

UFRRJ
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
VETERINÁRIAS

DISSERTAÇÃO

Variabilidade do gene S1 em tecidos de aves naturalmente infectadas pelo vírus da Bronquite Infecciosa das Galinhas em granjas do Estado do Rio de Janeiro.

Tays Araujo Camilo

2017



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

**VARIABILIDADE DO GENE S1 EM TECIDOS DE AVES INFECTADAS
NATURALMENTE PELO VÍRUS DA BRONQUITE INFECCIOSA DAS
GALINHAS EM GRANJAS DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO.**

Tays Araujo Camilo

Sob a orientação do professor
Huarrisson Azevedo Santos

e Co-orientação do professor
Marcos Fábio Lima

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências**, no Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias.

Seropédica, RJ
Março de 2017

Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
Biblioteca Central / Seção de Processamento Técnico

Ficha catalográfica elaborada
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

C115v Camilo, Tays Araujo, 1991-
Variabilidade do gene S1 em tecidos de aves naturalmente infectadas pelo vírus da Bronquite Infecciosa das Galinhas em granjas do Estado do Rio de Janeiro. / Tays Araujo Camilo. - 2017.
64 f.: il.

Orientador: Huarrisson Azevedo Santos.
Coorientador: Marcos Fábio Lima.
Dissertação(Mestrado). -- Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Curso de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, 2017.

1. Sanidade Avícola. 2. Avicultura. 3. Bronquite Infecciosa das Galinhas. 4. Biologia Molecular. I. Santos, Huarrisson Azevedo, 1980-, orient. II. Lima, Marcos Fábio, 1977-, coorient. III Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Curso de Pós-graduação em Ciências Veterinárias. IV. Título.

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
CURSO DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

TAYS ARAUJO CAMILO

Dissertação submetida como requisito parcial para a obtenção do grau de **Mestre em Ciências Veterinárias**, no Curso de Pós Graduação em Ciências Veterinárias.

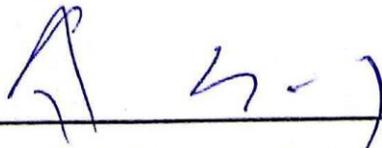
Dissertação Aprovada em 07/03/2017



Huarrisson Azevedo Santos (DR.) UFRRJ



Daniel da Silva Guedes Junior (DR.) FIOCRUZ



Paulo Cesar Augusto de Souza (DR.) UFRRJ

DEDICATÓRIA

Dedico esta dissertação a Deus, como fonte de energia e fé que me permitiu ter saúde e oportunidades de chegar até onde cheguei. Aos meus pais, que são minha estrutura mais firme para caminhar todos os dias, principalmente a minha mãe Isabel que é uma guerreira e um exemplo de força e determinação. Ao meu orientador que me deu todo apoio e oportunidade. Ao meu co-orientador que auxiliou e contribuiu em todo o processo deste trabalho. Aos meus colegas de laboratório, que me auxiliaram e me apoiaram em todo o processo.

AGRADECIMENTOS

Agradeço imensamente ao meu professor-orientador Huarrisson Azevedo Santos, pela oportunidade de crescimento profissional que me proporcionou, desde o convite para iniciação científica como orientada do excelente professor Carlos Luis Massard, até o convite para a pós graduação.

Agradeço ao meu co-orientador Marcos Fábio que nos auxiliou em todo o processo de execução deste trabalho! Você foi muito importante! Agradeço ao Ramon Pimenta por todo auxílio em nossos contatos e coletas, e pelos momentos de aprendizagem neste mundo avícola!

Agradeço ao pessoal do Laboratório de Anatomia Patológica, técnica Leticia, a colega Mariana, em especial a Prof^a Dra. Marilene que foi essencial para elaboração deste trabalho.

Agradeço de coração a todos meus colegas de laboratório, que me incentivaram e me ensinaram tudo que sei hoje, a todo este apoio, eu agradeço, mas principalmente ao Marcus Sandes e Maristela Peckle que me receberam desde o início no laboratório e me acolheram, me auxiliando em tudo que precisei! Aos técnicos Josemar e Daniella Coelho que foram essenciais em todo o processo.

Agradeço a minha amiga, tão atrapalhada quanto eu, Débora Martins, que sempre esteve ao meu lado nestas aventuras científicas que mergulhamos desde o início do mestrado! Obrigada por me ajudar a segurar todos os momentos difíceis, você foi essencial em todo o processo, minha Patata!

Agradeço aos meus amigos por todo apoio e amizade, as cervejas de cada dia, as risadas, a descontração que me ajudaram a ser uma melhor pessoa e enfrentar todas as dificuldades. Agradeço principalmente ao Fernando Sayeg e André Mecawi que me ajudaram muito nesta etapa profissional, com conselhos e apoio. Agradeço aos meus amigos de SP, principalmente Juliana, que sempre me aconselharam a “relaxar” que tudo daria certo, e olha, deu!

