

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP

CÂMPUS DE JABOTICABAL

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

Thaiane Coelho Kasmanas

Médica Veterinária

2018

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP

CÂMPUS DE JABOTICABAL

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

Discente: Thaiane Coelho Kasmanas

Orientador: Prof. Dr. Helio José Montassier

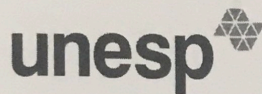
**Dissertação apresentada à Faculdade de
Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp,
Câmpus de Jaboticabal, como parte das
exigências para a obtenção do título de
Mestre em Medicina Veterinária (Patologia
Animal)**

2018

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

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

Essa ficha não pode ser modificada.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Jaboticabal



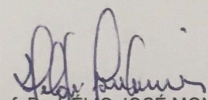
CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

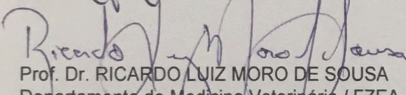
TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: RESPOSTAS IMUNES E PROTEÇÃO INDUZIDAS POR UMA VACINA VIVA ATENUADA FORMULADA COM UMA VARIANTE BRASILEIRA DO VÍRUS DA BRONQUITE INFECCIOSA CONTRA DESAFIOS COM ESTIRPES HOMÓLOGA E HETERÓLOGA

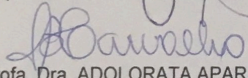
AUTORA: THAIANE COELHO KASMANAS

ORIENTADOR: HÉLIO JOSÉ MONTASSIER

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


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


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


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

Jaboticabal, 20 de novembro de 2018

DADOS CURRICULARES DA AUTORA

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

"Doubt is the beginning of wisdom"

Aristotle (398 BC - 322 BC)

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

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

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

DEDICO

AGRADECIMENTOS

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

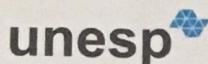
E a todos que colaboraram, direta ou indiretamente, para que eu finalizasse o mestrado.

Muito obrigada!!!

SÚMARIO

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

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



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



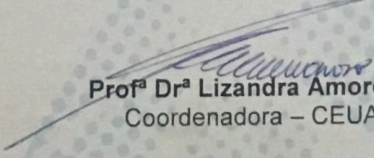
CEUA – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

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

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

Jaboticabal, 06 de abril de 2017.


Prof.ª Dr.ª Lizandra Amoroso
Coordenadora – CEUA

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

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

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

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

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

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

LISTA DE TABELAS

Página

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

LISTA DE FIGURAS

Página

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

1. INTRODUÇÃO

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Bronquite Infecciosa Aviária

A bronquite infecciosa das galinhas (BI) está distribuída mundialmente (OIE, 2013), sendo que seu agente etiológico pode ser considerado como o principal causador de perdas econômicas para a indústria avícola, uma vez que afeta o desempenho tanto da cadeia de produção de carne, como das aves de postura e reprodutoras (Cavanagh, 2007). No Brasil, as perdas podem variar de US\$ 3,57 a US\$ 8,46 para cada 1000 frangos (Assayag Jr et al., 2012; Fernando et al., 2016).

A BI é uma doença de etiologia viral altamente contagiosa, que atinge primariamente o trato respiratório superior das aves da espécie *Gallus gallus*, não obstante tenha sido encontrada infecção pelo VBI em outras espécies de aves não galiformes. A doença foi descrita pela primeira vez na cidade de Dakota do Norte, nos Estados Unidos da América (EUA), em 1930. No Brasil, foi relatada pela primeira vez em 1956 e, desde então, vem acometendo aves de todas as idades, em países onde a produção avícola é intensificada (Assayag, 2004; Capua et al., 1999; Cavanagh e Naqi, 2003; Di Fábio e Rossini, 2000; Hipólito et al., 1973).

Em geral a BI pode causar sinais clínicos leves a moderados, dependendo da linhagem da ave, bem como da estirpe/patotipo do vírus (Pena et al., 2005, Phillips et al., 2012; Fernando et al., 2013, 2015; De Wit et al., 2015). Em geral, a BI ocorre sob diferentes formas clínicas e patológicas, sendo que, quando são acometidas durante as primeiras semanas de vida, as aves apresentam predominantemente sinais respiratórios caracterizados por espirros, estertores úmidos da traqueia e elevada taxa de morbidade e mortalidade. Nas poedeiras e reprodutoras, a enfermidade ocasiona queda de postura e/ou produção de ovos defeituosos, apresentando casca mole, rugosa e despigmentada sem, entretanto, haver uma mortalidade significativa. Além do comprometimento de casca, o VBI causa perda da qualidade interna e diminuição do tamanho do ovo (Dhinakar e Jones, 1997).

Há também alguns patotipos do VBI que causam lesões renais mais proeminentes, e com vários graus de comprometimento renal, relacionados a nefrite e nefrose (King e Cavanagh, 1991; Dhinakar e Jones, 1997; Muneer et al., 2000; Benyeda et al., 2009; Cavanagh, 2005, Jackwood e De Wit, 2013). Nas poedeiras e reprodutoras, durante a fase de recria, pode haver a manifestação tardia de urolitíase e a completa atrofia renal e, nesse caso, a morbidade e a mortalidade são variáveis (2% a 10%). Ainda, há evidências de que a BI possa estar associada a quadros de enterite e de infertilidade em machos (Toffan et al., 2013; Cavanagh e Naqi, 2003; Di Fábio e Rossini, 2000; Jones, 2010; Silva, 1989), mas são necessários mais estudos para melhor elucidar essas atividades do VBI.

Nos últimos anos, diversas estirpes variantes do VBI têm sido isoladas em várias regiões do mundo e associadas ao desenvolvimento de um quadro clínico e patológico que afeta mais os rins. Muitas dessas estirpes nefropatogênicas têm sido classificadas como variantes do VBI, após a análise filogenética de uma parte do

genoma viral, caracterizada como gene S1 (Ziegler et al., 2002; Meir et al., 2004; Bouqdaoui et al., 2005; França et al., 2011; Lima et al., 2011; Fernando et al., 2013, 2017).

Ainda, deve ser considerado que, algumas vezes, a replicação desse vírus em um dado tipo celular não desencadeia alterações patológicas significativas, mesmo quando este tecido apresente altos títulos virais (Cavanagh, 2005; Cavanagh e Naqi, 2003; Ambali e Jones, 1990).

O diagnóstico da BI nos plantéis avícolas passa então a ser dificultado pela enorme possibilidade de sinais clínicos observados em aves infectadas com as diferentes variantes do vírus. Além do diagnóstico da BI, o controle da infecção pelo VBI também é muito difícil, pois no Brasil há apenas algumas vacinas liberadas e muitas estirpes diferentes do VBI circulantes (Balestrin et al., 2014; Fernando et al., 2017; Lopes et al., 2018). Desta forma, a importância de se identificar e conhecer os diferentes sorotipos está em poder utilizar protocolos vacinais que induzam melhor proteção contra as diversas variantes, visto que as respostas imunes primária e secundária estão relacionadas a um sorotipo específico do VBI e não tem reação cruzada com um outro sorotipo (Lima, 2007).

2.2 Etiologia e morfologia viral

O vírus da bronquite infecciosa (VBI) pertence à ordem *Nidovirales*, família *Coronaviridae*, gênero *Gammacoronavirus* (grupo III) (Cavanagh, 2001; De Vries et al., 1997; Jackwood, 2012), e seu genoma é composto por fita simples de RNA não segmentado com sentido positivo (Spaan et al., 1988; De Vries et al., 1997; Cavanagh, 2001; Carstens, 2012; Jackwood, 2012). O genoma deste vírus varia em tamanho de 27 a 30 kb e codifica quatro proteínas estruturais – espícula (S), envelope (E), membrana (M) e nucleocapsídeo (N) – as quais juntamente com o RNA viral, formam o vírion envelopado, além de codificar 15 proteínas não estruturais (Sturman, et al. 1980; Spaan et al., 1988; Cavanagh, 2007; Jackwood, 2012; Phillips et al., 2012).

A proteína N liga-se ao RNA viral formando o complexo ribonucleoproteína (RNP). A proteína do nucleocapsídeo é, por definição, uma fosfoproteína que contém 409 aminoácidos, que formam uma concha protetora e acondicionam o RNA

genômico viral, além de desempenhar importante função na imunidade mediada por células (Seo e Collison, 1997; Seo et al., 1997).

Já as proteínas E e M são proteínas ligadas à membrana que desempenham papel na montagem de novas partículas virais (Lim e Liu, 2001). Com relação à glicoproteína M, sabe-se que ela interage com as proteínas de nucleocapsídeo interno da partícula viral e tem cerca de 230 aminoácidos, sendo que desses, somente 10% estão exteriorizados no envelope viral. Além da glicoproteína M, são encontradas quantidades reduzidas de uma proteína pequena não glicosilada (proteína E) que é formada por aproximadamente 100 aminoácidos. Essas duas proteínas são necessárias para a maturação e formação de partículas virais íntegras e maduras do VBI (Cavanagh, 2007).

A glicoproteína S localiza-se na superfície do vírus, e possui atividades relacionadas à interação com os receptores das células hospedeiras, fusão do envelope viral à membrana da célula hospedeira, além de conter os principais epítomos que induzem anticorpos neutralizantes e definem o sorotipo viral (Koch et al., 1990; Cavanagh e Naqi, 1997; Cavanagh e Gelb, 2008).

A glicoproteína S é clivada pós-tradução em subunidades S1, de 92 kDa, e S2, de 84 kDa, compreendendo cerca de 500 e 600 aminoácidos, respectivamente (Cavanagh, 1983; Cavanagh, 2007). A subunidade S1 é portadora de três regiões hipervariáveis principais que compreendem os principais epítomos vírus-neutralizantes do VBI (Cavanagh et al., 1986; Phillips et al., 2012). Mutações, inserções, deleções e recombinações podem ocorrer no gene codificador da glicoproteína S, especialmente da subunidade S1, contribuindo para geração de uma grande diversidade genética (genótipos) e fenotípica (sorotipos, patotipos e protectotipos) do VBI. Atualmente, mais de 50 diferentes tipos antigênicos e genéticos de VBI foram reconhecidos, sendo que alguns resultaram em um impacto econômico substancial para a indústria avícola e alguns outros ficaram mais restritos a áreas geográficas específicas (De Wit et al., 2011, Jackwood, 2012; Cavanagh e Gelb, 2008).

Após sua descrição nos anos 1930 nos EUA, as pesquisas do VBI têm sido dominadas pela demonstração da extensa variação genética exibida pelo gene da proteína de superfície (S) (Cavanagh, 2007). Entretanto, atualmente sugere-se que a glicoproteína S não é a única responsável pela patogenicidade do VBI. E, nesse

contexto, as proteínas não estruturais (NS), que fazem parte de duas poliproteínas 1a e 1ab, as quais são codificadas por aproximadamente dois terços do genoma viral e formam o complexo transcrição-replicação (RTC), parecem exercer várias atividades biológicas importantes que conferem patogenicidade ao VBI (Phillips et al., 2012). Na verdade, sabe-se que as poliproteínas 1a e 1ab são clivadas pós-tradução em 15 proteínas não estruturais (nsps), nsps 2 a 16, por uma protease tipo papaína (PLP) e também pela protease principal (Mpro), também referida como protease tipo 3C (Van Hemert et al., 2008).

