações patológicas significativas, mesmo quando este tecido apresente altos títulos virais (CAVANAGH, 2005; COOK, 2001).

Apesar de as galinhas (*Gallus gallus*) e os faisões (*Phasianus spp.*) serem os hospedeiros naturais para o VBI, coronavírus geneticamente similares ao VBI foram identificados em outras espécies de aves incluindo pavão, peru, ganso, pinguim, pombo, pato, codorna, galinha d'Angola e papagaio (CAVANAGH, 2007).

Uma certa similaridade antigênica também é vista entre o coronavírus de peru (TCoV) e o vírus da bronquite infecciosa aviária, porém foi proposto que

estes coronavírus isolados sejam considerados espécies distintas, (GUY, 2000). Isso porque o coronavírus de perus apresenta um tropismo específico para o epitélio intestinal e para a bursa de Fabricius (NAQI et al., 1972; PATEL et al., 1975) enquanto que o VBI nas galinhas domésticas além de se replicar em órgãos do sistema digestório (DHINAKAR RAJ; JONES, 1997; PENSAERT; LAMBRECHTS, 1994) o órgão de eleição e que apresenta sinais clínicos mais frequentes da infecção por esse vírus nesta espécie é o trato respiratório (CAVANAGH; NAQI, 1997). Ademais Guy et al. (1999) relataram em seus experimentos que um isolado de coronavírus de perus, geneticamente relacionado ao VBI, se replicou no trato intestinal e na bursa de Fabricius de pintos inoculados com 1 dia de idade e estas aves não apresentaram sinais clínicos. Além disso, esse coronavírus de perus não foi detectado nos tecidos respiratórios. Estes achados reforçam a hipótese de que os coronavírus de perus, embora geneticamente semelhantes ao VBI, são espécies distintas (CAVANAGH et al., 2001).

O VBI é transmitido principalmente por via aerógena através das secreções respiratórias, partículas em suspensão no ar de fezes de aves infectadas e objetos contaminados. A presença desse vírus foi identificada em células da traqueia, rim e bursa de Fabricius 24 horas após a transmissão via aerossol (CAVANAGH; GELB, 2008).

A capacidade do VBI para se replicar em diferentes tecidos de galinhas pode estar relacionada em parte ao fato de a ligação desse vírus às células hospedeiras depender da interação de sítios da glicoproteína S1 do ácido N-acetilneuramínico (ácido siálico) presentes em moléculas receptoras na superfície de células alvo da infecção por esse vírus (CAVANAGH, 2007). Quando aves são acometidas durante as primeiras semanas de vida, são mais comumente observados os sintomas respiratórios, caracterizados por espirros, estertores da traqueia e elevada taxa de morbidade e mortalidade variável, mas frequentemente mais reduzida. Nas poedeiras e reprodutoras a enfermidade ocasiona queda de postura e/ou produção de ovos defeituosos, com baixa mortalidade (FRANÇA et al., 2011; LIM et al., 2011). As amostras virais que sofrem tropismo podem causar lesões renais como nefrite e nefrose, gerando um quadro de diarreia e desidratação (CAVANAGH, 2007; MEIR et al., 2004;

VILARREAL et al., 2007). Em geral, a BI ocorre sob diferentes formas clínicas e patológicas.

#### **2.4. Epidemiologia**

A bronquite infecciosa (BI) é uma doença infecciosa globalmente distribuída e sua taxa de disseminação depende principalmente da virulência do vírus e o estado imunitário das aves (CAVANAGH, 2007).

A investigação epidemiológica das infecções pelo VBI demonstrou que a disseminação de uma estirpe em uma área ou de um país para outro pode ser em parte devida, à introdução imprópria de aves comerciais no lote, por aves migratórias, ou pela capacidade de alguns genótipos do VBI de se evadir das respostas imunes induzidas por vacinas formuladas apenas com a estirpe americana que é muito usada como estirpe de referência vacinal (Massachusetts) do VBI (CAVANAGH, 2005; LIU et al., 2006; UMAR et al., 2016).

Lixo contaminado, calçados, vestuário, utensílios, equipamentos e pessoas em contato com as aves são fontes potenciais de transmissão viral de forma indireta e têm sido implicados na propagação do VBI a grandes distâncias (ERBECK; MCMURRAY, 1998; MCMARTIN, 1993; PURCHASE et al., 1966).

O VBI pode ser inativado por poucos dias em temperatura ambiente, ou a 56°C durante 15 minutos ou 45°C durante 90 minutos (OTSUKI et al., 1979), ou ainda pelo uso de desinfetantes comuns, incluindo álcool 70%, clorofórmio, fenol, formalina e iodo (JORDAN; NASSAR, 1973).

O VBI é, provavelmente, o vírus que se dissemina mais rapidamente entre as aves, não necessitando de vetores para sua transmissão. A transmissão pode ocorrer por contato direto ou indireto, de aves contaminadas para aves saudáveis. (DI FÁBIO; ROSSINI, 2000).

#### **2.5. Diagnóstico**

O sucesso no diagnóstico do VBI é influenciado por uma série de fatores, o nível de imunidade da ave que apresenta grande influência no tempo e quantidade de VBI que podem ser detectados, a escolha dos órgãos para o exame diagnóstico em determinada fase de infecção, e uma possível

imunossupressão onde aves mais jovens apresentam maior susceptibilidade à infecção já que o nível de imunidade adquirida ao VBI influencia o período e quantidade em que o vírus pode ser detectado (DE WIT, 2000).

O diagnóstico da Bronquite Infecciosa é realizado através de exames laboratoriais baseados na detecção do próprio vírus ou de anticorpos anti-virais produzidos após a infecção com esse vírus. As técnicas mais comumente utilizadas baseiam-se no isolamento do vírus em ovos embrionados livres de patógenos específicos (“Specific Pathogen Free” - SPF), que é reconhecida como uma técnica laboriosa e demorada. Alternativamente pode ser feito o isolamento do VBI em culturas de anéis traqueais ou em culturas celulares, seguido da identificação antigênica dos isolados através de provas sorológicas como as técnicas de vírus-neutralização (VN) e inibição da hemaglutinação (HI). O teste de precipitação com gel de agar (AGPT), o teste imunoenzimático (ELISA) e de imunofluorescência (IFA) são técnicas que também podem ser usadas para detectar antígenos do VBI (DE WIT, 2000; FELIPPE et al., 2010; HOPKINS, 1974; MONTASSIER, 2008; VILLARREAL et al., 2007).

A utilização de técnicas de diagnóstico molecular, como a RT-PCR convencional e PCR em tempo real se constituem em outros métodos utilizados para a detecção de genes ou regiões gênicas do VBI (DE WIT, 2000; FRAGA et al., 2016; HANDBERG et al., 1999; MARANDINO et al., 2016; MONTASSIER, 2010; OKINO et al., 2005; WORTHINGTON et al., 2008)

Embora a técnica de RT-PCR convencional seja bastante sensível, a sensibilidade pode ser aumentada através da realização da técnica de Nested-RT-PCR, com condições de execução simples e baratas (WORTHINGTON et al., 2008).

Recentemente foram descritas técnicas quantitativas de RT-PCR em tempo real utilizando sondas fluorescentes para a detecção e identificação de estirpes do VBI a partir do genótipo BR e/ou genótipo I da América do Sul (SAI) (MARANDINO et al., 2016). No entanto, a RT-PCR em Tempo Real requer condições de laboratório mais complexas e dispendiosas que não estão disponíveis em muitas regiões consideradas endêmicas, onde os plantéis avícolas são afetados por infecções pelo VBI (MARANDINO et al., 2016; MEIR et al., 2010).

## **2.6. Prevenção e Controle**

Devido a sua natureza altamente infecciosa, muitas vezes, as medidas preventivas são insuficientes para evitar infecções pelo VBI. O controle é baseado na implementação de medidas de biossegurança (isolamento, limpeza, desinfecção das instalações e vazios sanitários), (CAVANAGH, 2007; MONTASSIER, 2008) e na vacinação. Estas práticas são adotadas nas criações avícolas industriais, principalmente as situadas em regiões endêmicas, utilizando-se vacinas vivas e inativadas (BERNARDINO, 2004; COOK, 2008).

As vacinas contra o VBI podem ser administradas via água, spray, óculo-nasal e intramuscular, sendo administradas por spray e pela via intramuscular as vias de eleição para vacinas vivas e inativadas, respectivamente (BACK, 2010; BERNARDINO, 2004; MONTASSIER, 2008).

## **2.7. A Bronquite Infecciosa e suas variantes no Mundo e no Brasil**

Acreditava-se que as primeiras variantes do VBI pertenciam à estirpe Connecticut, a qual não apresentava reação de neutralização e nem proteção vacinal com relação à estirpe vacinal Massachusetts. Desde então muitos relatos sobre o surgimento de outras variantes do VBI foram descritos em todo o mundo. No início do século XXI, Jia et al. (2002), identificou que duas amostras dentre 40 amostras de VBI isoladas entre 1930 e 1940 não pertenciam ao grupo Massachusetts, pela utilização de anticorpos monoclonais e pela análise molecular de uma parte do gene da subunidade S1 da glicoproteína de espícula (S). Este fato levou a uma maior atenção para a busca e a identificação de estirpes variantes do VBI e o conhecimento de que muitos países possuem suas próprias estirpes, denominadas indígenas, ou autóctones (MONTASSIER, 2010).

Os *Coronavírus* têm uma alta frequência de mutação. Portanto a evolução do vírus da Bronquite Infecciosa é um fenômeno relativamente frequente, em virtude da sua alta capacidade de variabilidade genética, com o aparecimento de alterações localizadas principalmente nos genes codificadores das proteínas estruturais S e N e também em algumas proteínas não estruturais (NSPs) (JACKWOOD et al., 2012).

As análises nos genes S e N têm sido amplamente empregadas para identificar genótipos de VBI e caracterizar a evolução filogenética e epidemiológica das estirpes desse vírus (LIU et al., 2006). A maioria dos estudos utiliza o gene codificador da subunidade S1 da glicoproteína S para a genotipagem, pois a subunidade S1 se constitui no principal antígeno viral indutor de anticorpos vírus-neutralizantes (DE WIT et al., 2011).

Parte das alterações genéticas que ocorrem nas estirpes do VBI levam a mudanças fenotípicas, como por exemplo, nas propriedades antigênicas e naquelas associadas à virulência e/ou à patogenicidade desse mesmo agente infeccioso. Nesse sentido, verifica-se que já foram descritos mais de 20 sorotipos do VBI em diversas partes do mundo, o que demonstra o elevado poder de variabilidade entre as estirpes do VBI (CAVANAGH; NAQI, 2003; CAVANAGH et al., 1992; GELB et al., 1991; KUSTERS et al., 1989).

Além disso, as análises genéticas das estirpes e novos isolados do VBI são também úteis para a seleção dos programas de vacinação mais apropriados, utilizando estirpes vacinais atenuadas ou inativadas desse vírus (FARSANG et al., 2002).

A maioria dos estudos trata da variação genética entre estirpes do VBI oriundas de regiões geográficas ou países específicos, sem realizar análises filodinâmicas para explorar o comportamento temporal do vírus (LIU et al., 2006). A dinâmica da evolução do VBI na América do Sul é particularmente pouco estudada. Os primeiros isolados do VBI (sorotipo Massachusetts) foram relatados no Brasil na década de 1950 (HIPÓLITO, 1957). As estirpes desse sorotipo parecem ter predominado até meados da década de 80, quando foi reportado o isolamento da primeira variante no Brasil (Arkansas) (BRANDEN; DA SILVA, 1986). Em meados de 1990, foram isolados pelo menos cinco tipos antigenicamente diferentes do vírus em todo o Brasil, principalmente nos grandes pólos avícolas, com maior concentração de produtores, na região sul do país (DI FABIO et al., 2000).

Outros genótipos do VBI foram identificados no Brasil, na Argentina e na Colômbia através da análise parcial da sequência de nucleotídeos da região 5' do gene S1 (FELIPPE et al., 2010, RIMONDI et al., 2009, VILLARREAL et al., 2007).