Dessa forma, as diferenças genéticas relatadas na poliproteína 1a e na glicoproteína S, entre estirpes virulentas e atenuadas do VBI, levam a sugerir que as proteínas replicase, além de S, estão envolvidas na definição do patótipo desse vírus (Ammayappan et al., 2009). A análise de consenso do genoma completo para três sorotipos de VBI diferentes (Ark, GA98 e Mass41) mostrou que a passagem em ovos embrionados, para atenuar os vírus, resultou em 34,75 a 43,66% de todas as alterações de aminoácidos ocorrendo na nsp 3 dentro de um tipo de vírus, enquanto que as alterações na glicoproteína S, que se pensa ser a proteína mais variável no VBI, variou de 5,8 a 13,4% de todas as alterações (Phillips et al., 2012).

A partir do ano 2000, genótipos do VBI com características de variantes têm sido identificados em amostras colhidas de aves de um grande número de plantéis brasileiros localizados nas principais regiões de produção avícola do Brasil. As análises filogenéticas com base em sequências do gene S1, mostraram que os genótipos brasileiros apresentavam-se segregados em um grupo filogeneticamente distinto de outros grupos constituídos pelas principais estirpes de referência do VBI dos continentes Europeu e Asiático, dos Estados Unidos e da Austrália, incluindo aquelas que são relacionadas ao sorotipo Massachusetts (Montassier et al., 2006; 2008; Villarreal et al. 2007a/b, 2009; Brandão, 2010, Felipe et al., 2010; Montassier, 2010).

Conforme sugerido por Valastro et al. (2016), dada à rápida evolução do VBI e ao uso de estratégias de vacinação em massa para controlar a BI em todo o mundo, fez-se necessário empregar uma nomenclatura padrão de uso prático e um sistema melhor fundamentado para identificar novas variantes desse vírus. Dentro desta nova classificação proposta, e que foi baseada na filogenia do gene S1, a

linhagem GI-11 é exclusiva da América do Sul, e compreendeu nesse primeiro estudo 13 estirpes brasileiras isoladas entre 1975 e 2009 (Valastro et al., 2016).

Sabe-se que o VBI se replica não só nos epitélios superior e inferior do trato respiratório, mas também em células de muitos tecidos ao longo do trato digestório e de outros locais, por exemplo, rim, testículos e oviduto (Cavanagh, 2007). Esta característica fenotípica está relacionada principalmente com a alta taxa de variabilidade genética do VBI, que resulta no surgimento de estirpes variantes genéticas e, em alguns casos em variantes fenotípicas, com padrões distintos de tropismo tecidual e patogenias diferentes das estirpes de referência desse mesmo vírus (Montassier et al., 2008; Fernando, 2013).

A variabilidade do gene S1 do VBI é reconhecida há aproximadamente meio século como responsável por gerar uma extensa variação antigênica em estirpes do VBI, fato que torna extremamente difícil o controle da infecção por esse vírus, devido à existência de múltiplos sorotipos e variantes antigênicas que podem não apresentar proteção cruzada total com relação às estirpes de referência desse vírus que são usadas na produção de vacinas. Desta forma, esse problema representa um grande desafio para se conseguir alcançar um controle mais efetivo da infecção pelo VBI, por meio de vacinas convencionais que estão sendo rotineiramente usadas na imunoprofilaxia dessa doença infecciosa (Pena et al., 2005; Cavanagh, 2007; Cavanagh e Gelb, 2008; Fernando et al., 2013, 2015, 2017, De Wit et al., 2015).

2.3 Epidemiologia

O vírus da bronquite infecciosa aviária está presente em praticamente todos os países, com exceção da Albânia, Groelândia, Letônia, Mongólia, Geórgia, St. Kitts e Nevis, São Vicente e Granadinas, Trinidad e Tobago e Tajiquistão (OIE, 2015).

A transmissão ocorre por contato direto ou indireto de ave infectada/doente para ave hígida, sem a necessidade de vetores para a disseminação. Assim, o contato direto com aves infectadas é o principal meio de transmissão da infecção pelo VBI, sendo o exsudato traqueo-brônquico e as fezes destas aves, os principais veiculadores do vírus. Ainda, o VBI pode ser transmitido durante qualquer estágio da doença e, dentro de um lote de aves, a transmissão ocorre num período de 18 a 96 horas. O período de incubação da infecção pelo VBI é de 48 a 96 horas, podendo variar de 1 a 11 dias (Lima, 2007).

O VBI consegue ser disseminado horizontalmente, por aerossol ou ingestão. A taxa de disseminação depende principalmente da virulência do vírus e do estado imunitário das aves. O VBI é altamente infeccioso e, em condições naturais, sinais clínicos respiratórios podem se desenvolver em aves que tiveram contato direto num prazo de 36 horas. Alimentos e água potável, que foram contaminadas por fezes, também são fontes de infecção do VBI. Esse vírus pode sobreviver durante um tempo considerável nas fezes, e pode representar uma fonte contínua de reinfeção na fase de convalescença da doença. Lixo contaminado, calçados, vestuário, utensílios, equipamentos e pessoas em contato com as aves também são fontes potenciais de transmissão viral de forma indireta e têm sido implicados na propagação do VBI à grandes distâncias (Erbeck e McMurray, 1998; McMartin, 1993; Purchase et al., 1966).

A transmissão do VBI ocorre principalmente por via aérea, por meio de aerossóis e mais facilmente entre aves mantidas a uma distância de mais de 1,5 m. Ademais, as correntes aéreas também podem contribuir para a distribuição desse vírus entre galpões de uma granja, que são separados por uma distância de até 1.200 m (Cumming, 1970).

O papel da transmissão vertical na epidemiologia do VBI não foi claramente estabelecida. No entanto, a transmissão vertical do VBI foi suspeita em um caso de campo de infecção pelo VBI (McFerran et al., 1971). Esta mesma possibilidade de transmissão foi aventada em um outro estudo realizado em galinhas poedeiras infectadas experimentalmente e que produziram ovos infectados, entre uma e seis semanas após a infecção, sendo que o vírus também foi isolado a partir do primeiro dia de idade dos pintinhos dessas galinhas (Cook, 1971). Isso tudo, trouxe indicações de que o VBI pode ser transmitido verticalmente. Ainda, foi verificado que o VBI pode ser detectado no sêmen de galos de até duas semanas após a inoculação, o que indica a possibilidade de que o oviduto de uma galinha portadora, e também o ovo no oviduto, podem ser infectados com esse sêmen (Fernando, 2013).

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

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

A latência verdadeira, tal como observado em infecções por herpesvírus, não é considerada em infecções pelo VBI. No entanto, em algumas circunstâncias, esse vírus pode persistir durante um período de tempo considerável em algumas aves infectadas, sendo que alguns órgãos, como os rins e trato digestório, especialmente as tonsilas cecais, servem para a manutenção viral mais prolongada (Chong e Apostolov, 1982; El-Houadfi et al., 1986; Alexander et al., 1978). Aves portadoras de infecções persistentes pelo VBI são consideradas as prováveis fontes de re-infecção em poedeiras, que ocorrem em intervalos regulares (Cook, 1968). No entanto, a persistência não se desenvolve para todas as estirpes do VBI, tendo sido evidenciado que algumas apresentam maior capacidade de persistência no hospedeiro.

O VBI é sensível à temperatura, e algumas diferenças podem existir em termos de sensibilidade térmica, mas no geral, a maioria das estirpes são inativadas a 56°C durante 15 minutos ou 45°C durante 90 min (Otsuki et al., 1979). À temperatura ambiente, esse vírus pode sobreviver por poucos dias. A infectividade viral é afetada por armazenagem a 4°C, e para armazenamento a longo prazo, é necessário manter esse vírus a -70°C. Além disso, o VBI é facilmente inativado por muitos desinfetantes comuns, incluindo álcool 70%, clorofórmio, fenol, formalina e iodo (Jordan e Nassar, 1973).

2.4 Diagnóstico

O diagnóstico para bronquite infecciosa aviária requer testes laboratoriais, e a confirmação do diagnóstico pode ser feita pelo isolamento viral em associação com o resultado da sorologia. O diagnóstico pode ser presuntivo, que é realizado analisando o histórico e os sinais clínicos, porém só é possível fazer essa análise no estágio final da doença. Por esse motivo é necessária a realização de exames laboratoriais (Lima, 2007; Cubillos, 2009).

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

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

Os métodos sorológicos mais utilizados no diagnóstico da BI são inibição da hemaglutinação (HI), vírus-neutralização (VN) (Capua et al., 1999) e o ensaio imunoenzimático “Enzyme Linked Immunosorbent Assay” (ELISA) com anticorpos monoclonais ou policlonais. Vários ensaios imunoenzimáticos foram desenvolvidos e aplicados no diagnóstico laboratorial da BI. O ELISA apresenta a vantagem, frente aos demais métodos sorológicos, em virtude do seu baixo limiar de detecção, associado a capacidade de oferecer resultados mais objetivos e reprodutíveis. Portanto, permite a classificação mais rápida das amostras analisadas em níveis de reação imunoenzimática, e possibilita o acompanhamento do grau de imunidade humoral local e sistêmica, de um grande número de aves vacinadas contra o VBI (Cardoso et al., 1996a; Cardoso et al., 1996b; Ignjatovic e Ashton, 1996; Naqi et al., 1993; Zellen e Thorsen, 1986; Garcia e Bankowski, 1981).

As técnicas de biologia molecular constituem, por sua vez, um meio de diagnóstico direto rápido, preciso e específico na detecção do VBI. Como exemplo, a

reação em cadeia pela polimerase, antecedida pela transcrição reversa (RT-PCR), é uma ferramenta muito útil na detecção de diversos RNA-vírus (Cavanagh, 1993; Lee et al., 2001). No caso do VBI, por ser um RNA-vírus, a PCR foi aplicada pela primeira vez de forma bem sucedida depois que o genoma viral foi transformado, por meio da reação de transcrição reversa (RT) em cDNA (Jackwood et al., 1992).

Tradicionalmente, a técnica de vírus neutralização realizada em ovos embrionados foi utilizada para identificar os diferentes sorotipos do VBI. No entanto, a técnica de RT-PCR em conjunto com o sequenciamento de genes específicos pode ser rotineiramente utilizada com o objetivo de discriminar diferentes estirpes do VBI (Keeler et al., 1998; Jackwood et al., 1997; Kwon et al., 1993; Montassier et al., 2008).

O surgimento da PCR em tempo real trouxe a possibilidade de se usar uma ferramenta de diagnóstico ainda mais rápida em relação à técnica de PCR convencional, com um aumento no índice de sensibilidade e reprodutibilidade, além de permitir que seja quantificado o número de cópias virais em diferentes tecidos, possibilitando uma interpretação mais completa e eficiente no que diz respeito à patogenia ao tropismo celular do VBI. Esta técnica deu suporte às análises histopatológicas e imuno-histoquímicas. Com isso, houve, também, uma redução no risco de contaminação do ambiente por manipulação do produto amplificado, já que, a PCR em tempo real permite a simultânea amplificação e detecção da sequência gênica alvo amplificada, pelo uso de marcadores fluorescentes, além de evitar manipulações adicionais na técnica de eletroforese e a exposição ao brometo de etídeo (Callison et al., 2006; Niesters, 2004; Mackay et al., 2002; Jackwood et al., 2003; Beneyeda et al., 2010).

Com o advento destas diferentes técnicas descritas anteriormente, a avicultura atual, principalmente no que se refere às viroses e, dentre elas a BI, pode acessar muitas opções de procedimentos para o diagnóstico laboratorial do VBI. Isso tudo tornou possível então, constatar que, se por um lado, um conjunto significativo de dados sobre genotipagem tenham sido levantados para essas novas variantes de campo do VBI no Brasil e no mundo, por outro lado, muito pouco se conhece sobre as relações entre propriedades genéticas e fenotípicas desses novos isolados brasileiros em comparação com as demais estirpes do VBI, e inclusive aquelas utilizadas na produção de vacinas (Montassier et al., 2008).

Em vista disso, fica evidente a importância de serem feitas investigações adicionais para melhor caracterizar os imunitipos e patotipos desses vírus, e avaliar os possíveis efeitos que as mudanças causadas por mutações e/ou recombinações no gene codificador da glicoproteína S1, ou até mesmo em outros genes desses isolados têm, sobre os perfis de patogenicidade e também sobre o grau de proteção conferido pelas vacinas comerciais disponíveis no mercado contra infecções causadas por estirpes brasileiras do VBI (Montassier et al., 2008).

2.5 Prevenção e controle

Atualmente, o controle e a prevenção da BI são realizados por meio da adoção de medidas de biosseguridade juntamente com os programas de vacinação dos plantéis com vacinas vivas atenuadas e inativadas. A vacinação é uma das mais eficazes abordagens para se induzir proteção contra a infecção pelo VBI (Jordan, 2017; Bande et al., 2015). A Organização Mundial da Saúde Animal, OIE, recomenda que a epidemiologia dos sorotipos de VBI seja levada em consideração na escolha da vacina a ser utilizada em cada país e região geográfica (Bande et al., 2015; OIE, 2013). Em plantéis brasileiros, a vacinação contra BI via de regra é feita com vacinas vivas atenuadas e inativadas, sendo que na maioria das vezes utilizam-se vacinas vivas atenuadas contendo a estirpe Massachusetts (Mass) do VBI, porém surtos de BI por cepas variantes, principalmente da linhagem GI-11 (genótipo BR-1), continuam acontecendo (Balestrin et al., 2014, Fernando et al., 2017).

As vacinas vivas atenuadas administradas diretamente na mucosa, pela via ocular ou spray, conferem maior imunidade local no trato respiratório, enquanto que as vacinas inativadas são mais indicadas para proteção de poedeiras e reprodutoras, e possuem a via intramuscular como padrão de administração para esse tipo de vacina. (Santos, 2009; Cavanagh, 2007; Cavanagh e Gelb, 2008). Os programas de vacinação contra BI podem variar de um país para outro, ou mesmo de uma criação para outra, dentro do mesmo país, dependendo das condições locais ou do levantamento das principais estirpes relatadas como circulantes (Fernando, 2013).

Com a vacinação, a imunidade ativa confere resistência à infecção com amostra de vírus homóloga e pode ou não gerar proteção cruzada contra vírus heterólogo. A resposta imune mediada por células, gerada através da vacinação

com vacina viva atenuada, pode ter um papel crítico na resposta contra a infecção pelo VBI, uma vez que a imunidade humoral sistêmica, induzida pela vacinação com vacina inativada, não tem correlação com a proteção do trato respiratório contra a infecção pelo VBI (Dhinakar Raj e Jones, 1996; Gelb et al., 1998).

A imunidade local na traqueia poderia nesse caso ser mediada por células T efectoras, uma vez que células T CD4⁺ e T CD8⁺ foram observadas em secções de traqueia e pulmão de aves infectadas com o VBI (Dhinakar Raj e Jones, 1996). Okino et al. (2013) demonstraram, através da vacinação de aves SPF seguido de desafio com o VBI, que as respostas de IgG, IgA e células T CD8⁺ desenvolvidas na mucosa após a vacinação de pintos de 1 dia de idade podem ser consideradas boas correlatas de proteção contra esse vírus.

A maior parte das vacinas vivas é composta por estirpes do VBI que foram passadas várias vezes em ovos embrionados, no intuito de diminuir a virulência deste vírus (Hofstad et al., 1975). Vacinas compostas por estirpes menos atenuadas e com maior virulência residual, algumas vezes, são utilizadas para a vacinação de reforço por volta de sete a dez dias de idade. Vacinas de baixa virulência são adequadas para pintainhos com baixo nível de imunidade materna, e a vantagem destas vacinas é que elas não causam reações respiratórias, ou interferem menos na redução da taxa de crescimento, que pode ocorrer com vacinas de maior virulência (Geilhausen et al., 1973). A desvantagem de se utilizar vacinas de baixa virulência é que o nível de imunidade induzido é baixo, e muitas vezes são suficientes apenas para proteger o trato respiratório. Muitas vezes, estas vacinas não induzem uma proteção eficaz para outros tecidos e órgãos, tais como o rim e oviduto, contra o desafio com estirpes que são nefropatogênicas ou patogênicas para o trato reprodutivo (Dhinakar e Jones, 1996).

A estirpe vacinal atenuada tem a capacidade de infectar as células epiteliais da mucosa do trato respiratório superior e anexos das aves, inclusive na presença de anticorpos maternos. Apesar de poder ocorrer neutralização de algumas partículas virais pelos anticorpos maternos, a grande capacidade de replicação do vírus no trato respiratório superior possibilita a estimulação do sistema imune na primo-vacinação, deixando o sistema imune melhor preparado para uma resposta de memória mais intensa e mais duradoura durante o segundo contato com o vírus vacinal (Villegas, 1997).

Algumas vacinas vivas têm um grau significativo de virulência residual e uma tendência para produzir aerossaculite, particularmente em condições ambientais adversas, e quando combinadas à infecção com bactérias como a *Escherichia coli* (Hopkins e Voder, 1986). Diversos tipos antigênicos de vacinas da BI estão disponíveis em todo mundo, o que resulta em um grande problema para os produtores. Porém, a escolha da vacina contra o VBI pode sem dúvida ser decisiva para o sucesso da vacinação, e por isso deve se levar em conta quais são os tipos antigênicos prevalentes em determinadas regiões. As vacinas utilizadas com mais frequência são as formuladas com estirpes atenuadas pertencentes ao genótipo/sorotipo Massachusetts, como as estirpes M41, MA5, H52 e H120. Outras vacinas monovalentes também são usadas regionalmente na Europa e EUA, tais como Connecticut 46, Arkansas 99, Florida, JMK, 4/96 (793) e D274 (Fernando, 2013).

Em todos os países com avicultura mais avançada, existe uma grande cautela quanto ao uso indiscriminado de vacinas vivas, de modo a não serem utilizadas estirpes vacinais de outras partes do mundo, que não estejam presentes em uma dada região ou país e, assim evitar a disseminação de linhagens genéticas e fenotípicas distintas das estirpes locais em suas criações (Fernando, 2013). Entretanto, de acordo com Villegas (1997), o uso de outros sorotipos do VBI associados ao sorotipo Massachusetts, como o Connecticut, amplia o espectro antigênico do estímulo vacinal, resultando no desenvolvimento de anticorpos com um maior espectro de reatividade cruzada contra outros sorotipos de VBI.

Com relação à vacina inativada, sua grande vantagem é que, via de regra, ela é capaz de induzir a produção de elevados níveis de anticorpos sistêmicos anti-VBI que persistem por períodos mais longos do que aqueles induzidos por vacinas vivas (Box et al., 1982). Os anticorpos circulantes estão mais associados à proteção contra a viremia e o consequente envolvimento de órgãos extra-respiratórios, como oviduto, ovário e rins durante a infecção pelo VBI, não impedindo, entretanto, infecções das vias respiratórias, que é a porta de entrada desse vírus (Martins, 1992; Di Fábio e Rossini, 2000).

Sendo assim, Lopes et al. (2018) propõem a utilização de uma vacina inativada formulada com estirpe variante do VBI (genótipo GI-11) encapsulada em nanopartículas de quitosana administrada via mucosa. As partículas de quitosana

são eficientes em induzir resposta imune de mucosa contra vírus respiratórios aviários e desta forma, o uso de uma vacina que é capaz de induzir anticorpos específicos do IBV e respostas imunes no sítio primário da replicação viral, pode permitir uma proteção mais eficaz contra a infecção por IBV e também pode impedir a disseminação sistêmica dessa infecção e o desenvolvimento de lesões mais graves (Lopes et al., 2018).

Uma das maiores dificuldades encontradas para o controle mais efetivo da BI, é a identificação de sorotipos, patotipos e protectotipos de estirpes de campo em surtos dessa enfermidade. Esta tarefa necessita de um grande empenho para isolamento seguido dos demais testes para caracterização antigênica e biológica desse vírus. O resultado normalmente é confirmado por outros testes, tais como vírus-neutralização (VN) e sequenciamento de nucleotídeos do gene S1. Algumas estirpes vacinais do VBI, tais como Mass, Conn, Ark ou D274 podem ser diferenciadas por anticorpos monoclonais específicos (Koch et al., 1986; Naqi et al., 1993). Por isso, é de grande valia, estabelecer características patogênicas de determinadas estirpes de campo desse vírus, para uma melhor caracterização das estirpes isoladas de campo e que se tenha então mais subsídios para dar um direcionamento mais efetivo ao controle de surtos de BI no Brasil (Fernando, 2013).

Em se tratando do Brasil, o controle da BI é baseado principalmente no uso de vacinas vivas atenuadas, sendo que até 2016, somente era permitido a utilização de estirpes do sorotipo Mass na composição destas vacinas (Villarreal et al., 2010). As estirpes vacinais mais frequentemente utilizadas no Brasil são H120, H52 e Ma5 do VBI. A vacina contendo a estirpe atenuada H120, devido ao seu maior número de passagens em ovos embrionados, é mais atenuada do que a formulada com a estirpe H52 (Fernando, 2013).

A partir do segundo semestre de 2016, a indústria farmacêutica veterinária brasileira obteve a autorização do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) para produzir e comercializar vacinas vivas atenuadas formuladas com a estirpe da linhagem 11 do genótipo I do VBI isolada no Brasil (também denominada BR-I). Nesse contexto, deve-se ressaltar, que as vacinas atenuadas formuladas com estirpes ou sorotipos variantes do VBI somente devem ser utilizadas em áreas onde este tipo de vírus for responsável por grandes perdas econômicas e, após a sua completa caracterização, pois há o risco de se introduzir

um novo sorotipo nessa região, bem como aumentar o risco da ocorrência de recombinação genética entre os diferentes sorotipos do VBI, gerando uma nova variante, que pode ter consequências ainda mais desastrosas para a avicultura (Di Fábio, 1992; Martins, 1992; Di Fábio e Rossini, 2000; Rocha, 2000; Resende, 2003; Di Fábio, 2004).

Entretanto a presença de variantes do VBI em plantéis brasileiros pode ser a razão para o insucesso do controle da doença no Brasil (Jackwood et al., 2012; Di Fábio e Buitrago, 2009) de forma que vacinas com estirpes homólogas a essas variantes do VBI em nosso país deveriam ser usadas.

3. HIPÓTESE DE TRABALHO

Com o atual crescimento da produção avícola comercial, o Brasil tornou-se o segundo maior produtor e continua ocupando a posição de maior exportador de carne de frango do mundo. No entanto, novas tecnologias e pesquisas, no que diz respeito à sanidade aviária, devem acompanhar esse crescimento das últimas três décadas. A produção avícola evoluiu à custa de um avanço considerável na genética, manejo e nutrição das aves, que trouxeram também problemas crescentes como as infecções com o vírus da bronquite infecciosa aviária.

Atualmente, produtores e pesquisadores se deparam constantemente com novos achados clínicos e diferentes lesões relacionadas à infecção pelo VBI em criações de aves vacinadas. Este contexto não está reservado exclusivamente ao Brasil e, em vista do exposto anteriormente, muitos países estão enfrentando novos casos de BI. Desta forma, estudos vêm sendo realizados com propósito de caracterização das diferenças encontradas no genoma do VBI, em relação às alterações fenotípicas que são encontradas nas estirpes variantes e, ainda, em relação ao desenvolvimento de proteção contra os diferentes sorotipos e novas estirpes do VBI.