Mais recentemente, várias linhagens de VBI foram identificadas diferenciando-se da linhagem americana de referência (estirpe Massachusetts) nas regiões hipervariáveis (HVRs) do gene S1. Dois genótipos sul-americanos foram denominados de América do Sul I (SAI), que no Brasil havia sido previamente identificado como genótipo BR-I, e Ásia /América do Sul II (A /SAII), na Argentina e no Uruguai (MARANDINO et al., 2015).

De acordo com os estudos de Marandino et al. (2015), o genótipo SAI surgiu na década de 1960 e é uma linhagem exclusiva da América do Sul. Já, o genótipo A/SAII pode ter surgido na Ásia por volta de 1995 antes de ser introduzido na América do Sul. Estes genótipos sul americanos diferem das estirpes Massachusetts que estão incluídas nas formulações de vacinas vivas atenuadas usadas na maioria dos países da América do Sul (MARANDINO et al., 2015).

No estudo mencionado acima, o genótipo Massachusetts incluiu sete estirpes de campo brasileiras e vacinais, com semelhança entre seus nucleotídeos e aminoácidos em torno de 97,5 a 99,9%, e de 95,8 a 99,8%, respectivamente. No entanto, a sua similaridade entre as sequências do gene S1 dessas estirpes do genótipo Massachusetts com os genótipos SAI e A/SAII é inferior a 79% (MARANDINO et al., 2015).

Ademais, a análise filogenética mostrou também que as estirpes pertencentes ao genótipo SAI não foram detectadas em outros países sul-americanos que não a Argentina, o Brasil e o Uruguai, enquanto que as estirpes do genótipo A/SAII parecem estar circulando no Chile e na Colômbia, além de Argentina e Uruguai, mas não no Brasil (MARANDINO et al., 2015)

É interessante destacar para entender um pouco melhor a evolução do VBI, que níveis médios ou baixos de imunidade resultam na maior taxa de emergência de variantes desse vírus, porque um estado de imunidade mais efetiva limita severamente a replicação do vírus e, assim, a geração de variantes genéticas (TORO et al., 2012)

A capacidade dos genótipos SAI e A/SAII de evadir as respostas imunes induzidas pelas vacinas formuladas com a estirpe Massachusetts do VBI pode explicar sua disseminação bem-sucedida em vários países da América do Sul (MARANDINO et al., 2015). Ademais, essa alta variabilidade dificulta a

detecção molecular e identificação de variantes do vírus da bronquite infecciosa (UMAR et al., 2016).

### **2.8. O Coronavírus do VBI em outras aves**

Os coronavírus antigenicamente relacionados com o VBI foram relatados em outras espécies aviárias (BARR et al., 1988).

Uma pesquisa realizada na Austrália isolou um coronavírus de pombos usando ovos de galinha embrionados. Os pombos apresentavam sinais de dispneia e muco nas comissuras do bico, penas eriçadas e alguns deles foram a óbito. Os testes de HI e vírus-neutralização (DE WIT, 2000) revelaram semelhanças antigênicas desse coronavírus isolado de pombos com o VBI (BARR et al., 1988). Em São Paulo um coronavírus foi isolado a partir de galinhas d'Angola que apresentaram enterite, pancreatite e nefrite. A análise por microscopia eletrônica revelou nessas aves a presença de partículas virais semelhantes ao coronavírus. Os soros de aves comerciais infectadas a campo e com estirpes vacinais do VBI reagiram fortemente em testes de HI utilizando as estirpes de coronavírus isoladas de galinhas d'Angola. (ITO et al., 1991).

Em ambos os casos descritos foi realizada uma inoculação em embriões e pintos SPF, que reproduziu os sinais típicos do VBI. Nos embriões em que foram inoculados o coronavírus isolados das galinhas d'Angola foram desenvolvidas lesões características do VBI como nanismo e enrolamento. Já os pintinhos foram inoculados com o vírus dos pombos e apresentaram estertores respiratórios entre os sinais apresentados. A inoculação experimental de pintos com o vírus presente nas galinhas d'Angola não foi relatada (BARR et al., 1988, ITO et al., 1991).

Os coronavírus de faisões (*Phasianus Colchicus*) são geneticamente relacionados com o vírus da bronquite infecciosa de aves domésticas, e com o coronavírus de perus (CAVANAGH et al., 2002).

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo geral**

- Desenvolver um método de Nested-RT-PCR para amplificar uma região do gene S1 utilizando um conjunto de oligonucleotídeos iniciadores, construídos neste estudo, específicos para sequências de nucleotídeos localizadas na HVR-3 do gene S1 do genótipo BR-I do VBI, a fim de detectar e identificar estirpes desse genótipo presentes em amostras previamente isoladas e em amostras clínicas.

#### **3.2 Objetivos específicos**

- Avaliar a sensibilidade e especificidade analíticas do novo método de Nested-RT-PCR (BR-Nested-RT-PCR); na detecção e diferenciação estirpes variantes brasileiras de amostras clínicas do VBI.

- Comparar os resultados obtidos na técnica BR-Nested-RT-PCR com aqueles obtidos na técnica de Nested-RT-PCR universal, para a detecção de isolados do VBI presentes em amostras colhidas de frangos de corte com ou sem sinais clínicos de doenças respiratórias.

### **4 MATERIAL E MÉTODOS**

#### **4.1. Vírus e amostras clínicas**

Foram propagadas seis estirpes de referência do VBI (Arkansas, Connecticut, Beaudette, M41, H120 e Ma5) e um isolado de campo brasileiro deste vírus (IBVPR05 / número de acesso no Genbank GQ169242) classificado no genótipo BR-I, em ovos embrionados SPF de nove a 11 dias de idade, de acordo com o método descrito por Owen et al. (1991). O fluido córion-alantóico (LCA) foi colhido 48 h após a inoculação dos ovos embrionados (hpi) e armazenado a -80 ° C. Adicionalmente, o título infectante medido como doses infecciosas de 50% para embriões (EID<sub>50</sub>) foi determinado para a estirpe IBVPR05 de acordo com o método descrito por Villegas (1998).

Além disso, 90 aves provenientes de granjas comerciais localizadas na região Nordeste do estado de São Paulo foram utilizadas neste estudo. A primeira coleta foi realizada em uma granja comercial de frangos de corte, no mês de dezembro de 2015, na qual foram coletadas 46 amostras de suabe cloacal e 46 de suabe orofaríngeal de aves que apresentavam sinais respiratórios sugestivos de infecção pelo VBI. Uma segunda coleta foi realizada em fevereiro de 2016 e a terceira coleta foi realizada em março de 2016, em duas outras granjas comerciais de frangos de corte sem sinais respiratórios, localizadas na região Nordeste do estado de São Paulo. No entanto, nesse caso, as aves não apresentavam sinais clínicos sugestivos de VBI. Em ambas as granjas foram colhidas apenas amostras de suabe cloacal sendo 24 e 20 amostras, respectivamente.

Os lotes de aves dessas 3 granjas de frangos comerciais eram constituídos por machos e fêmeas, com aproximadamente 40 dias de idade e todas as aves foram vacinadas com um dia de idade e revacinadas aos 14 dias de idade com estirpe viva atenuada da vacina Massachusetts.

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Uso de Animais (CEUA) da Unesp, Jaboticabal-SP, Brasil (Protocolo 17545/15). Os suabes utilizados eram estéreis e após ser realizada a coleta o material foi colocado em tubos de 2 ml contendo Meio Triptose-fosfato (TPB) com antibióticos (Penicilina-Estreptomicina, Thermo Fisher, Massachusetts, EUA) e antifúngico (Anfotericin B<sup>®</sup>, Cristália, São Paulo, Brasil), e armazenados a -80°C.

#### **4.2 Extração do RNA total**

O RNA total foi extraído de LCA infectado com VBI contendo diferentes estirpes do vírus e de amostras de suabes oro-faríngeal e cloacal colhidas das aves, utilizando o kit Reagent TRIzol (Thermo Fisher, Massachusetts, EUA) conforme as instruções do fabricante na proporção de 1:1, ou seja, 500µL de Trizol LS Reagent foram adicionados a 500µL do LCA em microtubos de 1,5 ml. Depois se acrescentou 100µL de clorofórmio.

A mistura foi homogeneizada por 15 s no vórtex e incubada por cinco minutos a temperatura ambiente (TA). As amostras foram centrifugadas a 12000xg durante 15 min a 4°C. Aproximadamente 630µL do sobrenadante foram separados e transferidos para outro microtubo (1,5ml). Em seguida

adicionou-se igual volume de isopropanol e a mistura foi agitada por inversão manual 10 vezes. Após incubação durante 15 min a TA, os microtubos foram centrifugados a 12000xg por 15 min a 4°C. Ao final desse tempo, descartou-se o isopropanol e se acrescentou 1 mL de etanol 75%. Os microtubos foram homogeneizados por inversão e centrifugados a 7 500xg por 5 min a 4°C. Para finalizar foi descartado o etanol e após a secagem do pellet a amostra foi ressuspensa em 15µL de água tratada com dietil - pirocarbonate 0,1% (DEPC) autoclavada.

### **4.3 Reação de transcrição reversa (RT)**

Após a extração do RNA pelo método de TRIzol, (MONTASSIER et al., 2008), foi realizada a síntese do cDNA utilizando a enzima M-MLV (Sigma-Aldrich<sup>®</sup>, Missouri, EUA), conforme as recomendações do fabricante.

A reação foi realizada em um Termociclador PTC – 200 Peltier Thermal Cycler (MJ Research, Minesota, EUA). Resumidamente, incubou-se a 70°C durante dez min: 5 µL do RNA genômico extraído, dNTP 0,5mM (Invitrogen, Life Technologies, Califórnia, EUA), 100u de Random Primer (Sigma-Aldrich<sup>®</sup>, Missouri, EUA) e 3µL de água DEPC. Em seguida, acrescentou-se o tampão 10x da RT (Sigma-Aldrich<sup>®</sup>, Missouri, EUA), 100u de inibidor de ribonucleases (Sigma-Aldrich<sup>®</sup>, Missouri, EUA), 40u da enzima M-MLV (Sigma-Aldrich<sup>®</sup>, Missouri, EUA), e para completar o volume foi adicionado 6,5 µL de água DEPC, incubando-se a 25°C durante 10 min, 37° C por mais 50 min e finalizando com 85°C por 10 min. O volume final da reação foi de 20µL. O DNA complementar (cDNA) obtido foi armazenado a –20°C para uso posterior.

### **4.4 Oligonucleotídeos iniciadores**

O gene S1 foi escolhido devido a sua grande hipervariabilidade sujeito a mutações em sua sequência de nucleotídeos, promovendo alterações de antigenicidade e nas estirpes mutantes do VBI (Figura 1).

Foram utilizados dois pares de oligonucleotídeos iniciadores ou “primers”, localizados na subunidade S1 do gene S do VBI descritos por Worthington et al. (2008) (Tabela 1). O primeiro par (SX1+/SX2-) foi utilizado com o objetivo de amplificar a sequência gênica da região mais externa à região de hipervariabilidade. O segundo par de oligonucleotídeos iniciadores

(SX3+/SX4-) foi utilizado para a realização da primeira reação de Nested-RT-PCR.

Para a realização da Nested-RT-PCR específica para a detecção do genótipo BR-I, foi usado para a primeira PCR o par mais externo de oligonucleotídeos iniciadores (SX1+/SX2-) descritos por Worthington et al. (2008) e, para a segunda PCR, foi utilizado um segundo par de oligonucleotídeos mais internos (BRV1+/BRV2-) específicos para a HVR-3 do gene S1 de estirpes do genótipo BR-I (Tabela 1 e Figura 1) foi construído e utilizado para a reação de Nested-RT-PCR. O desenho desse segundo par de oligonucleotídeos foi elaborado com base em alinhamentos realizados no programa computacional BioEdit Sequence Alignment Editor (versão 7.2.5) usando a ferramenta ClustalW multiple alignment, de sequências de nucleotídeos do gene S1 encontradas no GenBank, as quais estão localizadas na HVR-3 do gene S1 e com auxílio dos programas GeneRunner (versão 3.05) e Oligo Analyzer (versão 1.0.2) para verificar T<sub>m</sub> (temperatura de “Melting” ou de dissociação) e porcentagem das bases C e G.

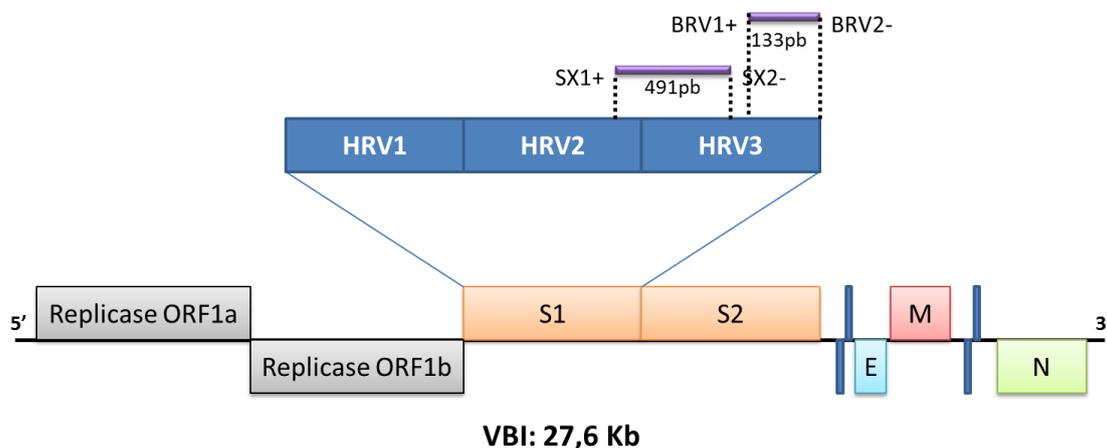


Figura 1. Representação esquemática do Genoma do VBI adaptado de Cavanagh (2005) e Gorbalenya et al. (2006). Gene S e subunidades S1 e S2, com as regiões de hipervariabilidade (HRV1, HRV2 e HVR3) localizadas no gene S1, com as respectivas combinações de oligonucleotídeos iniciadores utilizados na técnica de BR-Nested-RT-PCR

Tabela 1. Oligonucleotídeos utilizados para a reação de RT-PCR e Nested-RT-PCR.

VBI oligonucleotídeos	Posição no gene S1	Referência	Fragmento amplificado
SX1+	677 ao 698	Worthington et al. (2008) <sup>a</sup>	491pb
SX2-	1148 ao 1168	Worthington et al. (2008) <sup>a</sup>	
SX3+	705 ao 725	Worthington et al. (2008) <sup>a</sup>	393pb
SX4-	1075 ao 1097	Worthington et al. (2008) <sup>a</sup>	
BRV1+	945 ao 969	Construído neste trabalho <sup>b</sup>	133pb
BRV2-	1055 ao 1078	Construído neste trabalho <sup>b</sup>	

+ = "Forward"

- = "Reverse"

<sup>a</sup>Número de acesso no GenBank Z83979. – Worthington et al. (2008).<sup>b</sup> Localização dos "oligonucleotídeos iniciadores" com base na sequência gênica da estirpe M41 do VBI cadastrada no GenBank (número de acesso: KM067901).

#### 4.5 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

A primeira amplificação pela técnica convencional de PCR foi realizada seguindo as recomendações de Worthington et al. (2008), usando-se 2 µL do cDNA obtido na técnica de RT, dNTP 0,2mM (Thermo Fisher, Massachusetts, EUA), 10µM de cada "primer" (SX1+ e SX2-), tampão da PCR 10x, cloreto de magnésio 1,5mM e 1,0U Taq DNA polimerase (Thermo Fisher, Massachusetts, EUA), completando-se com água para um volume final de 25µL. A reação foi incubada em um Termociclador PTC – 200 Peltier Thermal Cycler (MJ Research, Minnesota EUA), com um ciclo inicial de 95°C por cinco min; para a desnaturação do cDNA, seguindo-se 35 ciclos constituídos por uma etapa de desnaturação a 94°C por um min; uma segunda etapa de pareamento a 48°C por um min e meio; uma terceira etapa para a extensão a 72°C por dois min e meio; e finalizando com um ciclo de 72°C por dez min, para realizar a extensão final.

#### 4.6 Técnica de Nested-RT-PCR universal

A técnica de Nested-RT-PCR universal (Tabela 2) foi realizada também seguindo-se as recomendações de Worthington et al. (2008). Para tanto foi feito uma mistura com 1µL do produto obtido da reação da primeira PCR, dNTPs 0,2mM (Thermo Fisher, Massachusetts, EUA), 10 pmol de cada oligonucleotídeo (SX3+ e SX4-), tampão da PCR 10x, cloreto de magnésio 1,5mM e 1,0U Taq DNA polimerase (Thermo Fisher, Massachusetts, EUA), completando-se com água para um volume final de 25µL. Seguindo as

instruções do protocolo a reação foi colocada em um Termociclador PTC – 200 Peltier Thermal Cycler (MJ Research, Minnesota EUA), com um ciclo inicial de 95°C por cinco min; seguido de 35 ciclos constituídos por uma etapa de desnaturação a 94°C por um min, uma segunda etapa de pareamento a 48°C por um min e meio, uma terceira etapa para a extensão a 72°C por dois min e meio; e um ciclo final 72°C por dez min para a extensão final.

#### 4.7 Técnica de BR-Nested-RT-PCR específica para o genótipo BR-I

Para a realização da técnica de BR-Nested-RT-PCR específica (Tabela 2) foi preparada uma mistura com 1µL do produto obtido da reação da primeira PCR, dNTP 0,2mM (Thermo Fisher, Massachusetts, EUA), 10 pmol de cada oligonucleotídeo (BRV1+ e BRV2-), tampão da PCR 10x, cloreto de magnésio 1,5mM e 1,0U Taq DNA polimerase (Thermo Fisher, Massachusetts, EUA), completando-se com água para um volume final de 25µL. A reação foi incubada em um Termociclador PTC – 200 Peltier Thermal Cycler (MJ Research, Minnesota EUA), sendo que as temperaturas e os passos da PCR foram previamente otimizados, em função, principalmente, das características físico-químicos dos novos oligonucleotídeos iniciadores utilizados (BRV1+ e BRV2-) e utilizando-se um gradiente de temperaturas de pareamento. Dessa forma, essa PCR foi desenvolvida com um ciclo inicial de 95°C por cinco min; seguindo-se 35 ciclos constituídos por uma etapa de desnaturação a 94°C por um min, uma segunda etapa de pareamento em temperatura ideal determinada pelo gradiente (53,1°C) por um min e meio, uma terceira etapa para extensão a 72°C por dois min e meio; finalizando com um ciclo a 72°C por dez min.

Tabela 2. Comparação entre as reações de RT-PCR universal e BR-Nested-RT-PCR.

Protocolo da reação	RT-PCR universal	BR-Nested-RT-PCR
1 ciclo	95°C – 5 min	95°C – 5 min
35 ciclos	94°C– 1 min	94°C – 1 min
	48°C– 1,5 min	53,1°C – 1,5 min
	72°C– 2 min	72°C – 2,5 min
1 ciclo	72°C – 10 min	72°C – 10 min

#### **4.8 Eletroforese em gel de agarose**

Os produtos amplificados nas técnicas de Nested-PCR foram visualizados após separação eletroforética em gel de agarose. Para tanto, foram adicionados 2 µL de tampão amostra [0,05% (p/v) de azul de bromofenol; 40% de sacarose (p/v); Tris-HCl 10 mM e pH 7,8; EDTA 1M e pH 8,0] em 5 µL de produto amplificado, o qual foi analisado através de eletroforese horizontal, em tensão de 75V por aproximadamente uma hora e meia, em gel de agarose a 2% contendo tampão TBE 0,5X (Tris 0,045M, ácido bórico 0,045M e EDTA 0,001M, pH 8,0) corado com SYBR™ Safe (Thermo Fisher, Massachusetts, EUA). Como padrão de tamanho molecular foi utilizado o marcador “100 bp DNA Ladder” ou o marcador “1kb plus” (Thermo Fisher, Massachusetts, EUA). Os géis foram visualizados através de incidência de luz ultravioleta em um transiluminador (Syngene), fotodocumentados com uma câmera digital (Synoptics) e processados por meio do software Gene Link (Syngene).

#### **4.9 Determinação da especificidade analítica**

##### **4.9.1 Determinação da especificidade analítica com amostras de vírus heterólogos**

A especificidade analítica foi avaliada, testando-se na técnica de BR-Nested-RT-PCR os RNAs obtidos da extração de preparações de vírus aviários heterólogos que foram obtidos a partir de amostras virais provenientes de vacinas “vivas” atenuadas, como o vírus da doença de Newcastle (estirpes LaSota, Ulster, B1 e VG), vírus da doença de Gumboro (estirpe S-706), Reovírus (estirpe S-1133), metapneumovírus aviário (estirpe PL) e também foi incluso o DNA extraído da bactéria *Escherichia coli*.

##### **4.9.2 Determinação da especificidade analítica com variantes brasileiras do VBI e as pertencentes a outros genótipos**

Foi realizado um teste complementar para avaliar a especificidade analítica com seis estirpes de referência (H120, Ma5, M41, Connecticut, Arkansas e Beaudette) não pertencentes ao genótipo brasileiro (BR-I) e com uma amostra de campo pertencente a esse genótipo (IBVPR05).

#### **4.10 Determinação da sensibilidade analítica**

##### **4.10.1 Determinação da sensibilidade analítica a partir da diluição do LCA**

Uma amostra do fluido alantóico (LCA) contendo  $10^7$  EID<sub>50/ml</sub> da estirpe IBVPR05 foi diluída em razão seriada de dez vezes, variando de  $10^0$  a  $10^{-6}$ , sendo que estas diluições foram processadas pelas técnicas de extração de RNA, seguida da reação de Transcrição Reversa (RT) e testadas com a BR-Nested-RT-PCR.

##### **4.10.2 Determinação da sensibilidade analítica a partir da diluição do cDNA**

O cDNA obtido após transcrição reversa do RNA extraído de uma amostra original de LCA infectada com IBVPR05 foi quantificado por espectrofotometria utilizando um NanoDrop 1000 (Thermo Scientific, Massachusetts, EUA) e diluído dez vezes (de  $10^0$  a  $10^{-6}$ ) e testando-se na BR-Nested-RT-PCR. O limiar de detecção correspondeu à última diluição da amostra testada que foi capaz de gerar um produto amplificado do tamanho esperado a partir da técnica de BR-Nested-RT-PCR após eletroforese em gel de agarose.

#### **4.11 Análise estatística**

Os valores dos cálculos de sensibilidade, especificidade e acurácia para a BR-Nested-RT-PCR foram determinados por comparação com a Nested-RT-PCR universal. As comparações foram estabelecidas pelo índice kappa, determinado pelo programa de cálculos estatísticos básicos para a versão de teste de diagnóstico (BRAILE et al., 1999).

##### **4.12 Determinação de sequências nucleotídicas e análises do gene S1 de estirpes identificadas no genótipo BR-I pela técnica de BR-Nested-RT-PCR**

Foi purificado o produto de 393 pb gerado pela Nested-RT-PCR universal usando os primers SX3+ e SX4- e de acordo com as recomendações de Worthington et al. (2008) de dois isolados do VBI oriundos de 2 granjas comerciais localizadas na região nordeste do estado de São Paulo, através do

protocolo utilizando o Kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System - Promega.

A mistura do produto da reação juntamente com o tampão de ligação foram transferidos para a coluna do kit Wizard e incubados por 1 min a TA. Em seguida essas colunas foram centrifugadas a 16 000xg por 2 min. Depois de descartar o filtrado foram adicionados 700 µL de Solução de Lavagem acrescida de etanol a 95%. As colunas foram então centrifugadas novamente por 3 min a 16 000xg e descartou-se o filtrado. Repetiu-se a lavagem, com 500 µL da Solução de Lavagem e centrifugação a 16 000xg por mais 5 min. Foi repetido o passo anterior sem a adição da solução apenas para eliminar o etanol residual. Para finalizar, a coluna do kit Wizard foi transferida para um microtubo de 1,5 µL e, em seguida foi adicionado 50 µL de “Nuclease Free Water”, incubado por 1 min a T.A. e centrifugada por 2 min a 16. 000 xg. O DNA eluído foi transferido para o microtubo de 1,5 µL e depois foi armazenado a -20 °C até ser submetido ao sequenciamento de nucleotídeos.