Em uma visão mais abrangente da situação mundial, com relação à constante evolução das estirpes do VBI, constata-se que são necessárias pesquisas para antecipar e desenvolver estratégias mais apropriadas e eficientes para fazer o controle imunoprolático mais efetivo contra as novas variantes do VBI, que continuamente estão surgindo e são mais prevalentes no Brasil. Em especial, é

imprescindível que seja feita a avaliação da proteção induzida pelas novas vacinas comerciais disponíveis hoje, que são formuladas com estirpe variante brasileira do VBI, e que tenham sido preconizadas para o controle e prevenção da bronquite infecciosa aviária em nosso país.

Desta forma, constata-se que por um lado é de suma importância o desenvolvimento de novas formulações vacinais que proporcionem uma proteção mais efetiva às aves frente às estirpes que apresentam propriedades genóticas e fenotípicas distintas do genótipo/sorotipo Massachusetts, até então preconizado para ser usado na formulação de vacinas vivas atenuadas contra BI no Brasil. Por outro lado, uma vez desenvolvidas e produzidas tais vacinas, faz-se necessário avaliar e acessar experimentalmente a eficiência das novas vacinas disponíveis no mercado, a fim de estabelecer os parâmetros de proteção vacinal aos tecidos e órgãos de predileção para a replicação viral e desenvolvimento de lesões causadas por essas novas estirpes variantes do VBI. De posse dessas informações, haveria mais subsídios para auxiliar na elaboração de programas vacinais mais efetivos para cada região, bem como os desafios advindos da adoção de um determinado programa imunoprolático para o controle da BI.

4. OBJETIVOS

4.1 Geral

Avaliar as respostas imunes e a proteção induzida por uma vacina viva atenuada comercial formulada com estirpe variante brasileira da linhagem 11 do genótipo I do VBI (GI-11).

4.2 Específicos

- Avaliar a resposta imune humoral sistêmica induzida pela vacinação com vacina viva atenuada comercial com a estirpe variante brasileira, administrada isoladamente ou combinada com a vacina viva atenuada comercial formulada com uma estirpe do genótipo/sorotipo Massachusetts;
- Avaliar a proteção contra ciliostase traqueal, após os desafios homólogo e heterólogo, que foi induzida pela vacinação com vacina viva atenuada comercial com formulada com uma estirpe variante brasileira, administrada isoladamente ou

combinada com a vacina viva atenuada comercial formulada com uma estirpe do genótipo/sorotipo Massachusetts;

- Avaliar a proteção contra o desenvolvimento de lesões microscópicas em traqueia e rim, após os desafios homólogo e heterólogo, que foi induzida pela vacinação com vacina viva atenuada comercial formulada com uma estirpe variante brasileira, administrada isoladamente ou combinada com a vacina viva atenuada comercial formulada com uma estirpe do genótipo/sorotipo Massachusetts;

- Avaliar a proteção contra a replicação do VBI em traqueia, pulmão e rim, mensurando-se a carga viral nesses órgãos, após os desafios homólogo e heterólogo, que foi induzida pela vacinação com vacina viva atenuada comercial formulada com uma estirpe variante brasileira, administrada isoladamente ou combinada com a vacina viva atenuada comercial formulada com uma estirpe do genótipo/sorotipo Massachusetts.

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1. Delineamento experimental

Um total de 108 pintinhos de corte comercial da linhagem Cobb de 1 dia de idade foram divididos em 3 grupos compostos por 24 aves, e outros 3 grupos compostos por 12 aves cada, que foram mantidos em isoladores de pressão positiva dotados de filtros HEPA. Foram utilizadas as vacinas CEVAC® IBras L (CEVA, BR) contendo $10^{3,9}$ DIE_{50} /dose, a qual é formulada com uma estirpe variante brasileira (BR-1), e NOBILIS® IB Ma5 (MSD Animal Health, NL) com $10^{3,8}$ DIE_{50} /dose, composta pela estirpe Massachusetts. Os grupos foram vacinados no primeiro dia de idade com 30µL de cada vacina por via óculo-nasal dentro dos isoladores, conforme descritos na Tabela 1, sendo que o grupo BR + Mass foi vacinado com 30µL de cada vacina em cada olho. Os grupos foram desafiados aos 22 dias de idade pela via óculo-nasal ($10^{5,0}$ DIE_{50} por ave) com as estirpes do genótipo brasileiro (IBV/Brazil/NUP/0516, GenBank acess. KY465748) e Massachusetts (IBV/Brazil/SGO/0116, GenBank acess. KY465750) devidamente caracterizadas por meio de sequenciamento do gene S1 inteiro.

Tabela 1. Grupos experimentais de aves vacinadas com vacinas vivas atenuadas comerciais formuladas com estirpes virais distintas (Massachusetts-Mass e variante brasileira - GI-11), e desafiadas com estirpe do genótipo brasileiro BR-1 e Massachusetts.

Grupos	1 dia	22 dias	Amostragem
A	Vacinação	Desafio	
	$10^{3.9}$ DIE ₅₀ GI-11	IBV/Brazil/NUP/0516	24
		(Genótipo BR-1)	
B	Vacinação	Desafio	
	$10^{3.8}$ DIE ₅₀ Mass	IBV/Brazil/NUP/0516	24
		(Genótipo BR-1)	
C	Vacinação	Desafio	
	$10^{3.9}$ DIE ₅₀ GI-11	IBV/Brazil/NUP/0516	24
	$10^{3.8}$ DIE ₅₀ Mass	(Genótipo BR-1)	
D	Vacinação	Desafio	
	$10^{3.9}$ DIE ₅₀ GI-11	IBV/Brazil/SGO/0116	12
		(Genótipo Massachusetts)	
E	- ^a	Desafio	
		IBV/Brazil/NUP/0516	12
		(Genótipo BR-1)	
F	- ^a	PBS pH 7,4	12

Legenda: a- grupos não vacinados; GI-11 – estirpe brasileira; Mass – estirpe Massachusetts

Foram coletadas amostras de traqueia, pulmão e rim aos 2, 4, 6 e 8 dias pós vacinação (d.p.v) e 4, 7 e 11 dias pós-infecção (d.p.i), sendo que 3 aves de cada grupo foram eutanasiadas em cada período e, em seguida, coletadas as amostras. Uma parte das amostras da traqueia foi destinada à avaliação da ciliostase; outra parte, junto com amostras de rim, foram processadas por técnicas histológicas. Uma terceira parte das amostras foi submetida ao congelamento rápido em nitrogênio líquido para posterior quantificação da carga viral. Além disso, foram coletadas amostras de sangue com 2, 4, 7, 14, 21, 26, 29, 33, 36 e 43 dias de idade, a fim de se determinar os níveis de anticorpos anti-VBI do isótipo IgG nos períodos pré e pós-vacinação, bem como a soro conversão pós-desafio.

Foram testados dois grupos controles, E e F, sendo um grupo controle positivo da infecção por estirpe variante brasileira do VBI (E), o qual foi submetido à infecção experimental sem prévia vacinação, e um grupo controle negativo (F), não vacinado nem desafiado. Ambos os grupos controle foram mantidos durante todo o período do experimento em isoladores de pressão positiva exclusivos.

As lesões foram avaliadas com escores e os dados de proteção foram considerados por meio das análises de ciliostase, histopatologia, carga viral por RT-qPCR e sorologia, conforme as recomendações de Jackwood et al., 2015.

5.2. Inóculo

5.2.1. Amostra Viral

Para os desafios com o VBI, foram utilizadas estirpes de campo isoladas de diferentes criações comerciais de frango de corte. A estirpe variante utilizada foi a IBV/Brazil/NUP/0516 (GenBank acess. KY465748), isolada em amostras de rins de frango de corte de uma criação comercial situada na região norte do Estado de São Paulo.

Essa estirpe foi caracterizada geneticamente por meio de sequenciamento de nucleotídeos do gene da glicoproteína S1, segundo os procedimentos descritos por Marandino et al., 2015. Após o sequenciamento, essa estirpe do VBI foi classificada, com base no alinhamento das sequências de nucleotídeos e na análise filogenética,

na linhagem 11 do genótipo I do VBI, o qual também é denominado de genótipo BR-I (Valastro et al., 2016).

A suspensão viral para o desafio foi diluída em solução salina tamponada com fosfatos pH 7,4 (PBS) de forma a conter $10^{5.0}$ DIE₅₀ em 100µL (De Wit e Cook, 2014).

Já a estirpe Massachusetts utilizada foi a IBV/Brazil/SGO/0116 (GenBank acess. KY465750), isolada em amostras de traqueia de frango de corte de uma criação localizada na região nordeste do Brasil, sendo que as aves apresentavam sinais clínicos respiratórios no momento da coleta.

Essa estirpe também teve o gene S1 sequenciado e analisado com base no alinhamento das sequências de nucleotídeos seguido de análise filogenética, tendo apresentado apenas 5 nucleotídeos diferentes da cepa de referência M41. A suspensão viral para o desafio dessa estirpe foi também diluída em PBS a fim de conter $10^{5.0}$ DIE₅₀ em 100µL (De Wit e Cook, 2014).

5.2.2. Propagação viral e determinação da infectividade viral

A propagação da estirpe brasileira do VBI foi realizada em ovos embrionados livres de patógenos específicos (SPF) de 9 a 11 dias de incubação, com base na metodologia descrita por Owen et al. (1991).

Além disso, a infectividade viral da estirpe foi determinada por inoculação de diluições seriadas do vírus (10^{-1} a 10^{-9}) obtido do líquido cório-alantoide de ovos embrionados SPF inoculados com a estirpe IBV/Brazil/NUP/0516. O título foi expresso em Doses Infectantes Embrionárias 50% (DIE₅₀) e calculado pelo método de Reed e Muench (1938).

5.3 Avaliação da ciliostase

Foi realizada a avaliação da ciliostase traqueal aos 2, 4, 6 e 8 dias pós vacinação e aos 4, 7 e 11 dias pós-infecção, com base na análise de seis anéis traqueais por ave, sendo dois da região proximal, dois da medial e dois da distal, para serem definidas as percentagens de inibição do movimento ciliar de cada anel traqueal analisado (Darbyshire e Peters, 1985). Para classificação dos escores, foi adotada a escala de zero a quatro, de acordo com a intensidade da perda de

movimento ciliar e o dano no epitélio traqueal, em cada um dos quatro quadrantes analisados por anel traqueal (Andrade et al., 1982; Di Fábio et al., 2000, Okino et al., 2013). O escore zero corresponde a 100% de integridade do epitélio traqueal, enquanto que o escore 4 representa uma integridade epitelial de 0% a 25% (Okino et al., 2013).

Para acessar o nível de proteção vacinal foi realizado cálculo conforme o que foi preconizado por Cook et al. (1999), de forma que, quanto maior o valor em porcentagem, maior o nível de proteção fornecido pelo programa vacinal.

5.4 Análise Histopatológica

Fragmentos de traqueia e rins acondicionados em solução de formol tamponado a 10% foram processadas por técnicas histológicas usuais de fixação, desidratação, diafanização e coloração com hematoxilina e eosina (HE). O exame histopatológico da traqueia seguiu os parâmetros de avaliação estabelecidos por Andrade et al. (1982) e Yashida et al. (1985); a análise histopatológica dos rins foi realizada de acordo com os parâmetros descritos por Chen et al. (1996). Os escores de lesões traqueais e renais de cada ave foram registrados individualmente e o escore médio de cada grupo foi calculado. O escore máximo possível estabelecido por ave foi 15 para a traqueia e 6 para o rim.