Os produtos purificados contendo DNA foram submetidos a reação bidirecional de sequenciamento do DNA com o uso do kit Big Dye 3.1 (Applied Biosystems, Califórnia, EUA) e em um sequenciador automático ABI-377 (Applied Biosystems, Califórnia, EUA). Os cromatogramas obtidos foram analisados pelo programa Phil's Read Editor e aquelas sequências que proporcionaram escores maiores do que 20 foram montadas com aplicação de “Cap-Contig” e alinhadas com CLUSTALW incluídas no software Bioedit 7.0.9.0, conjuntamente com sequências de genes S1 de diferentes estirpes de VBI obtidas no GenBank. Em seguida, foram feitas as análises filogenéticas dessas sequências alinhadas pelo programa MEGA 6, usando-se o algoritmo de distância Neighbor-Joining e o Método “Kimura-2 Parameter”, a fim de se definir melhor e construir a árvore com as relações filogenéticas das estirpes do VBI.

## **5 RESULTADOS**

### **5.1 Otimização da temperatura de pareamento na PCR dos oligonucleotídeos iniciadores do gene S1 para o Genótipo BR-I do VBI**

Com a finalidade de se obter um melhor resultado na amplificação pela técnica BR-Nested-RT-PCR de produtos do gene S1 de estirpes do genótipo BR-I do VBI, com o uso dos oligonucleotídeos iniciadores BRV1+ e BRV2-, foi investigada a temperatura ideal de pareamento desses oligonucleotídeos, realizando-se essa reação com um gradiente de temperaturas. Assim, foi verificado que a temperatura ideal de pareamento desse novo par de oligonucleotídeos iniciadores correspondeu a 53,1°C (Figura 2).

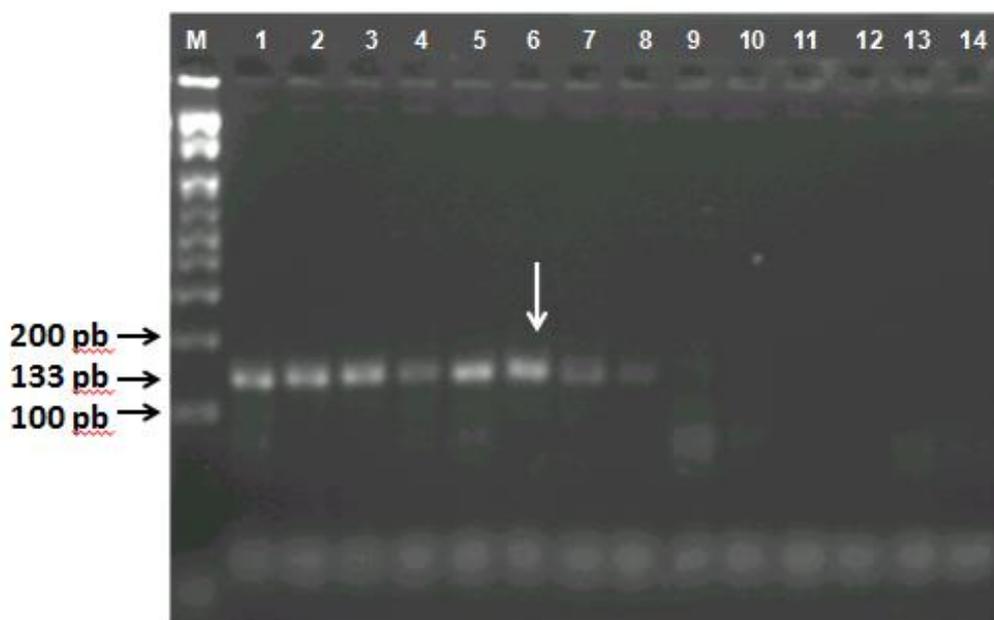


Figura 2 Visualização em gel de agarose dos produtos amplificados após o gradiente de temperatura de pareamento dos oligonucleotídeos iniciadores BRV1+ e BRV2-. Na canaleta 1, 5  $\mu$ L Marcador de tamanho molecular 1Kb plus DNA Ladder (Invitrogen). Nas canaletas de 1 a 12, os produtos de RT-PCR com 5  $\mu$ l provenientes das seguintes temperaturas 48°C (canaleta 1), 48,3°C (canaleta 2), 49,1°C (canaleta 3), 50°C (canaleta 4), 51,4°C (canaleta 5), 53,1°C (canaleta 6), 55,2°C (canaleta 7), 56,9°C (canaleta 8), 58,2°C (canaleta 9), 59,1°C (canaleta 10), 59,8°C (canaleta 11) 60°C (canaleta 12), respectivamente. A melhor temperatura para pareamento desse par de oligonucleotídeos iniciadores correspondeu a 53,1°C (seta branca) que gerou o produto amplificado da canaleta 6. Nas canaletas 13 e 14 foram incluídos os controles negativos da reação.

## 5.2 Determinação da especificidade analítica com vírus heterólogos ao VBI

A especificidade dos pares de oligonucleotídeos (SX3+/SX4- e BRV1+/BRV2-) utilizados neste estudo foi comprovada nas técnicas de Nested-

RT-PCR universal e BR-Nested-RT-PCR, as quais demonstraram a amplificação de fragmento genômico específico do VBI somente nas amostras provenientes do LCA da estirpe H120 e IBVPR05 (número de acesso no Genbank GQ169242) do VBI para o conjunto SX3+/SX4- gerando um produto de 393 pb, e da variante de amostra de campo denominada IBVPR05, para o conjunto BRV1+/BRV2- gerando um produto de 133 pb respectivamente. Não houve amplificação de produto genômico para os 7 vírus aviários heterólogos não relacionados ao VBI, i.e., vírus da doença de Newcastle (estirpes LaSota, Ulster, B1 e VG), vírus da doença de Gumboro (estirpe S-706), Reovírus (estirpe S-1133), metapneumovírus (estirpe PL). Além disso, não ocorreu amplificação de produto genômico para o DNA extraído da bactéria *E. coli*. Os resultados da especificidade analítica para o conjunto BRV1+ e BRV2- encontram-se na Figura 3.

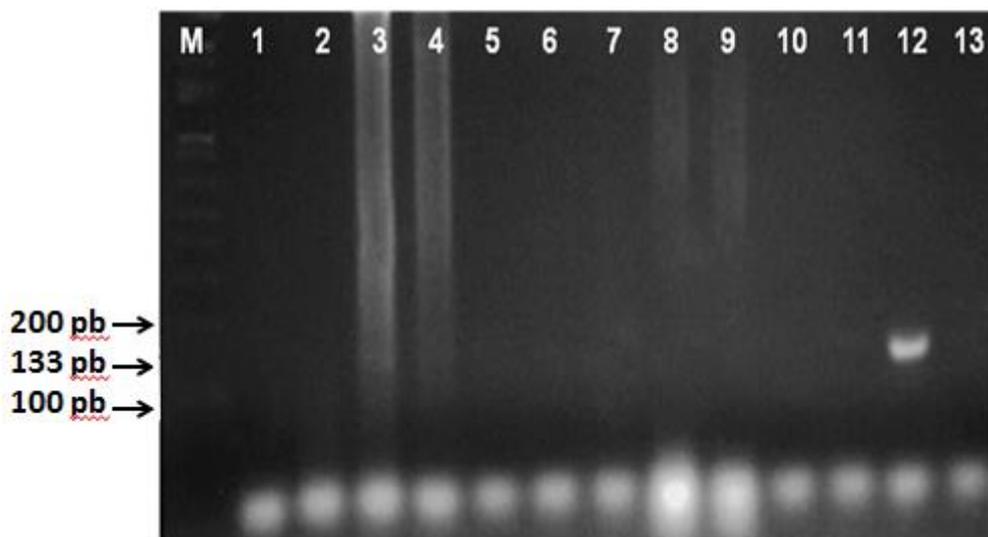


Figura 3. Eletroforese em gel de agarose para a avaliação da especificidade analítica com vírus heterólogos não pertencentes ao VBI. Foi obtido apenas um produto de 133 pb que amplificou a estirpe IBVPR05\* utilizando o conjunto de oligonucleotídeos iniciadores BRV1+/BRV2-. (M) Marcador de tamanho molecular (100 pb), (canaleta 1) estirpe La Sota do VDN, (canaleta 2) estirpe Ulster do VDN, (canaleta 3) estirpe B1 do VDN, (canaleta 4) estirpe VG do VDN, (canaleta 5) estirpe S-706 do VDG, (canaleta 6) estirpe 1133 do Reovírus, (canaleta 7) estirpe PL do Metapneumovírus aviário, (canaletas 8 e 9) *E.coli*, (canaletas 10 e 11) Controles negativos, (canaleta 12) estirpe IBVPR05 do genótipo BR-I do VBI, (canaleta 13) estirpe H120 do genótipo Massachusetts do VBI.

### 5.3 Determinação da especificidade analítica com as diferentes estirpes do VBI

A BR-Nested-RT-PCR gerou um produto de 133 pb apenas para a estirpe IBVPR05 (número de acesso no Genbank GQ169242), não tendo havido a amplificação nessa técnica realizada com o conjunto de “primers” (BRV1+ e BRV2-) para as outras estirpes do VBI que não pertencem ao genótipo BR-I (Figura 4. B). Ao contrário disso, a técnica de Nested-RT-PCR universal utilizando os oligonucleotídeos iniciadores descritos por Worthington et al. (2008) resultou na amplificação de produtos de cerca de 393 pb para todas as estirpes do VBI testadas e pertencentes ou não ao genótipo BR-I (Figura 4. A).

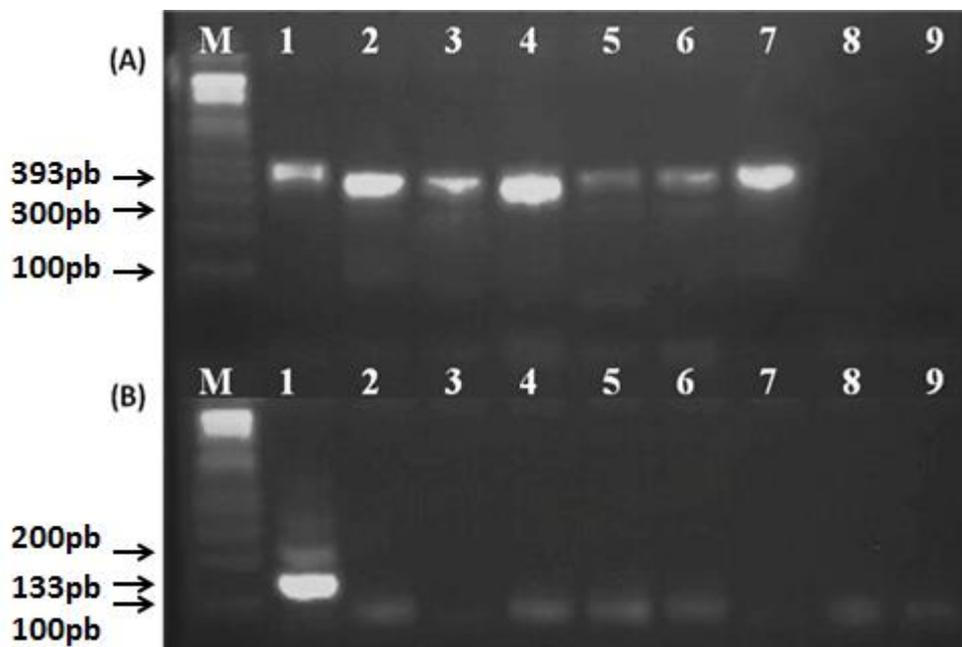


Figura 4. Eletroforese em gel de agarose para a avaliação da especificidade analítica com as diferentes estirpes do VBI. (A) Foram obtidos produtos de 393 pb para a amplificação de todas as estirpes testadas utilizando o conjunto SX3+ /SX4-. (B) Um produto de 133 pb foi obtido para a amplificação de estirpes de genótipo BR utilizando o conjunto BRV1+/BRV2-. (canaleta 1) IBVPR05\*, (canaleta 2) estirpe H120, (canaleta 3) estirpe Ma5, (canaleta 4) estirpe M41, (canaleta 5) estirpe Connecticut, (canaleta 6) estirpe Arkansas, (canaleta 7), estirpe Beaudette, (canaletas 8 e 9) Controle Negativo.

\*IBVPR05 é uma estirpe de genótipo BR.

### 5.4 Determinação da sensibilidade analítica

O limite de detecção da estirpe IBVPR05 pela BR-Nested-RT-PCR foi de 1,5 pg/μL cópias do gene para o cDNA presente na amostra original,

correspondendo a uma diluição  $10^{-5}$ . A sensibilidade analítica a partir do LCA da mesma amostra atingiu uma diluição de  $10^{-4}$ , o que significa uma sensibilidade analítica de  $10^3$  DIE<sub>50</sub> / mL de fluido alantóico infectado com esta estirpe do VBI (Figura 5).

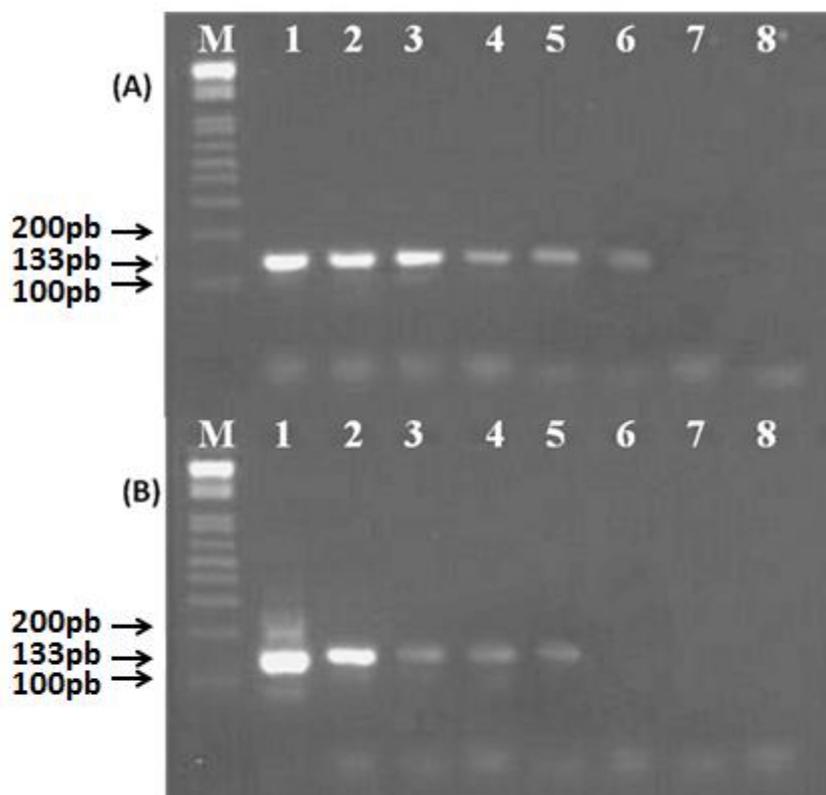


Figura 5. Gel de agarose para a avaliação da sensibilidade analítica da BR-Nested-RT-PCR para a detecção da estirpe IBVPR05. (A) diluições seriadas de razão dez do cDNA da estirpe IBVPR05 a partir de  $10^7$  a  $10^1$  cópias/ $\mu$ l, (canaleta M) DNA ladder 100pb, (canaleta 1)  $10^7$  cópias/ $\mu$ l (não diluído), (canaleta 2 a canaleta 7)  $10^6$ ,  $10^5$ ,  $10^4$ ,  $10^3$ ,  $10^2$  e  $10^1$  cópias/ $\mu$ l, (canaleta 8) Controle negativo. (B) séries de diluição de razão dez, de LCA contendo  $10^7$  DIE<sub>50</sub>/ml, começando de 100 a  $10^0$ . (canaleta M) DNA ladder 100pb, (canaleta 1) 100 (não diluído), (canaleta 2 a canaleta 7)  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$  e  $10^{-6}$  cópias/ $\mu$ l, (canaleta 8) Controle negativo

### 5.5 Comparação da BR-Nested-RT-PCR com a Nested-RT-PCR universal para a detecção do VBI em amostras de campo

No total foram testadas pelas técnicas universal e BR-Nested-RT-PCR 90 amostras de frangos de corte mantidos em 3 granjas comerciais localizadas na região nordeste do estado de São Paulo. A técnica BR-Nested-RT-PCR revelou 44 resultados positivos (48,9%) encontrados em 2 das 3 granjas

analisadas (não foi detectada nenhuma amostra infectada por esta técnica na terceira granja), comparados a 41 resultados positivos (45,6%) detectados nas 3 granjas os quais foram obtidos com a técnica universal de Nested-RT-PCR para o mesmo conjunto de 90 amostras testadas (Figura 6).

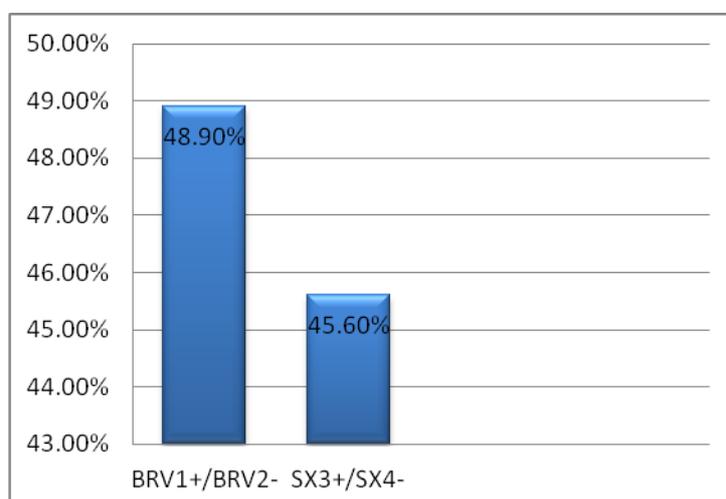


Figura 6 Comparação da BR-Nested-RT-PCR com a Nested-RT-PCR universal para detecção do VBI em amostras de campo

A comparação dos resultados obtidos na técnica de BR-Nested-RT-PCR com os obtidos na técnica de Nested-RT-PCR universal proporcionou uma sensibilidade relativa de 85,4%, uma especificidade relativa de 81,6%, uma acurácia de 83,3% e um coeficiente de concordância (k) de 0,67 (Tabela 3).

Tabela 3. Comparação dos resultados da BR-Nested-RT-PCR e universal para a detecção do Vírus de Bronquite Infecciosa Aviária em amostras de campo colhidas de granjas comerciais de aves de corte

		Nested-RT-PCR universal		
		+	-	
BR-Nested-RT-PCR	+	35	9	44 <sup>b</sup>
	-	6	40	46
		41 <sup>a</sup>	49	90

<sup>a</sup> Resultado obtido das mostras de suabe cloacal/orofaríngeal das 3 granjas analisadas

<sup>b</sup> Resultado obtido das mostras de suabe cloacal/orofaríngeal de 2 das 3 granjas analisadas  
Sensibilidade relativa= 85,4%; Especificidade relativa= 81,6%; Acurácia relativa= 83,3%; Concordância  $\kappa$ = 0.67 [índice Kappa] ( $0.60 > \kappa < 0.80 \Rightarrow$  Boa Concordância).

### **5.6 Análise das sequências nucleotídicas do gene S1 de isolados de VBI identificadas como positivas para o genótipo brasileiro através da técnica de BR-Nested-RT-PCR**

Dois dos isolados do VBI (IBVSP-5-16 e IBVSP06-16) detectados como positivos na técnica BR-Nested-RT-PCR e que foram provenientes de duas granjas de frangos de corte situadas na região Nordeste do estado de São Paulo, as quais foram investigadas nesse estudo, tiveram a HVR3 do gene/proteína S1 sequenciadas (região entre os nucleotídeos 742 e 1090) e apresentaram, depois de alinhadas pelo programa Clustal W, 100% de identidade entre si nas suas sequências de nucleotídeos e de aminoácidos. Além disso, as sequências de nucleotídeos e aminoácidos, respectivamente do gene / proteína S1 desses dois isolados mostraram percentagens de identidade variando de 95,6% a 98,5% e de 93,1% a 99,1%, respectivamente, com sequências de nucleotídeos e de aminoácidos respectivamente do gene / proteína S1 de estirpes / isolados de campo brasileiros classificadas no genótipo BR-I, tais como, UFMG 1141 (GENBANK JX182783.1), Ae (GENBANK KP202366.1), Ar (GENBANK KP202371.1), Be (GENBANK KP202367.1), Ck (GENBANK KP202368.1), IBV / BRASIL / 2008 / USP-19 (GENBANK FJ791260.1), e IBV/BRAZIL/2008/USP-28 (GENBANK FJ791269.1) (Figura 7). Por outro lado, as sequências de nucleotídeos e de aminoácidos do gene / proteína S1 desses dois isolados do VBI revelaram-se bastante distintas daquelas das demais estirpes do VBI analisadas e que pertencem a outros genótipos desse vírus, apresentando percentagens de identidade variando de 79,8% a 82,1% e de 79,3% a 81,8%, respectivamente para as sequências de nucleotídeos e de aminoácidos dessas estirpes, em razão da ocorrência de um número significativamente elevado de mutações, especialmente observadas nessa estirpe em comparação com as estirpes de referência dos genótipos Massachusetts, Connecticut, ArkDPI, 793B, D274 e Q1 do VBI (Figuras 7 e Tabela 3). Além disso, verifica-se que as sequências dos oligonucleotídeos BRV1+ e BRV2- são totalmente conservadas entre esses dois isolados do VBI e os outros isolados do genótipo BR-I do VBI (Figura 7).

As análises filogenéticas baseadas no algoritmo de distância Neighbor-Joining e no método de Kimura – 2 Parameter foram então realizadas para as

sequências nucleotídicas obtidas da porção intermediária do gene S1 (região entre os nucleotídeos 730 e 1085) desses dois isolados de campo do VBI (IBVSP05-16S e IBVSP06-16) em conjunto com 34 outras sequências dessa mesma região do gene S1 de estirpes do VBI já depositadas no GENBANK. Verifica-se que a topologia da árvore filogenética baseada nessas sequências nucleotídicas levou a separação de 10 grupos / genótipos principais filogeneticamente distintos (Figura 8); sendo que o grupo identificado como BR-I reuniu com elevado bootstrap (99) os dois isolados investigados no presente estudo juntamente com nove estirpes e/ou isolados do genótipo BR-I do VBI anteriormente estudados.