5.5 Carga Viral

Amostras de traqueia, pulmão e rins foram maceradas em PBS e, posteriormente, centrifugadas para sedimentação dos debris celulares. A extração do RNA viral foi realizada a partir do sobrenadante utilizando-se um sistema automatizado (QIAcube HT, Qiagen, Hilden, Germany) com o kit comercial QIAamp cador Pathogen Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany), conforme as especificações do fabricante. No passo seguinte, o RNA foi submetido à técnica de RT-qPCR quantitativa com o uso de oligonucleotídeos iniciadores específicos para amplificar a região 5'-proximal do gene S1 (Okino, et al., 2013). As reações foram realizadas com QuantiFast SYBR Green PCR Kit (Qiagen, Hilden, Germany) para um volume final de 20uL.

Em suma, a detecção do VBI foi realizada concomitantemente à amplificação, sendo monitorada após cada ciclo da reação, sendo que a identificação da estirpe foi baseada no perfil das curvas obtidas durante a reação ou através das diferentes temperaturas de fusão (T_m -“melting”) obtidas. Para a mensuração da replicação viral foi utilizado o método de quantificação absoluta conforme recomendações descritas por Okino et al. (2013). Para tanto, foi construída uma curva padrão para quantificação absoluta do cDNA com base no ensaio com diferentes diluições de razão constante igual a 10 de um plasmídeo (vetor pGEM T Easy - Promega), contendo o inserto do gene S1 do VBI da estirpe M41, que havia sido purificado e quantificado por espectrofotometria ultra-violeta, nos comprimentos de onda de 260 e 280 nm, seguida de conversão em número de moles utilizando-se o programa computacional Molbio.ru (www.molgen.mpg.de/~soldatov/protocols/scripts/01_07.html).

As diluições da solução padrão do plasmídeo contendo o gene S1 foram a seguir testadas na técnica de qPCR com a utilização dos mesmos oligonucleotídeos para amplificação de sequência parcial do gene S1 do VBI. Os valores de C_q obtidos a partir da qPCR foram subsequentemente usados para calcular e traçar uma linha de regressão linear através do logaritmo do número de moles do “template” (eixo Y) contra o valor correspondente de C_q (eixo X). A equação linear gerada a partir da curva padrão foi $y = -0,322x + 12,94$ com coeficiente de correlação (r^2) = 0,984. Usando-se o coeficiente angular da equação linear, a eficiência do teste foi estimada em 109,89.

5.6 Análise Sorológica

Foi realizada análise sorológica de todos os grupos por meio do método indireto de ELISA nos intervalos 2, 4, 7, 14, 21, 26, 29, 33, 36 e 43 dias de idade das aves dos diferentes grupos experimentais avaliados, a fim de se estabelecer a cinética de produção de anticorpos anti-VBI do isótipo IgG no soro sanguíneo após a vacinação, bem como a soroconversão pós desafio. O ELISA foi realizado usando-se kit comercial (Infectious Bronchitis Virus Antibody Test Kit – IDEXX IBV, IDEXX Laboratories, Westbrook, ME, USA) seguindo-se as recomendações do fabricante.

5.7 Análise dos dados

As lesões microscópicas foram avaliadas com escores variando de 0 a 3, sendo 0 para ausência de lesões, 1 para leve, 2 para moderado e 3 para severa. Os dados de proteção foram considerados através das análises de escore de ciliostase, histopatologia e carga viral por RT-qPCR, conforme as recomendações de Jackwood et al. (2015).

Todos os resultados de proteção vacinal (escore de ciliostase traqueal, histopatologia e dos números de cópias gênicas do VBI na análise de carga viral) obtidos foram submetidos à análise estatística com o uso do software GraphPad Prism 5.0, adotando-se o teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

6. RESULTADOS

6.1. Avaliação da ciliostase

A avaliação do movimento ciliar da traqueia no intervalo de dois d.p.v. revelou escores mais reduzidos de ciliostase, com média de escore de 0,33 para os grupos vacinados com a estirpe variante do genótipo BR-1 (grupos A e D), enquanto que a média do escore de ciliostase, para os grupos vacinados com a estirpe Mass (grupo B) e submetidos à vacinação dupla (grupo C), foi de 0,44 (Tabela 2). No intervalo seguinte, quatro d.p.v, escores médios de ciliostase um pouco mais elevados foram observados nas aves do grupo C, que receberam as duas vacinas vivas atenuadas (estirpes do genótipo BR-1 e Massachusetts), com média de escore de ciliostase igual a 0,88, enquanto que as aves dos grupos A, B e D apresentaram médias mais baixas de escores de ciliostase quando comparadas com o período anterior (Tabela 2). Já, no intervalo de seis d.p.v, as alterações de ciliostase induzidas pelas estirpes atenuadas vacinais diminuíram mais, porém o grupo C ainda apresentou uma média de escore de ciliostase um pouco maior (0,66) do que as aves dos demais grupos testados (Tabela 2).

A avaliação do movimento ciliar da traqueia após o desafio demonstrou que, no intervalo de quatro d.p.i, o grupo não vacinado e desafiado com a estirpe variante brasileira (grupo E) apresentou a maior média de escore de ciliostase, seguido pelo grupo D, que foi vacinado com a estirpe variante do genótipo BR-1 e desafiado com

a estirpe virulenta Massachusetts (Tabela 2). Já, o grupo C (duplamente vacinado com as estirpes atenuadas Massachusetts e BR-1) apresentou nesse mesmo intervalo o menor escore médio de ciliostase, ao passo que os grupos A e B, 1x vacinado com estirpe BR-1, ou 1x vacinado com a estirpe Massachusetts, apresentaram valores “intermediários” de médias dos escores de ciliostase (0,97 a 1,11) frente aos desafios com estirpe virulentas do genótipo BR-1.

No intervalo de sete d.p.i, os escores de ciliostase traqueal regrediram para a maioria dos grupos experimentais e o grupo A, vacinado e desafio com a estirpe do genótipo BR-1, revelou proteção contra a ciliostase traqueal causada pelo desafio homólogo (Tabela 3). Porém os grupos D e E mantiveram elevados os escores médios de ciliostase, estatisticamente iguais entre si e diferentes se comparados com os dos demais grupos do estudo. Com onze d.p.i, os escores médios de ciliostase declinaram a valores próximos a níveis basais ou indistintos do escore médio de ciliostase traqueal apresentado pelas aves do grupo F (não vacinado e não desafiado), com exceção das aves do grupo D (vacinado com estirpe atenuada do genótipo BR-1 e desafiado com estirpe virulenta de campo do genótipo Massachusetts), que revelaram uma pequena atividade de ciliostase (escore médio de ciliostase = 0,33) (Tabela 2).

A partir dos resultados da ciliostase traqueal e de acordo com o proposto por Cook et al., 1999, no intervalo de quatro d.p.i, somente o grupo C, duplamente vacinado, revelou proteção completa contra o desafio pela estirpe virulenta do genótipo BR-1, sendo que valores $\geq 80\%$ são considerados suficientes para a proteção do grupo de aves contra o desafio (Tabela 3). Os grupos que receberam apenas uma dose ou da vacina atenuada com a estirpe desse mesmo genótipo (grupo A) ou uma dose da vacina atenuada com a estirpe Massachusetts (grupo B) apresentaram proteção parcial contra o desafio com a estirpe do genótipo BR-1 (Tabela 3). E, ainda, o grupo apenas vacinado com a estirpe atenuada do genótipo BR-1 e desafiado com a estirpe virulenta de campo do genótipo Massachusetts (grupo D) não demonstrou proteção heteróloga relevante contra esse desafio (Tabela 3).

Tabela 2. Avaliação da média de escores de inibição do movimento ciliar da traqueia (0 a 4) de aves dos diferentes grupos nos diferentes intervalos pós-vacinação e pós-infecção.

Grupos	2 DPV	4 DPV	6 DPV	4 DPI	7 DPI	11 DPI
A	0,33	0,22	0	0,97 ^{ad}	0,33 ^a	0
B	0,44	0,33	0,11	1,11 ^{db}	0,44 ^a	0,11
C	0,44	0,88	0,66	0,33 ^{ad}	0,11 ^a	0
D	0,33	0,22	0	1,97 ^{bc}	1,78 ^b	0,33
E	- ^a	- ^a	- ^a	2,11 ^c	1,77 ^b	0,11
F	- ^a	- ^a	- ^a	0,11 ^a	0,11 ^a	0

Legenda: DPV-dias pós vacinação, DPI-dias pós-infecção, a-grupos não vacinados.

Tabela 3. Porcentagem de proteção dos diferentes grupos vacinados frente ao desafio com estirpes homólogas ou heterólogas de acordo com o proposto por Cook et al., 1999.

Grupos	4 DPI	7 DPI
A	54,02%	81,35%
B	47,39%	75,14%
C	84,36%	93,78%
D	6,63%%	0,56%
E	-	-
F	94,78%	93,78%

Legenda: DPI – dias pós infecção; grupo A – vacinação GI-11 e desafio BR-1; grupo B – vacinação Mass e desafio BR-1; grupo C – vacinação GI-11+Mass e desafio BR-1; grupo D – vacinação GI-11 e desafio Mass; grupo E – sem vacinar e desafio GI-11; grupo F – sem vacinar e sem desafiar.

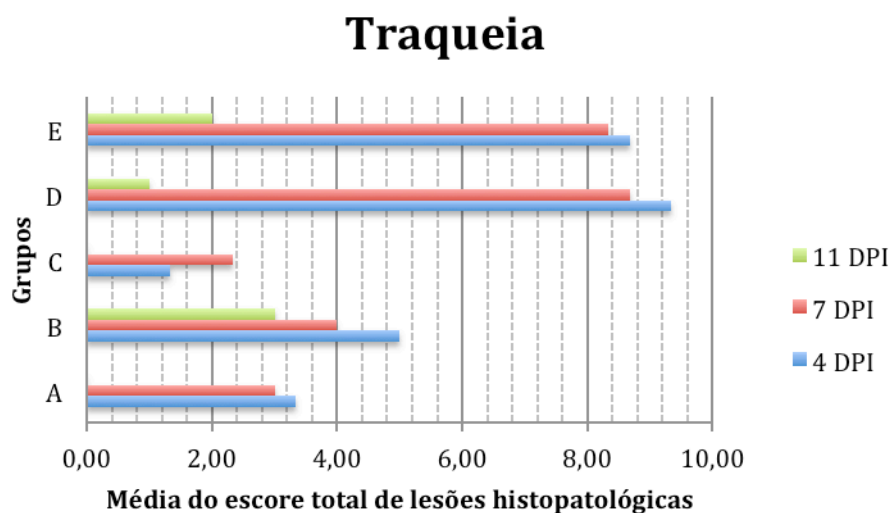
6.2. Análise histopatológica

Alterações histopatológicas mais marcantes na traqueia foram observadas aos quatro e sete d.p.i, sendo que os grupos que receberam vacina atenuada contendo a estirpe brasileira do VBI, associada (grupo C) ou não com a vacina atenuada contendo a estirpe Massachusetts (Grupo A) apresentaram as menores médias de escores de lesões microscópicas traqueais quando desafiados com a

estirpe homóloga a do genótipo BR-1 do VBI, enquanto que as maiores médias de escore de alterações histopatológicas traqueais foram observadas para as aves do grupo D, vacinadas com a estirpe do genótipo BR-1 e desafiadas com a estirpe virulenta Mass do VBI, e pelas aves do grupo E (não vacinadas e desafiadas com estirpe BR-1 do VBI) (Figura 1).