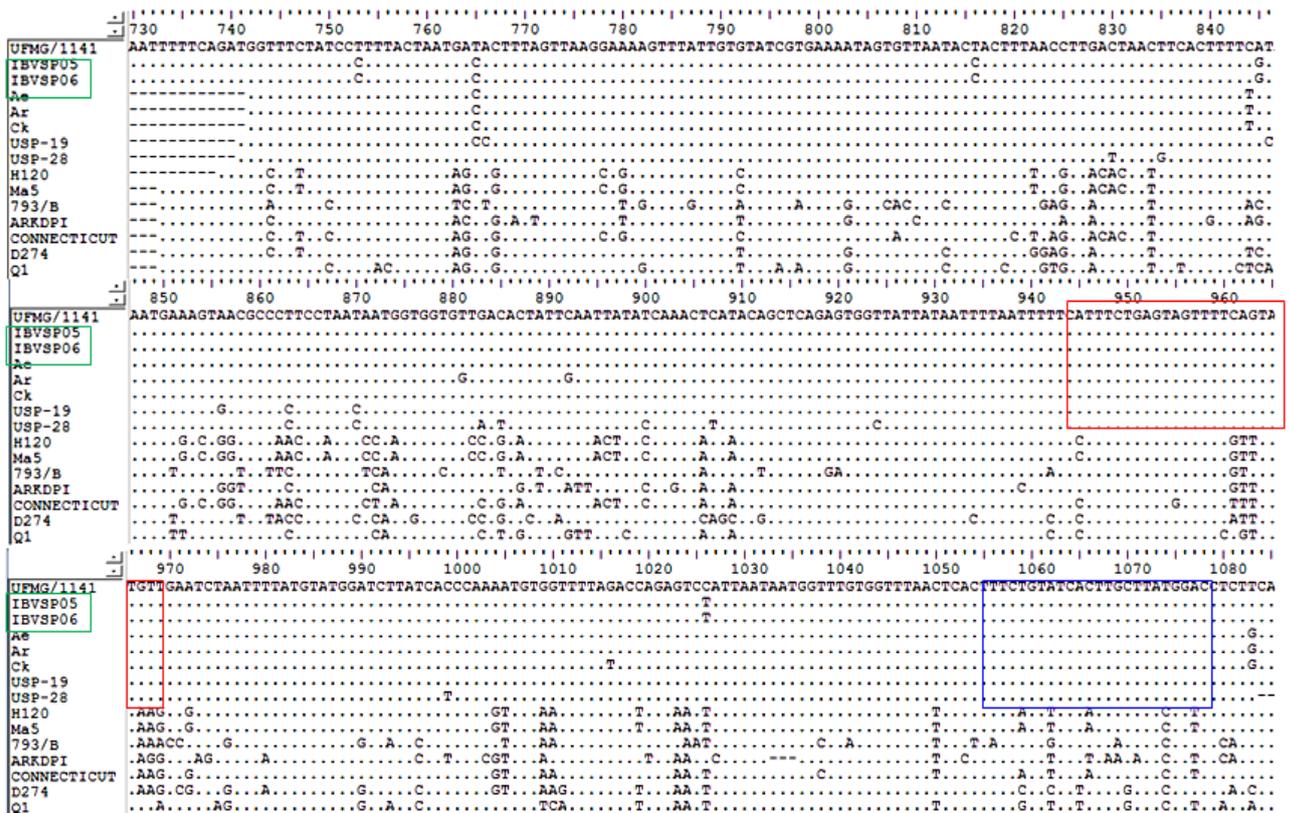


Figura 7 Alinhamento múltiplo das seqüências de nucleotídeos da porção intermediária do gene S1, obtidas dos dois isolados de campo do VBI (IBVSP05-16 e IBVSP06-16) destacados com molduras de linhas verdes, juntamente com as seqüências desse mesmo gene de estirpes de referência obtidas do GENBANK. Os resíduos de nucleotídeos idênticos são representados por pontos (.) e as posições das deleções ou ausências de sequenciamento são representadas por traços (-). A moldura com linhas vermelhas destaca a seqüência de nucleotídeos do oligonucleotídeo iniciador BRV1+ e a moldura com linhas azuis destaca a seqüência de nucleotídeos do oligonucleotídeo iniciador BRV2-.

**Tabela 4.** Identidades de nucleotídeos (diagonal debaixo) e de aminoácidos (diagonal de cima), em valores percentuais de seqüências parciais do gene / proteína S1 dos dois novos isolados de campo do VBI em relação às seqüências análogas de estirpes de genótipos de referência desse vírus.

	UFMG/1141	IBVSP05	IBVSP06	Ae	Ar	Ck	USP-19	USP-28	H120	Ma5	M41	793B	ARK DPI	CONN	D274	Q1
UFMG/1141	ID	99.10%	99.10%	99.10%	97.40%	98.20%	96.50%	93.90%	81.80%	81.80%	80.10%	79.30%	80.10%	81.00%	81.00%	81.80%
IBVSP05	98.50%	ID	100.00%	99.10%	97.40%	98.20%	95.60%	93.10%	81.00%	81.00%	79.30%	79.30%	80.10%	80.10%	81.00%	81.80%
IBVSP06	98.50%	100.00%	ID	99.10%	97.40%	98.20%	95.60%	93.10%	81.00%	81.00%	79.30%	79.30%	80.10%	80.10%	81.00%	81.80%
Ae	99.10%	98.20%	98.20%	ID	98.20%	99.10%	95.60%	93.10%	81.00%	81.00%	79.30%	79.30%	80.10%	80.10%	81.00%	81.80%
Ar	98.50%	97.60%	97.60%	99.40%	ID	97.40%	93.90%	91.30%	79.30%	79.30%	77.50%	77.50%	79.30%	78.40%	79.30%	81.00%
Ck	98.80%	97.90%	97.90%	99.70%	99.10%	ID	94.80%	92.20%	80.10%	80.10%	78.40%	78.40%	79.30%	79.30%	80.10%	81.00%
USP-19	98.20%	97.30%	97.30%	97.90%	97.30%	97.60%	ID	93.90%	81.00%	81.00%	79.30%	77.50%	80.10%	80.10%	79.30%	81.00%
USP-28	97.00%	95.60%	95.60%	96.10%	95.60%	95.90%	96.40%	ID	79.30%	79.30%	77.50%	74.10%	76.70%	78.40%	77.50%	79.30%
H120	83.00%	82.10%	82.10%	82.10%	81.50%	81.80%	82.10%	81.80%	ID	100.00%	98.20%	74.10%	77.50%	93.90%	79.30%	77.50%
Ma5	83.00%	82.10%	82.10%	82.10%	81.50%	81.80%	82.10%	81.80%	100.00%	ID	98.20%	74.10%	77.50%	93.90%	79.30%	77.50%
M41	82.70%	81.80%	81.80%	81.80%	81.20%	81.50%	81.80%	81.50%	98.50%	98.50%	ID	72.40%	75.80%	92.20%	77.50%	75.80%
793B	80.70%	80.10%	80.10%	80.10%	79.50%	79.80%	79.80%	78.90%	76.30%	76.30%	76.60%	ID	78.40%	74.10%	81.80%	78.40%
ARKDPI	80.90%	80.10%	80.10%	80.40%	80.10%	80.10%	80.40%	79.80%	80.90%	80.90%	80.70%	78.00%	ID	75.80%	80.10%	81.00%
CONN	82.10%	81.20%	81.20%	81.20%	80.70%	80.90%	81.20%	80.90%	96.70%	96.70%	97.00%	77.10%	79.50%	ID	77.50%	75.80%
D274	80.40%	79.80%	79.80%	80.40%	79.80%	80.10%	79.80%	79.50%	83.30%	83.30%	82.40%	81.50%	78.00%	81.50%	ID	83.30%
Q1	81.20%	80.70%	80.70%	81.20%	81.20%	80.90%	80.40%	79.80%	78.90%	78.90%	78.60%	79.80%	77.70%	78.00%	82.70%	ID

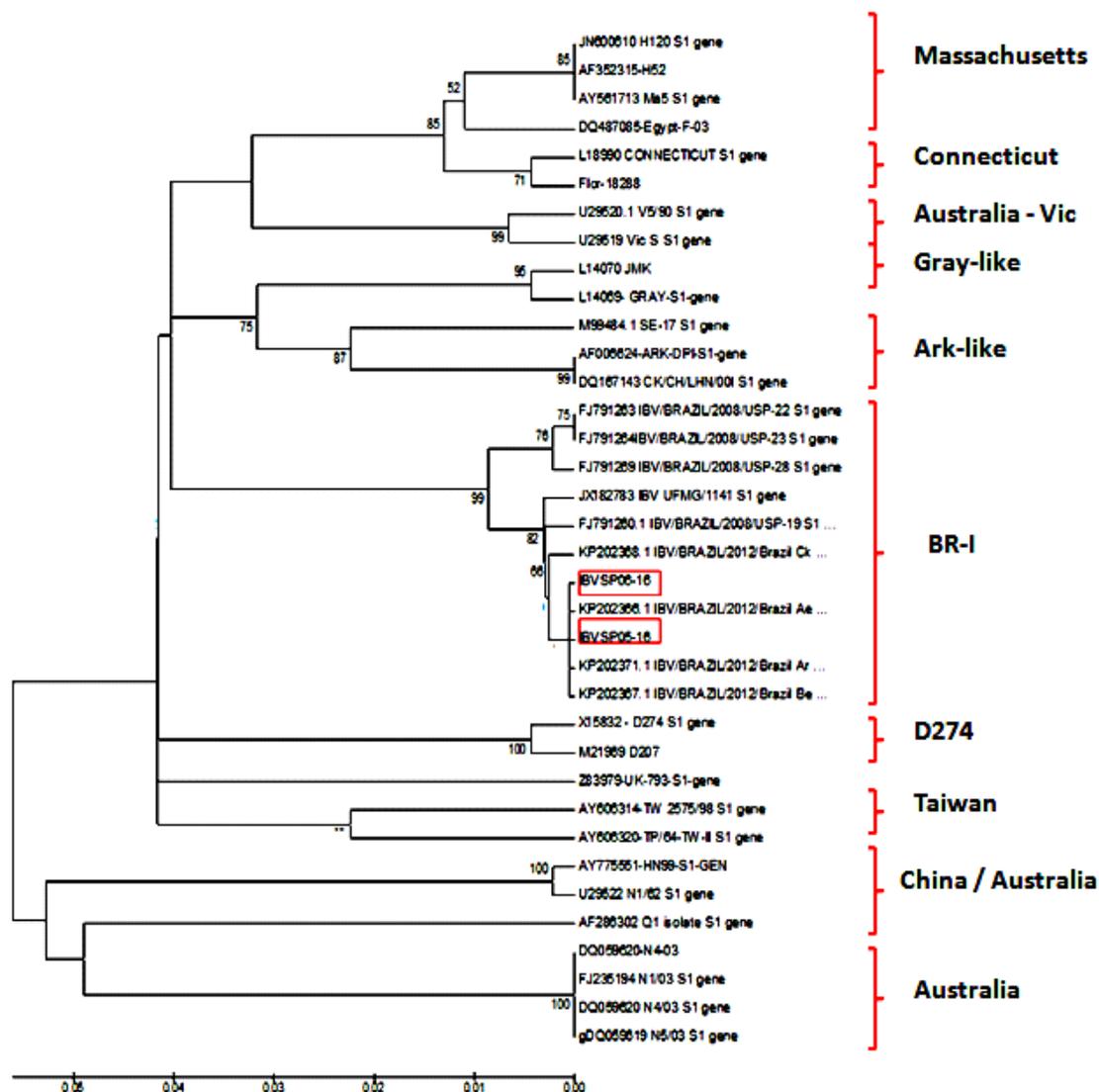


Figura 8 Dendrograma construído a partir da análise filogenética feita com base na sequência parcial de nucleotídeos do gene S1 (nts. 730 a 1085) de diferentes estirpes e isolados do VBI usando o algoritmo Neighbor-Joining e o método de Kimura 2 Parameter. As sequências parciais do gene S1 dos isolados IBVSP05-16 e IBVSP06-16 do VBI foram identificadas com moldura vermelha, sendo apresentadas também as demais sequências desse mesmo gene de outras estirpes de referência do VBI que foram obtidas do GenBank, e que estão identificadas com seus respectivos números e/ou nomes. Os 10 principais genótipos que foram caracterizados nessa análise filogenética estão individualizados por chaves, os quais estão identificados ou em relação às estirpes de referência mais conhecidas que compõem esses genótipos, ou aos países de origem dos quais essas estirpes do VBI são originárias. Os nós em cada chave representam 1000 réplicas para a determinação dos valores de bootstrap (somente valores de bootstrap  $\geq 50$  são mostrados). A barra embaixo do dendrograma representa o número de substituições de nucleotídeos por sítio.

## 6 DISCUSSÃO

Foi desenvolvida uma técnica de Nested-RT-PCR para detectar e diferenciar as estirpes do VBI do genótipo BR-I, provida de elevada sensibilidade e semelhante à obtida nas técnicas de RT-PCR em Tempo Real, permitindo a diferenciação de estirpes do VBI do genótipo BR-I ou genótipo SAI de importância epidemiológica para o Brasil e outros países da América do Sul. Para isso, um par de oligonucleotídeos iniciadores internos específicos para sequência de nucleotídeos da região HVR3 do gene S1 foi desenhado e utilizado junto com um par de oligonucleotídeos iniciadores externos (SX1+ e SX2-) que são específicos para regiões mais conservadas desse mesmo gene e que foram descritos por Worthington et al. (2008).

Foram avaliadas a sensibilidade e especificidade dessa nova técnica de Nested-RT-PCR, a qual foi denominada BR-Nested-RT-PCR, e comparada à da técnica de Nested-RT-PCR universal e também a sua especificidade foi comprovada com base no sequenciamento de nucleotídeos da HVR3 do gene S1 de algumas amostras de campo detectadas e identificadas como BR-I pela técnica BR-Nested-RT-PCR.

Existem outros estudos nos quais foram construídos oligonucleotídeos universais para outras regiões do gene S1 do VBI e que obtiveram a amplificação desse gene do VBI com grande sucesso. Em um desses estudos foram construídos oligonucleotídeos iniciadores flanqueando a região hipervariável 1 (HRV1), descrito por Wang et al. (1996), e um outro estudo muito utilizado para detectar e diferenciar estirpes M41 das estirpes H120 que foi desenvolvido por Okino et al. (2005).