Com onze d.p.i, foi observado que as lesões traqueais em todos os grupos regrediram e houve regeneração do epitélio ciliado, porém o grupo B (vacinado com estirpe Massachusetts e desafiado com estirpe do genótipo BR-1) ainda apresenta um certo grau de lesões na traqueia, sendo que esse período foi o único com diferença estatística na comparação entre os grupos (Tabela 4).

As principais lesões microscópicas observadas foram: perda ciliar, presença de infiltrado mononuclear, hiperplasia celular, degeneração epitelial e congestão; Perda ciliar e infiltrado mononuclear foram os eventos observados com maior frequência e intensidade de lesões traqueais no intervalo de quatro d.p.i (Tabela 4).



Legenda: DPI – dias pós infecção

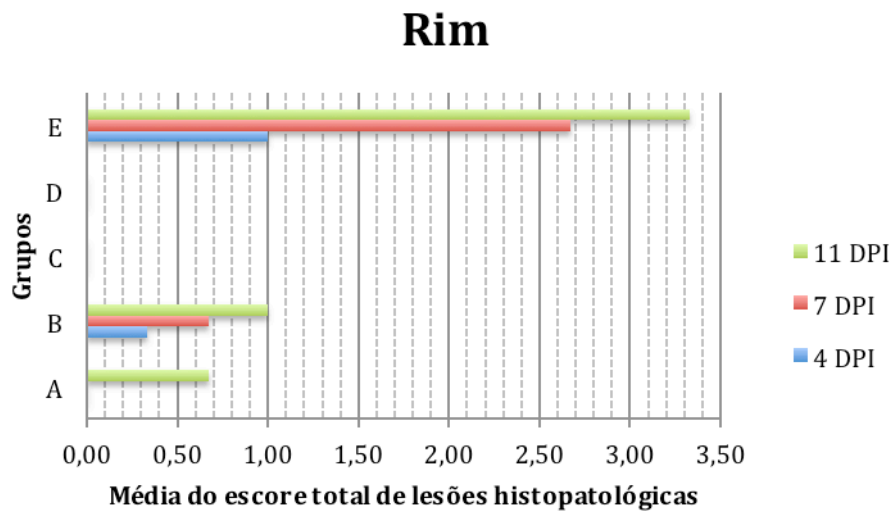
Figura 1. Média do escore de lesões histopatológicas encontradas em amostras de traqueia das aves dos diferentes grupos analisados neste estudo ao longo dos períodos pós- infecção.

Tabela 4. Resultados da análise histológica de traqueia nos diferentes grupos de estudo aos 4, 7 e 11 d.p.i.

4 dpi								
Grupo	Ave	Perda ciliar	Infiltrado mononuclear	Hiperplasia	Degeneração epitelial	Congestão	Escore total	Média
A	1	2	2	1	1	2	8	3,33
	2	0	1	0	0	0	1	
	3	0	1	0	0	0	1	
B	1	3	1	1	2	2	9	5
	2	1	1	0	0	1	3	
	3	1	1	0	0	1	3	
C	1	0	1	0	0	1	2	1,33
	2	1	1	0	0	0	2	
	3	0	0	0	0	0	0	
D	1	3	2	1	3	2	11	9,33
	2	3	2	1	3	2	11	
	3	2	1	0	2	1	6	
E	1	2	2	1	3	2	10	8,67
	2	2	2	1	3	2	10	
	3	1	1	1	2	1	6	
7 dpi								
Grupo	Ave	Perda ciliar	Infiltrado mononuclear	Hiperplasia	Degeneração epitelial	Congestão	Escore total	Média
A	1	1	1	1	0	2	5	3,00
	2	0,5	0,5	0,5	0	0,5	2	
	3	0,5	0,5	0,5	0	0,5	2	
B	1	2	1	2	2	1	8	4
	2	0	1	0	0	1	2	
	3	0	1	0	0	1	2	
C	1	1	1	1	0	1	4	2,33
	2	0	0	0	0	0	0	
	3	0	2	0	0	1	3	
D	1	2	2	2	1	0	7	8,67
	2	2	2	2	1	0	7	
	3	3	3	3	3	0	12	
E	1	2	2	2	2	2	10	8,33
	2	2	2	2	2	2	10	
	3	1	1	1	1	1	5	
11 dpi								
Grupo	Ave	Perda ciliar	Infiltrado mononuclear	Hiperplasia	Degeneração epitelial	Congestão	Escore total	Média
A	1	0	0	0	0	0	0	0,00 ^A
	2	0	0	0	0	0	0	
	3	0	0	0	0	0	0	
B	1	1	1	1	0	0	3	3 ^D
	2	1	1	1	0	0	3	
	3	1	1	1	0	0	3	
C	1	0	0	0	0	0	0	0,00 ^A
	2	0	0	0	0	0	0	
	3	0	0	0	0	0	0	
D	1	0	1	0	0	0	1	1,00 ^B
	2	0	1	0	0	0	1	
	3	0	1	0	0	0	1	
E	1	0	1	1	0	0	2	2,00 ^C
	2	0	1	1	0	0	2	
	3	0	1	1	0	0	2	

Legenda: 0-ausência, 1-leve, 2-moderada, 3-severa.

Com relação ao rim, as alterações histopatológicas mais frequentemente observadas foram infiltrado celular linfocitário intersticial e hiperplasia celular, sendo que apenas uma ave do grupo B apresentou infiltrado celular linfocitário intersticial aos quatro d.p.i e duas aves apresentaram a mesma alteração aos sete d.p.i (Figura 2). As maiores médias de escores de lesão foram encontradas apenas aos onze d.p.i, sendo que apenas aves dos grupos A e B apresentaram alterações histopatológicas (Tabela 5). Apesar das diferenças observadas, as médias de escores de lesões microscópicas renais não diferiram estatisticamente em nenhum dos intervalos pós-infecção avaliados.



Legenda: DPI – dias pós infecção

Figura 2. Média do escore de lesões histopatológicas encontradas em amostras de rim das aves dos diferentes grupos analisados neste estudo ao longo dos períodos pós- infecção.

Tabela 5. Resultados da análise histológica de rim nos diferentes grupos de estudo aos 4, 7 e 11 d.p.i.

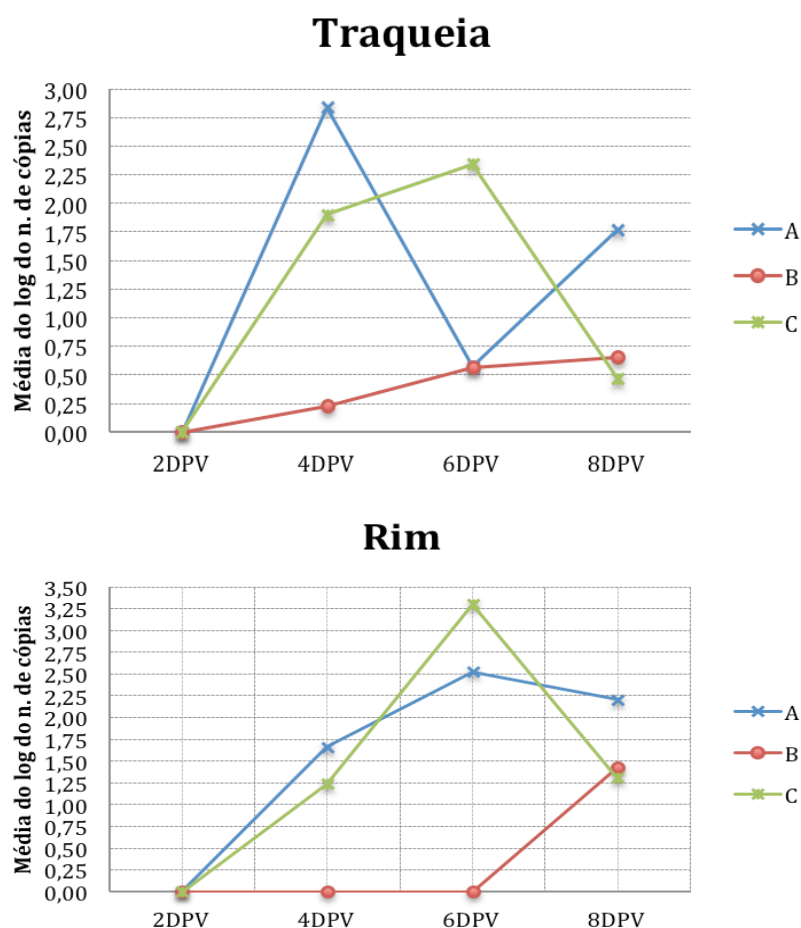
4 dpi					
Grupo	Ave	Infiltrado celular linfocitário intersticial	Hiperplasia celular	Escore total	Média
A	1	0	0	0	0,00
	2	0	0	0	
	3	0	0	0	
B	1	1	0	1	0,33
	2	0	0	0	
	3	0	0	0	
C	1	0	0	0	0,00
	2	0	0	0	
	3	0	0	0	
D	1	0	0	0	0,00
	2	0	0	0	
	3	0	0	0	
E	1	1	0	1	1,00
	2	1	0	1	
	3	1	0	1	
7 dpi					
Grupo	Ave	Infiltrado celular linfocitário intersticial	Hiperplasia celular	Escore total	Média
A	1	0	0	0	0,00
	2	0	0	0	
	3	0	0	0	
B	1	1	0	1	0,67
	2	1	0	1	
	3	0	0	0	
C	1	0	0	0	0,00
	2	0	0	0	
	3	0	0	0	
D	1	0	0	0	0,00
	2	0	0	0	
	3	0	0	0	
E	1	1	1	2	2,67
	2	2	2	4	
	3	1	1	2	
11 dpi					
Grupo	Ave	Infiltrado celular linfocitário intersticial	Hiperplasia celular	Escore total	Média
A	1	1	0	1	0,67
	2	1	0	1	
	3	0	0	0	
B	1	1	1	2	1,00
	2	1	0	1	
	3	0	0	0	
C	1	0	0	0	0,00
	2	0	0	0	
	3	0	0	0	
D	1	0	0	0	0,00
	2	0	0	0	
	3	0	0	0	
E	1	2	2	4	3,33
	2	2	1	3	
	3	2	1	3	

Legenda: 0-ausência, 1-leve, 2-moderada, 3-severa.

6.3. Carga viral

As cargas virais presentes nos órgãos analisados após a vacinação demonstraram que, com quatro d.p.v, a maior carga viral foi apresentada na traqueia das aves do grupo A (vacinado com a estirpe atenuada do genótipo BR-1), seguido pelas aves do grupo C, vacinado com as duas vacinas vivas atenuadas (estirpe Massachusetts e estirpe variante do genótipo BR-1) (Tabela 6). É interessante observar também que, apesar de os grupos A e C apresentarem as maiores cargas virais aos quatro d.p.v, houve uma queda desse parâmetro (quantidade de cópias do gene S1) para as aves desses dois grupos nos dois intervalos subsequentes estudados (seis e oito d.p.v), enquanto que o grupo B, vacinado somente com a estirpe Massachusetts, não apresentou alta carga viral apreciável aos quatro d.p.v, porém mostrou uma quantidade crescente da carga viral até os oito d.p.v (Figura 3).

Com relação à detecção viral nos rins após a vacinação, verificou-se que foi mais evidente aos seis d.p.v nos grupos A e C, vacinados com a estirpe variante brasileira, associada ou não a estirpe vacinal atenuada Massachusetts (Tabela 8). Tal dado confirma a mínima tendência de tropismo para o tecido renal desta estirpe. Já, o grupo B, vacinado apenas com a estirpe Massachusetts, também apresentou carga viral no rim, porém apenas aos oito d.p.v (Figura 3). Apesar das diferenças observadas, não houve diferença estatística nas cargas virais entre os grupos em nenhum dos períodos avaliados após a vacinação.