Alguns genótipos emergentes do VBI permanecem restritos à região de origem, enquanto outros são amplamente disseminados e se estabelecem em áreas relativamente próximas a uma dada área geográfica. Além disso a utilização de vacinas que são diferentes destas estirpes circulantes nas criações avícolas podem apresentar um baixo grau de proteção cruzada e não serem capazes apresentar imunidade de proteção cruzada efetiva com relação às estirpes vacinais usadas (CAVANAGH, 2007; JACKWOOD et al., 2012). Nesse sentido, verifica-se que as estirpes do genótipo BR-I (ou SAI), por

exemplo, apresentam baixa similaridade nas sequências do gene S1 com relação a estirpes do genótipo Massachusetts, sugerindo um nível limitado de proteção cruzada, conforme demonstrado em nosso estudo e por Marandino et al. (2015). Isso parece favorecer a evolução do VBI no Brasil e em alguns países sul-americanos, onde existem essas estirpes do VBI e nos quais são rotineiramente usadas vacinas formuladas com estirpes Massachusetts.

Em vista do apresentado acima e apesar de as técnicas atuais de RT-PCR em Tempo Real serem ferramentas úteis para monitorar a emergência e expansão dos genótipos BR-I / SAI (FRAGA et al., 2016; MARANDINO et al., 2016), elas requerem condições laboratoriais mais específicas e a utilização de materiais de alto custo, os quais podem não estar disponíveis em laboratórios de muitas regiões, principalmente em países em desenvolvimento, como os da América do Sul, onde há prevalência do genótipo BR-I ou SAI.

No presente estudo, foram utilizadas apenas as técnicas de Nested-RT-PCR, de forma semelhante a de outros estudos descritos anteriormente (CAVANAGH et al., 1997; FALCONE et al., 1997; HANDBERG et al., 1999; LUCIANO et al., 2003). Ademais, nesses outros estudos foram utilizados conjuntos de oligonucleotídeos iniciadores para outras regiões do gene S1 ou para outros genes do VBI, sendo que o foco desses trabalhos era detecção e não diferenciação de estirpes do VBI.

É válido destacar que no desenvolvimento do método de Nested-RT-PCR com os pares de oligonucleotídeos iniciadores descritos por Worthington et al. (2008) para a detecção um grande número de estirpes do VBI em amostras colhidas de aves comerciais, não foi feita nenhuma análise comparativa desse tipo de técnica com a RT-PCR convencional e nem com outros métodos de Nested-RT-PCR para determinar parâmetros como os de sensibilidade, especificidade, acurácia e concordância, tal como foi feito nesse estudo para a detecção do VBI em um conjunto de amostras colhidas de aves mantidas em criações comerciais.

A necessidade de se dispor de um método rápido e preciso para o diagnóstico do VBI, deve-se à semelhança dos sinais clínicos induzidos em aves por outras enfermidades tais como a laringotraqueite infecciosa das galinhas, a influenza aviária, a doença de Newcastle, a síndrome da cabeça

inchada causada pelo metapneumovírus aviário e ainda enfermidades infecciosas causadas por outros patógenos do trato respiratório de galinhas.

A técnica de BR-Nested-RT-PCR detectou apenas as estirpes do VBI classificadas no genótipo BR-I, sem gerar a amplificação de produtos de estirpes de outros genótipos do VBI (genótipos de Massachusetts, Connecticut e Arkansas), (Figura 4. B) ou de outros vírus heterólogos ao VBI (vírus da doença de Newcastle, doença de Gumboro, metapneumovírus aviário) ou da *E. coli*, confirmando a especificidade do novo método (Figura 3).

Por outro lado, a técnica universal de Nested-RT-PCR, usando o par de oligonucleotídeos iniciadores internos descritos por Worthington et al. (2008) [SX3+ e SX4-] foi capaz de detectar as amostras de aves infectadas com o VBI. Contudo, essa metodologia não foi capaz de discriminar diferentes estirpes do VBI presentes nas amostras positivas para o VBI, já que esses oligonucleotídeos iniciadores pareiam com regiões mais conservadas de HVR-3 do gene S1 desse vírus não conseguem discriminar estirpes pertencentes a diferentes genótipos desse vírus.

Ainda, com a finalidade de confirmar a especificidade da técnica BR-Nested-RT-PCR, realizou-se a análise da sequência de nucleotídeos da HVR-3 do gene S1 de duas amostras positivas para VBI obtidas de 2 granjas comerciais de frangos de corte nas quais haviam sido identificadas amostras positivas pela BR-Nested-RT-PCR. Verifica-se que essa análise revelou uma elevada identidade das sequências parciais do gene S1 desses isolados do VBI com as de outras estirpes do genótipo BR-I disponíveis no GenBank. Em vista disso e dos demais resultados desse estudo, pode-se inferir que a especificidade da BR-Nested-RT-PCR é comparável à relatada pelas técnicas de RT-PCR em Tempo Real utilizadas para a detecção e identificação de estirpes do genótipo BR-I ou SAI do VBI (FRAGA et al., 2016; MARANDINO et al., 2016).

Uma vez que a BR-Nested-RT-PCR apresentou nesse estudo desempenho eficaz na detecção e identificação das estirpes variantes brasileiras do VBI presentes em amostras clínicas esse novo método pode ser recomendado para diagnóstico diferencial de estirpes do genótipo BR-I do VBI em granjas comerciais brasileiras após triagem com a técnica de Nested-RT-PCR universal.

A técnica BR-Nested-RT-PCR apresentou elevada sensibilidade analítica para a detecção de diluições seriadas de razão constante igual a dez de amostras de LCA infectado pela estirpe IBVPR05 do VBI de forma semelhante como foi feito na avaliação das técnicas de RT-PCR em Tempo Real (FRAGA et al., 2016; MARANDINO et al., 2016). Além disso, pode-se considerar que a sensibilidade da técnica BR-Nested-RT-PCR foi semelhante à de uma outra técnica de RT-PCR convencional previamente desenvolvida com o conjunto de oligonucleotídeos iniciadores de genes N (MEIR et al., 2010) e revelou-se mais sensível do que uma outra técnica de RT-PCR convencional realizada com oligonucleotídeos iniciadores para o gene S1 (MEIR et al., 2010).

Adicionalmente, a sensibilidade analítica da técnica BR-Nested-RT-PCR foi semelhante à observada para outras técnicas de Nested-RT-PCR usadas na detecção do VBI. No entanto, essas técnicas não apresentam a mesma especificidade para detectar e identificar as estirpes do genótipo BR-I do VBI, e foram utilizadas mais para a detecção universal de estirpes ou de um dado genótipo do VBI, sem discriminar os seus principais genótipos (OKINO et al., 2005; WORTHINGTON et al., 2008).

A comparação da técnica BR-Nested-RT-PCR com a de Nested-RT-PCR universal demonstrou também uma alta sensibilidade para a primeira técnica usada para a detecção e identificação de estirpes do VBI do genótipo BR-I em amostras de campo colhidas de frangos de corte oriundos de criações comerciais e, ainda, uma boa concordância em relação à técnica universal de Nested-RT-PCR (Tabela 3). Ainda, ao confrontar os resultados da técnica BR-Nested-RT-PCR com dados da literatura, verifica-se que o desempenho geral dessa técnica foi semelhante ao relatado para a técnica de RT-PCR em Tempo Real (FRAGA et al., 2016) na detecção e identificação de estirpes brasileiras do VBI presentes em amostras de aves de criações comerciais.

A alta prevalência de estirpes do genótipo BR-I do VBI em criações avícolas comerciais no Brasil, em conjunto com o uso extensivo de vacinas vivas atenuadas formuladas com estirpes do VBI do genótipo Massachusetts, têm dificultado o diagnóstico molecular direto desse vírus em amostras colhidas de aves comerciais no Brasil e em outros países da América do Sul (DE WIT et al., 2011, FRAGA et al., 2016, MARANDINO et al., 2016). Isso ressalta então a importância de se dispor de uma técnica como a BR-Nested-RT-PCR para

realizar o diagnóstico direto que seja capaz de diferenciar variantes de amostras brasileiras do VBI presentes em amostras clínicas colhidas de aves de criações comerciais.

## 7 CONCLUSÕES

- A técnica de BR-Nested-RT-PCR foi desenvolvida e aplicada neste estudo de forma bem sucedida quando comparada com a técnica universal de Nested-RT-PCR, proporcionando alta sensibilidade e especificidade na detecção de estirpes do genótipo BR-I do VBI presentes em amostras biológicas colhidas de aves mantidas em criações comerciais.

- Esse estudo estabeleceu, pela primeira vez, um método de Nested-RT-PCR dirigido à região HVR-3 do gene S1 específico para a detecção e identificação de estirpes variantes brasileiras do vírus da bronquite infecciosa.

- A técnica BR-Nested-RT-PCR foi capaz de detectar e identificar as estirpes variantes brasileiras do VBI devido à alta especificidade do par de oligonucleotídeos iniciadores que foi construído com base no alinhamento de sequências da HVR3 do gene S1 de amostras isoladas de campo no Brasil e de estirpes de referência de outros genótipos do VBI.

- A técnica BR-Nested-RT-PCR mostrou ser mais acessível e capaz de produzir resultados sensíveis e específicos na detecção e identificação de estirpes do genótipo BR-I do VBI, com um custo potencialmente menor do que a técnica de RT-PCR em Tempo Real, resultando, assim, em uma alternativa atraente para o diagnóstico direto das estirpes brasileiras do VBI em amostras colhidas de aves mantidas em criações avícolas comerciais.

## 8 REFERÊNCIAS

ABPA 2015. Associação Brasileira Proteína Animal. Mercado Mundial. Disponível em: <<http://abpa-br.com.br/setores/avicultura/mercado-mundial>>. Acesso em 10 jan. 2016.

BACK, A. Bronquite Infecciosa das Galinhas. In:\_\_\_\_\_.(Ed.). **Manual de Doenças de Aves**. Cascavel: Integração, p.35-39, 2010.

BARR, D. A.; REECE, R. L.; O'ROURKE, D. Isolation of infectious bronchitis virus from a flock of racing pigeons. **Australian Veterinary Journal**, v.7, p. 228, 1988.

BERNARDINO, A. Programas de Vacinação. In: MENDES, A. A.; NAAS, I. A.; MACARE, M. **Produção de Frangos de Corte**, Campinas: FACTA, 2004.

BRAILE, D. M.; GODOY, M. F. Programas para cálculos estatísticos S diagnóstico. For Windows v. 1.8, 1999. Disponível em: <http://www.braille.com.br/testscientific.htm#braile>.

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

CAVANAGH, D. *Coronaviridae*: a review of coronaviruses and toroviruses. In: \_\_\_\_\_ (Ed.). **Avian Pathology**, Birkhäuser, Basel: Switzerland, p. 1–54, 2005.

CAVANAGH, D. Coronavirus avian infectious bronchitis virus. **Veterinary Research**, London, v. 38, n. 2, p. 281-297, 2007.

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

CAVANAGH, D.; MAWDITT, K.; SHARMA, M.; DRURY, S. E.; AINSWORTH, H. L.; BRITTON, P.; GOUGH, R. E. Detection of a coronavirus from turkey poults in Europe genetically related to infectious bronchitis virus of chickens. **Avian Pathology**, Cambs, v. 30, p. 355-368, 2001.

CAVANAGH, D.; NAQI, S. A. Infectious bronchitis. In: CALNEK, B. W.; BARNES, H. J.; BEARD, C. W.; REID, W. M.; YODER, H. W. **Disease of Poultry**, 10th ed. Iowa State University Press, Ames, 1997, p. 511–526.

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

CAVANAGH, D.; MAWDITT, K.; WELCHMAN, D. D. B.; BRITTON, P.; GOUGH, R. E. Coronaviruses from pheasants (*Phasianus colchicus*) are genetically closely related to coronaviruses of domestic fowl (infectious bronchitis virus) and turkeys," **Avian Pathology**, Cambs, v. 31, n. 1, p. 81-93, 2002.