Legenda: d.p.v - dias pós vacinação; grupo A (azul) – vacinação GI-11 e desafio BR-1; grupo B (vermelho) – vacinação Mass e desafio BR-1; grupo C (verde) – vacinação GI-11+Mass e desafio BR-1.

Figura 3. Número de cópias do gene S1 do VBI ($\log_{10}$) detectado em traqueia e rim das aves dos grupos A, B e C nos diferentes intervalos pós-vacinação.

Após o desafio, as aves dos grupos A e C foram as que apresentaram as menores cargas virais na traqueia ao longo de todo o período estudado (Tabela 6). Essa mesma tendência de cargas virais mais reduzidas foi observada nas amostras de pulmão das aves desses mesmos grupo. (Tabela 7). O grupo D, vacinado com a estirpe variante do genótipo BR-1 e desafiado com a estirpe Massachusetts, apresentou a mais alta carga viral na traqueia aos quatro d.p.i, o que sugere ausência de proteção cruzada da estirpe variante atenuada vacinal frente a um desafio com a estirpe virulenta Massachusetts de um isolado de campo (Figura 4). Além disso, nas amostras de pulmão, as aves do grupo D apresentaram, aos sete

d.p.i, carga viral maior até mesmo do que as aves do grupo E (controle não vacinado e desafiado com estirpe virulenta do genótipo BR-1) (Figura 4). Estatisticamente, foi observado diferença entre os grupos nos seguintes tecidos e períodos analisados: traqueia aos quatro e sete d.p.i (Tabela 6) e pulmão aos quatro e onze d.p.i (Tabela 7), sendo que os grupos A e C foram iguais em todos os períodos analisados.

Com relação à carga viral em amostras de rim após a infecção, verifica-se que os grupos B e D apresentaram maior carga viral aos quatro d.p.i (Tabela 8). Tal resultado evidencia que apesar de o grupo D ter sido vacinado com a estirpe variante, a estirpe de desafio do genótipo Massachusetts não teve redução significativa na sua capacidade de se multiplicar nos rins. Aos onze d.p.i, os grupos A e D vacinados com a estirpe variante revelaram ausência de carga viral nos rins, enquanto que no grupo B, mesmo as aves tendo sido vacinadas com a estirpe Massachusetts, detectou-se uma carga viral mais reduzida nos rins ao longo de todo o período estudado (Figura 4). Houve diferença estatística apenas aos sete d.p.i, sendo que todos os grupos apresentaram cargas virais estatisticamente diferentes em relação a do grupo controle e, ainda, o grupo C apresentou a menor carga viral que foi significativamente diferente em relação às aves dos demais grupos estudados (Tabela 8).

Tabela 6. Médias do número de cópias do gene S1 do VBI ($\log_{10}$) detectado em traqueia dos diferentes grupos de estudo ao longo dos períodos analisados.

Grupos	2DPV	4DPV	6DPV	8DPV	4DPI	7DPI	11DPI
A	0,00	2,85	0,57	1,77	0,89 ^a	1,11 ^{ab}	0,00
B	0,00	0,23	0,57	0,66	2,85 ^{ab}	1,65 ^{ab}	1,45
C	0,00	1,90	2,34	0,46	0,13 ^a	0,46 ^a	0,00
D					5,10 ^{bc}	2,27 ^{ab}	0,45
E					6,51 ^c	3,34 ^b	0,96

Legenda: DPV - dias pós vacinação; DPI – dias pós infecção.

Tabela 7. Médias do número de cópias do gene S1 do VBI ($\log_{10}$) detectado em pulmão dos diferentes grupos de estudo ao longo dos períodos analisados pós-infecção.

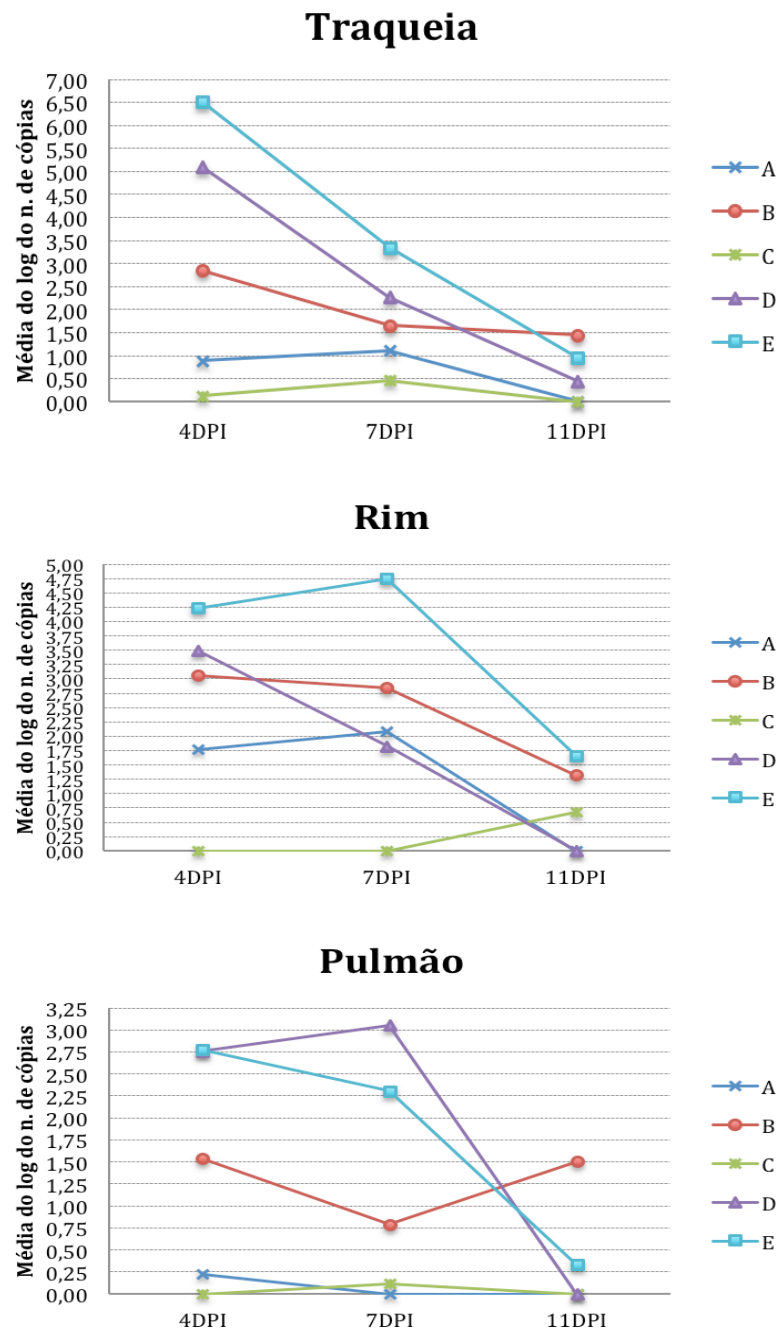
Grupos	4DPI	7DPI	11DPI
A	0,23 ^a	0,00 ^a	0,00 ^a
B	1,54 ^{ab}	0,79 ^a	1,50 ^b
C	0,00 ^a	0,13 ^a	0,00 ^a
D	2,76 ^b	3,06 ^c	0,00 ^a
E	2,78 ^b	2,31 ^b	0,34 ^a

Legenda: DPI – dias pós infecção.

Tabela 8. Médias do número de cópias do gene S1 do VBI ($\log_{10}$) detectado em rim dos diferentes grupos de estudo ao longo dos períodos analisados.

Grupos	2DPV	4DPV	6DPV	8DPV	4DPI	7DPI	11DPI
A	0,00	1,66	2,52	2,20	1,77	2,09 ^b	0,00
B	0,00	0,00	0,00	1,43	3,07	2,85 ^b	1,32
C	0,00	1,24	3,31	1,31	0,00	0,00 ^a	0,68
D					3,49	1,83 ^b	0,00
E					4,23	4,75 ^c	1,66

Legenda: DPV - dias pós vacinação; DPI – dias pós infecção.



Legenda: d.p.i - dias pós infecção; grupo A (azul) – vacinação GI-11 e desafio BR-1; grupo B (vermelho) – vacinação Mass e desafio BR-1; grupo C (verde) – vacinação GI-11+Mass e desafio BR-1; grupo D (roxo) – vacinação GI-11 e desafio Mass; grupo E (azul claro) – sem vacinar e desafio GI-11.

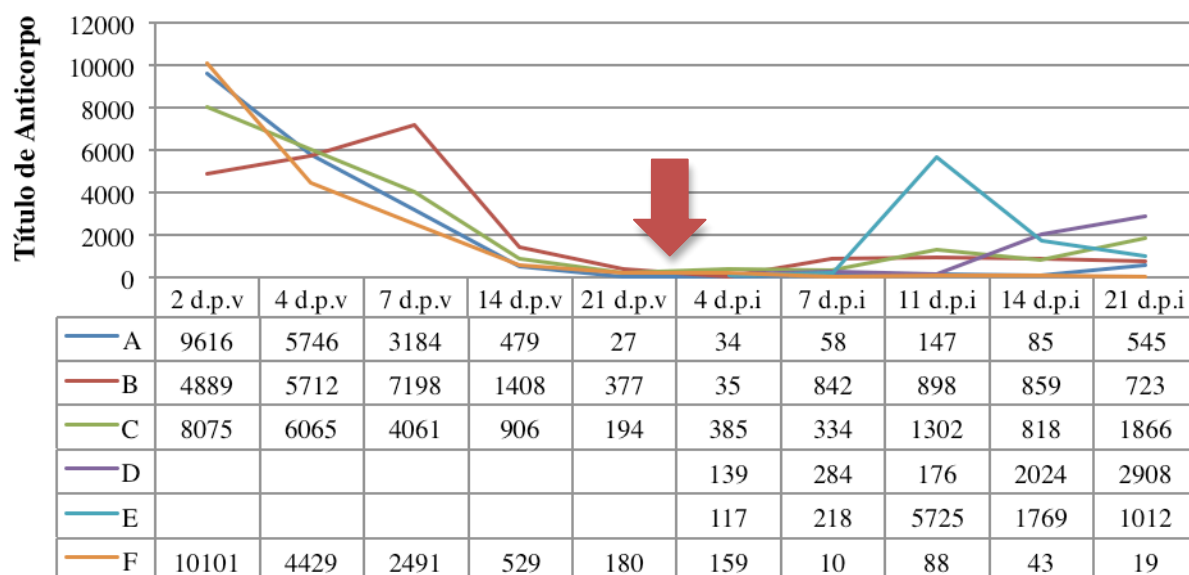
Figura 4. Número de cópias do gene S1 do VBI ($\log_{10}$) detectado em traqueia, pulmão e rim das aves dos grupos A, B, C, D e E nos diferentes intervalos pós-infecção.

6.4. Análise sorológica

Como foram utilizadas aves comerciais, que são progênies de matrizes multivacinadas contra o VBI, os primeiros dias pós-vacinação revelaram a presença de elevados títulos de anticorpos anti-VBI sistêmicos de origem materna, que, gradualmente, declinaram a níveis basais no momento em que foi realizado o desafio; fazendo exceção o grupo B, para o qual foi observada uma elevação temporária do título de anticorpos, aos sete d.p.v. Além disso, as aves desse grupo mantiveram títulos de anticorpos anti-VBI um pouco mais elevados até o dia do desafio em comparação com os títulos de anticorpos das aves dos outros grupos experimentais (Figura 5).