CAVANAGH, D.; MAWDITT, K.; SHAW, K.; BRITTON, P.; NAYLOR, C. Towards the routine application of nucleic acid technology for avian disease diagnosis. **Acta Veterinaria Hungarica**, Budapeste, v.45, p. 281-298, 1997.

CAVANAGH, D.; GELB, J. J. R. Infectious Bronchitis. In: SAIF, Y. M. **Diseases of Poultry**. 12th ed. Iowa: Blackwell Publishing, 2008. p. 117–135.

COOK, J. K. A. Coronaviridae. In: PATTISON, M.; BRADBURY, A. **Poultry diseases**. 6<sup>th</sup> ed. Amsterdam: Saunders Elsevier; 2008. p. 340-349.

COOK, J. K.; CHESHER, J.; BAXENDALE, W.; GREENWOOD, N.; HUGGINS, M. B.; ORBELL, S. J. Protection of chickens against renal damage caused by a nephropathogenic infectious bronchitis virus, **Avian Pathology**, Cambs, v. 30, p. 423–426, 2001.

DE WIT, J. J. S.; COOK, J. K. A.; VAN DER HEIJDEN, H. M. J. F. Infectious bronchitis virus variants: a review of the history, current situation and control measures. **Avian Pathology**, Cambs, v. 40, n. 3, 2011. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1080/03079457.2011.566260>>.

DE WIT, J. J. Detection of infectious bronchitis virus, **Avian Pathology**, Cambs v. 29, n. 2, p. 71-93, 2000. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1080/03079450094108>>.

DHINAKAR, R. A. J. G.; JONES, R. C. Infectious bronchitis virus: immunopathogenesis of infection in the chicken. **Avian Pathology**, Huntingdon, 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, p. 293-300, 2000.

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 Diseases**, EUA, v. 42, p. 613-617, 1998.

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

FARSANG, A; ROS, C; RENSTRÖM, L. H. M; BAULE, C; SOÓS, T; BELÁK S. Molecular epizootiology of infectious bronchitis virus in Sweden indicating the involvement of a vaccine strain, **Avian Pathology**, Cambs, v. 31, p. 229–236, 2002.

FELIPPE, P. A.; DA SILVA, L. H.; SANTOS, M. M.; SPILKI, F. R.; ARNS, C. W. Genetic diversity of avian infectious bronchitis virus isolated from domestic chicken flocks and coronaviruses from feral pigeons in Brazil between 2003 and 2009. **Avian Diseases**, EUA, v. 54, n. 4, p. 1191-6, 2010.

FRAGA, A. P.; IKUTA, N.; FONSECA, A. S. K.; SPILKI, F. R.; BALESTRIN, E.; RODRIGUES, C. D.; CANAL, C. W.; LUNGE, V. R. A Real-Time Reverse-Transcription Polymerase Chain Reaction for Differentiation of Massachusetts Vaccine and Brazilian Field Genotypes of Avian Infectious Bronchitis Virus, **Avian Diseases**, EUA, v. 60, n.1, p. 16-21, 2016.

FRAGA, A. P.; BALESTRIN, E.; IKUTA, N.; FONSECA, A. S.; SPILKI, F. R.; CANAL, C. W.; LUNGE, V. R. Emergence of a new genotype of avian infectious bronchitis virus in Brazil. **Avian Diseases**, EUA, v. 57, n. 2, p. 225-32, 2013.

FRANÇA, M.; WOOLCOCK, P. R.; Y. U. M.; JACKWOOD, M. W; SHIVAPRASAD, H. L. Nephritis Associated with Infectious Bronchitis Virus Cal99 Variant in Game Chickens. **Avian Diseases**, EUA, v. 55, n. 3, p. 422–428, 2011.

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

GORBALENYA, A. E.; ENJUANES, L.; ZIEBUHR, J.; SNIJDER, E. J. *Nidovirales*: Evolving the largest RNA virus genome. **Virus Research**, Amsterdam, v. 117, p. 17-37, 2006.

GUY, J. S.; BARNES, H. J.; SMITH, L. G.; BRESLIN, J. J. Experimental infection of specific-pathogen-free chickens with turkey coronavirus. In: Proceedings of the 48th Western Poultry Disease Conference, p. 91–92, 1999.

GUY, J. S. Turkey coronavirus is more closely related to avian infectious bronchitis virus than to mammalian coronaviruses: a review, **Avian Pathology**, Cambs, v. 29, n. 3, p. 207–212, 2000.

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

HIPÓLITO, O. Isolamento e identificação do vírus da bronquite infecciosa das galinhas no Brasil. **Arquivos da Escola Superior de Veterinária do Estado de Minas Gerais**. (MG), v. 10, p. 131-151, 1957.

HOPKINS, S. R. Serological comparisons of strains of infectious bronchitis virus using plaque purified isolants. **Avian Diseases**, EUA, v. 18, n. 2, p. 231-239, 1974.

ICTV. International Committee on Taxonomy of Viruses. **Virus Taxonomy: 2014**. Disponível em:  
<[http://ictvonline.org/virusTaxonomy.asp?taxnode\\_id520130566](http://ictvonline.org/virusTaxonomy.asp?taxnode_id520130566)>.

ITO, N. M. K.; MIYAJI, C. I.; CLOTILDE, E. M. P. D. M. C. Studies on broiler IBV and IB-like virus from guinea fowl. In: Kaleta, E. F.; Heffels-Redmann, U. **II International Symposium on Infectious Bronchitis**, Giessen, Justus-Liebig University, p. 302-307, 1991.

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

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

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

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

KUSTERS, J. G.; NIESTERS, H.; LENSTRA, J. A.; HORZINEK, M. C.; ZEIJST VAN DER, B. A. M. Phylogeny of antigenic variants of avian coronavirus IBV. **Virology**, New York, v. 169, n. 1, p. 217-221, 1989.

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. **Infection, Genetics and Evolution**, 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.; TONG, G. Z. Genetic diversity of avian infectious bronchitis strains isolated in China between 1995 and 2004. **Archives of Virology**, Springer Vienna, v. 151, p. 1133-1148. 2006.

LUCIANO, R. L.; MONTASSIER, M. F. S.; GIBERTONI, A. M.; OKINO, C. H.; BRENTANO, L.; MONTASSIER, H. J. Desenvolvimento da técnica de PCR-ELISA para a detecção do Vírus da Bronquite Infecciosa das Aves (VBI). **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, Campinas, SP, Resumo: Trabalho apresentado na Conferência APINCO 2003 de Ciência e Tecnologia Avícolas, 2003, 99 p.

MARANDINO, A.; PEREDA, A.; TOMÁS, G.; HERNÁNDEZ, M.; IRAOLA, G.; CRAIG, M. I.; HERNÁNDEZ, D.; BANDA, A.; VILLEGAS, P.; PANZERA, Y.; PÉREZ, R. Phylodynamic analysis of avian infectious bronchitis virus in South America. **Journal of General Virology**, Meulemans, G., Boschmans, v. 96, p. 1340–1346., 2015.

MARANDINO, A.; TOMÁS, G.; HERNÁNDEZ, M.; PANZERA, Y.; CRAIG, M. I.; VAGNOZZI, A.; VERA, F.; TECHERA, C.; GRECCO, S.; BANDA, A.; HERNÁNDEZ, D.; PÉREZ, R. Development of RT qPCR assays for the specific identification of two major genotypes of avian infectious bronchitis virus. **Journal of Virological Methods**, Amsterdam, v. 235, p. 21-25, 2016.

MCMARTIN, D.A. Infectious bronchitis. In:\_\_\_\_\_.(Ed.). **Virus infections of birds**. Amsterdam: Elsevier Science Publishers, 1993, p. 249-274.

MEIR, R.; MAHARAT, O.; FARNUSHI, Y.; SIMANOV, L. Development of a real time TaqMan® RT-PCR assay for the detection of infectious bronchitis virus in chickens, and comparison of RT-PCR and virus isolation. **Journal of Virological Methods**, Amsterdam, v. 163, p. 190-194, 2010.

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 Diseases**, EUA, v. 48, p. 635-641, 2004.

MONTASSIER, H. J. Molecular epidemiology and evolution of avian infectious bronchitis virus. . **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, Campinas, v. 12, n. 2, p. 87-96, 2010.

Disponível em: <<https://dx.doi.org/10.1590/S1516-635X2010000200003>>.

MONTASSIER, M. F. S.; BRENTANO, L.; MONTASSIER, H. J.; RICHTZENHAIN, L. J. Genetic grouping of avian infectious bronchitis virus isolated in Brazil based on RT-PCR/RFLP analysis of the S1 gene. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 28, p. 190-194, 2008.

MONTASSIER, M. F. S.; PIZA, V. M. T.; OKINO, C. H.; BRENTANO, L.; RICHTZENHAIN, L. J.; MONTASSIER, H. J. Development of a microplate lectin-capture RT-PCR (MLC-RT-PCR) for the detection of avian infectious bronchitis virus. **Advances in Microbiology**, v. 3, p. 273-279, 2013.

NAQI, S. A.; PANIGRAHY, B.; HALL, C. F. Bursa of Fabricius, a source of bluecomb infectious agent. **Avian Diseases**, EUA , v.16, p. 937-939, 1972.

OIE. ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE ANIMAL. Avian Infectious Bronchitis. 2017. Disponível em: <<http://www.oie.int>>. Acesso em 10 fev. 2017.

OKINO, C. H.; MONTASSIER, M. F. S.; GIVISIEZ, P. E. N.; FURUYAMA, C. R. A. G.; BRENTANO, L.; MONTASSIER, H. J. Infectious bronchitis virus: detection and vaccine strain differentiation by semi-nested RT-PCR. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, Campinas, v. 7, p. 59-66, 2005.

OTSUKI, K.; YAMAMOTO, H.; TSUBOKURA, M. Studies on avian infectious bronchitis virus (IBV). I. Resistance of IBV to chemical and physical treatments. **Archives of Virology**, Springer Vienna, 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 Pathology**, Jacksonville, v. 20, n. 4, p. 663-73, 1991.

PATEL, B. L.; DESHMUKH, D. R.; POMEROY, B. S. Fluorescent antibody test for rapid diagnosis of coronaviral enteritis of turkeys (bluecomb). **American Journal of Veterinary Research**, Chicago, v. 36, p. 1265-7, 1975.

PENSAERT, M., LAMBRECHTS, C. Vaccination of chickens against a Belgian nephropathogenic strain of infectious bronchitis virus B1648 using attenuated homologous and heterologous strains, **Avian Pathology**, Huntingdon, v. 23, n. 4, p. 631–641, 1994.

PURCHASE, H. G.; CUNNINGHAM, C. H.; BURMESTER, B. R. Identification and epizootiology of infectious bronchitis in a closed flock. **Avian Diseases**, EUA, v. 10, p. 111-121, 1966.

RIMONDI, A. M. I; CRAIG, A; VAGNOZZI, G; KONIG, M. Delamer, and A. Pareda. Molecular characterization of avian infectious bronchitis virus strains from outbreaks in Argentina (2001–2008). **Avian Pathology**, CrossRef, PubMedv, 38, p. 149–153, 2009.

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

UMAR, S.; SHAH, M. A. A.; MUNIR, M. T.; AHSAN, U.; KABOUDI, K. Infectious bronchitis virus: evolution and vaccination. **World's Poultry Science Journal**, Cambridge Core, v. 72, n. 1, 2016.

Disponível em: < <http://dx.doi.org/101017/S0043933915002706>>.

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

VILLEGAS, P. Titration of Biological Suspensions. In: SWANEY, D. E., GLISSON, J. R.; JACKWOOD, M. W.; PEARSON, J. E.; REED, W. M. **A laboratory manual for the isolation and identification of avian pathogens**. Pennsylvania: The American Association of Avian Pathologists; 1998, p. 248-254.

WANG, C. H.; HSIEH, M. C.; CHANG, P. C. Isolation, pathogenicity, and H120 protection efficacy of infectious bronchitis viruses isolated in Taiwan. **Avian Diseases**, EUA, v. 40, p. 620-625, 1996.

WORTHINGTON, K. J.; CURRIE, R. J. W.; JONES, R. C. A reverse transcriptase-polymerase chain reaction survey of infectious bronchitis virus genotypes in Western Europe from 2002 to 2006, **Avian Pathology**, Cambs, v. 37, n. 3, 2008.

Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1080/03079450801986529>>.