Aos onze d.p.i, os níveis de anticorpos anti-VBI do isótipo IgG atingiram a sua máxima concentração nas aves do grupo controle positivo (grupo E), não vacinado e desafiado com estirpe virulenta do genótipo BR-1, o que pode ser observado também, mas em menor proporção, no grupo C, constituído por aves vacinadas duplamente com estirpe atenuada do genótipo Massachusetts juntamente da vacinação com estirpe atenuada do genótipo BR-1 (Figura 5).

Ainda, com respeito aos intervalos pós-desafio, nota-se que os grupos A, C e D apresentaram os maiores títulos de anticorpos anti-VBI no vigésimo primeiro d.p.i, sendo que esses títulos de anticorpos tenderam a ser crescentes nesses grupos a partir do décimo primeiro ou do décimo quarto d.p.i. O grupo B mostrou-se uma exceção, pois os títulos médios de anticorpos anti-VBI desse grupo começaram a se elevar a partir dos sete d.p.i e se mantiveram nos mesmos níveis até o vigésimo primeiro d.p.i (Figura 5).



Legenda: seta vermelha – dia do desafio; grupo A (azul) – vacinação GI-11 e desafio BR-1; grupo B (vermelho) – vacinação Mass e desafio BR-1; grupo C (verde) – vacinação GI-11+Mass e desafio BR-1; grupo D (roxo) – vacinação GI-11 e desafio Mass; grupo E (azul claro) – sem vacinar e desafio GI-11; grupo F (laranja) – controle negativo (aves não vacinadas e não desafiadas).

Figura 5. Perfil cinético (médias) da produção de anticorpos do isótipo IgG anti-VBI detectados por ELISA nas amostras de soro sanguíneo das aves dos grupos A, B, C, D, E e F nos diferentes intervalos pós-vacinação (d.p.v) e pós-infecção (d.p.i). A seta vermelha indica o dia em que foi realizado o desafio.

7. DISCUSSÃO

A vacina contendo estirpe atenuada do genótipo BR-1, quando combinada com a vacina atenuada com a estirpe Massachusetts, foi capaz de conferir maior imuno proteção em termos de impedir a ciliostase traqueal e/ou de proporcionar reduções nas lesões histológicas e nas cargas virais. Os demais protocolos de vacinação testados no presente estudo, usando-se somente a vacina atenuada com estirpe do genótipo BR-1 ou com estirpe do genótipo Massachusetts, conferiram apenas proteção parcial, tanto contra o desafio com estirpe virulenta do genótipo BR-1 como contra o desafio com estirpe virulenta do genótipo Massachusetts do VBI.

Os resultados deste estudo corroboram os estudos anteriores, os quais demonstraram que há apenas uma imunidade cruzada parcial quando as aves são imunizadas com a estirpe Massachusetts e submetidas a infecções experimentais ou de campo com estirpes variantes do VBI (Fernando et al., 2013; 2017, De Wit et al., 2015). No entanto, o presente estudo descreve, em adição a isso, que o inverso também ocorreu, ou seja, aves imunizadas com a estirpe variante brasileira (genótipo BR-1) apresentaram apenas uma imunidade parcial frente a infecção experimental heteróloga com a estirpe virulenta do genótipo/sorotipo Massachusetts.

A avaliação de ciliostase mostrou que, após a vacinação, as aves vacinadas com as duas estirpes vacinais (do genótipo BR-1 e do genótipo Massachusetts) desenvolveram, embora de baixa intensidade, escores de ciliostase comparativamente maiores do que as aves que receberam apenas uma das estirpes vacinais. Entretanto, após o desafio, as aves deste grupo mantiveram uma maior integridade do movimento ciliar na traqueia, assim como desenvolveram menores lesões microscópicas nesse mesmo órgão e, ainda, revelaram uma menor carga viral na traqueia, pulmão e rins. Tais resultados, em princípio, eram esperados, visto que foram os grupos com maior replicação vacinal. Resultado semelhante foi encontrado por Okino et al., 2013, quando utilizaram dose cheia da vacinação.

Ainda e talvez mais importante que a razão anteriormente exposta, tais resultados podem ser devidos a uma maior homologia antigênica entre as estirpes vacinal e virulenta de desafio do genótipo BR-1, bem como ao possível aumento do espectro de proteção após terem sido associadas duas estirpes de sorotipos/genótipos diferentes do VBI (Cook et al., 1999; Terregino et al., 2008). Entretanto, não se sabe, a longo prazo, qual será o impacto dessa associação de estirpes vacinais de diferentes genótipos, visto que podem ocorrer recombinações entre os vírus vacinais e esse fenômeno pode dar origem a variantes recombinantes do VBI (Kusters et al., 1990; McKinley et al., 2008; Fraga et al., 2018).

As aves do grupo vacinado com a estirpe Massachusetts (grupo B), não demonstraram grandes reações pós-vacinais, pois não foi observado comprometimento do movimento ciliar da traqueia, assim como foram baixas as cargas virais pós vacinação quando comparadas com os demais grupos avaliados. No entanto, após o desafio com estirpe heteróloga (genótipo BR-1) foi observado um certo grau de ciliostase traqueal aos quatro d.p.i, que regrediu ao longo do período

estudado. Há uma concordância entre a avaliação de estase ciliar traqueal com as lesões observadas na análise histológica, as quais foram evidentes nesse grupo, fato que também foi observado nas amostras de rim. Ainda, tal observação comprova certo tropismo da estirpe variante pelo tecido renal (Winterfield e Hitchner, 1962; Cumming, 1963; Julian e Willis, 1969; Lambrechts et al., 1993). Da mesma forma, a carga viral acompanha os resultados observados nas lesões microscópicas nos diferentes grupos experimentais do presente estudo (Chong e Apostolov, 1982; Albassam *et al.*, 1986).

Além disso, os grupos que foram vacinados com a estirpe variante do genótipo BR-1 (grupo A) não demonstraram alterações patológicas relevantes pós-vacinação no movimento ciliar da traqueia apesar de a carga viral demonstrar que havia vírus vacinal se replicando nos tecidos estudados. Entretanto, após quatro d.p.i com estirpe homóloga (genótipo BR-1) nas aves vacinadas somente com vacina atenuada formulada com a estirpe do genótipo BR-1, observou-se um escore médio de ciliostase de 0,97, que representa 75% de integridade do movimento ciliar traqueal, bem como foram detectadas lesões histológicas em traqueia com escores médios de 3,33. Por outro lado, não foi observada nenhuma lesão renal. Nesse caso, então, demonstrou-se que houve proteção traqueal parcial por esse protocolo vacinal, uma vez que para ser considerado protegido, 90% dos anéis traqueais devem apresentar atividade normal do movimento ciliar (European Pharmacopoeia 8.0, 2013).

Com relação ao desafio heterólogo, realizado com estirpe virulenta do genótipo Massachusetts (grupo D), verifica-se que o grupo vacinado com a estirpe atenuada do genótipo BR-1 apresentou lesões microscópicas de maior intensidade na traqueia, expressas por maiores escores de estase ciliar e de alterações histopatológicas pós-desafio. Tal fato pode estar relacionado com as características antigênicas da estirpe de desafio Massachusetts em relação à estirpe vacinal do genótipo BR-1 e também devido a um menor espectro de imunidade cruzada em relação a sorotipos/genótipos heterólogos do VBI (Fernando et al., 2017; Bande et al., 2017).

A mensuração de anticorpos no soro sanguíneo neste estudo mostrou para a maior parte dos grupos de aves testados baixos níveis de anticorpos anti-VBI, mesmo após o desafio. Tais resultados vão ao encontro das considerações feitas

por Darbyshire e Peters (1984), que sugeriram que é desaconselhável mensurar esse tipo de anticorpos anti-VBI sistêmicos e tentar associá-los com imuno proteção ao desafio. E, de fato, a resposta de anticorpos pode ser muito baixa, como as detectadas no estudo em apreço, especialmente após a vacinação de pintos de um dia e portadores de elevados níveis de anticorpos maternos (De Wit, 2000).

Ademais, em relação aos anticorpos anti-VBI presentes no soro sanguíneo e, de acordo com os achados de Mondal e Naqi (2001), a vacinação de pintos com 1 dia de idade acelera a taxa de depleção de anticorpos maternos na circulação, o que pode explicar por que os anticorpos maternos presentes nos pintinhos de corte não interferiram na indução de resposta de imuno proteção frente ao desafio com estirpe virulenta BR-1 obtida pela combinação das vacinas vivas atenuadas com estirpes dos genótipos BR-1 e Massachusetts. Ainda, Davelaar e Kouwenhoven (1977) demonstraram que a imunização efetiva contra a BI pode ser obtida pela vacinação com a vacina contendo a estirpe H120 (estirpe Massachusetts) pelas vias conjuntival e intranasal em aves de um dia de idade, apesar da presença de altos níveis de anticorpos maternos circulantes, o que pode estar relacionado aos achados de estudos que indicam que a proteção pós-eclosão de curto prazo frente ao desafio com o VBI é devida aos anticorpos presentes na mucosa do trato respiratório e não aos anticorpos circulantes (Mondal e Naqi, 2001).

Sendo assim, pode-se concluir nesse ponto que a resposta de anticorpos sistêmicos presentes no soro sanguíneo após a vacinação contra o VBI em aves jovens é geralmente considerada inadequada para avaliação da eficácia de uma vacina viva atenuada contra o VBI. No entanto, a mensuração de anticorpos séricos anti-VBI é sugerida por algumas autoridades reguladoras como o método a ser usado para avaliar a potência de uma vacina viva atenuada, ao invés de realizar estudos de proteção *in vivo* (De Wit e Cook, 2014), sendo por esse motivo avaliado neste estudo.

Deve-se levar em consideração, ainda, que da mesma forma que há a especificidade de resposta *in vivo* entre diferentes estirpes virais, a baixa resposta sorológica observada no teste de ELISA deste estudo pode ser atribuída à baixa reação entre os anticorpos do soro sanguíneo obtidos pelo estímulo com a vacinação realizada com a estirpe variante do genótipo BR-1 com os antígenos adsorvidos nas microplacas do kit comercial utilizado para o ensaio sorológico, os

quais via de regra são preparados a partir da estirpe Massachusetts do VBI (Cook, et al, 2012).

Outros parâmetros, como as respostas imunes mediadas por anticorpos locais e por linfócitos T no compartimento das mucosas, especialmente no trato respiratório têm sido demonstrados como muito relevantes por apresentarem maiores correlações com o estado de proteção frente ao desafio com o VBI. Desta forma, esses dados poderiam explicar o desenvolvimento de um efetivo estado de imuno proteção contra o desafio com estirpe virulenta do genótipo BR-1 em frangos de corte com elevados títulos de anticorpos maternos (Okino et al., 2013; Lopes et al., 2018) e, portanto, devem ser acessados em futuros estudos envolvendo vacinas contra essas estirpes do VBI.

8. CONCLUSÕES

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

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

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

9. REFERÊNCIAS

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

Benyeda, Z.; Szeredi, L.; Mato', T.; Su'' Veges, T.; Balka, G.; Abonyi- To' Th , Z.; Rusvai, M.; And Palya, V. Comparative histopathology and immunohistochemistry of QX-like, Massachusetts and 793/B serotypes of infectious bronchitis virus infection in chickens. **Journal of Comparative Pathology**, v. 143, n. 4, p. 276-283, 2010.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

European Pharmacopoeia 8.0, 8th ed. (2013)

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Rocha, F.R.T. **Produção e caracterização de anticorpos monoclonais contra a glicoproteína S1 do vírus da bronquite infecciosa das galinhas.** 2000. 31p. Dissertação (Mestrado) - Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2000.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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