Agradeço a minha família, principalmente minha mãe Isabel Cristina e ao meu pai Marcelo Aires por toda estrutura psicológica e financeira, por toda educação e coragem que me ensinaram a ter; ao meu irmão Rafael Araujo, que desejo toda sorte do mundo e coragem para enfrentar e chegar ao seu objetivo.

Agradeço ao meu namorado/amigo Fabricio L. de Sousa que foi meu companheiro para todos os momentos, desde o início do mestrado, esteve ao meu lado em momentos bons e ruins e a cada dia me ajuda a ser alguém melhor para mim mesma.

BIOGRAFIA

Tays Araujo Camilo, paulista paulistana, nasceu em 11 de agosto de 1991, num domingo do dia dos pais. Filha de Isabel Cristina Cordeiro de Araujo Camilo e Marcelo Aires Camilo. Estudou o ensino fundamental em Barueri, na escola municipal EMEF Francisco Zacarioto, no bairro Maria Helena. No ensino médio estudou na escola estadual E.E Toufic Jouliau. Entrou na Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro em março de 2010, durante a graduação fez estágio com Imunologia, clínica de grandes, clínica de equinos no Equicenter (Tatuí – SP), clínica de Silvestres em Cabo Frio, estagiou no laboratório de coccídios e coccidioses da UFRRJ e onde realizou sua primeira iniciação científica, com a publicação de dois resumos em congresso; Realizou seu estágio supervisionado em dois locais, o primeiro na Universidade de São Paulo no departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal - VPS e o segundo no Laboratório de Sanidade Avícola – LASAVE da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Em Agosto de 2015 entrou para o Mestrado na Universidade federal Rural do Rio de Janeiro, no curso de Ciências Veterinárias, sob a orientação de Huarrisson Azevedo Santos com a realização de sua defesa de dissertação em março de 2017.

RESUMO

CAMILO, Tays Araujo. **Variabilidade do gene S1 em tecidos de aves naturalmente infectadas pelo vírus da Bronquite Infecciosa das Galinhas em granjas do Estado do Rio de Janeiro**. 2017. 64p. Dissertação. (Mestrado em Ciências Veterinárias). Instituto de Veterinária, Departamento de Parasitologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2017.

O vírus da Bronquite Infecciosa das Galinhas (vBIG) é um agente viral altamente contagioso entre a espécie *Gallus gallus*, sendo considerado uma das patologias que mais acomete a avicultura mundial. A vacinação como forma de prevenção a esta doença, não tem sido eficaz, devido a grande variabilidade genética encontrada. Assim como no mundo, no Brasil também já existem diversos estudos caracterizando a variabilidade genética encontrada neste vírus. No Rio de Janeiro, a criação avícola sofre com a doença, porém ainda não existe um estudo recente com o objetivo de analisar a variabilidade genética das cepas encontradas, como uma forma de apoio a estudos epidemiológicos, que possam auxiliar no futuro, na escolha de protocolos vacinais mais adequados. Este estudo teve como objetivo realizar a caracterização molecular do gene S1 do vírus da Bronquite Infecciosa das Galinhas (vBIG) em granjas de frangos de corte na região Sul fluminense, como também avaliar a variabilidade genética do gene S1 em um surto de BIG em uma granja de poedeiras da região Norte fluminense. Foram realizadas coletas de tecidos dos animais que apresentavam sinais clínicos compatíveis com BIG, como perda de peso, problemas respiratórios e baixa produtividade. Amostras de tecidos coletados foram armazenadas em solução de RNA Later e formalina 10% tamponada para os diagnósticos molecular e histopatológico, respectivamente. Para realização das análises moleculares foram utilizadas técnicas de extração de RNA, bem como RT-PCR (“Reverse Transcriptase, Polymerase Chain Reaction”), PCR em tempo real (RT-qPCR), “Nested” PCR (RT-nPCR), e sequenciamento de algumas amostras coletadas. Para as análises histopatológicas foram realizadas clivagem e elaboração de lâminas de microscopia. Os resultados obtidos do sequenciamento foram comparados a sequência da cepa vacinal Ma5, como cepa referência, além de outras sequências depositadas no GenBank, apresentando um percentual de identidade variável de 72,41% a 100%. Dentre as amostras de cada granja, houve variabilidade, até mesmo dentro de uma mesma ave. Todas as sequências analisadas foram descritas como genótipo 1, pertencentes as linhagens 1 e 11; Na comparação de aminoácidos, houve mudanças nas regiões hipervariáveis do vírus nas sequências classificadas como BR-1, podendo explicar a baixa proteção-cruzada que vêm ocorrendo nos plantéis brasileiro. Estes resultados demonstraram a importância da identificação gênica do vírus, pois se torna uma ferramenta importante na vigilância epidemiológica e em elaborações de protocolos vacinais que sejam eficientes.

Palavras-chave: *Gallus gallus*; tecidos; RT-PCR; coronaviroses; bronquite infecciosa das galinhas;

ABSTRACT

CAMILO, Tays Araujo. **Variability of the S1 gene in tissues of naturally infected birds by the Infectious Bronchitis Virus of Hens on farms in the State of Rio de Janeiro.** 2017. 64p. Dissertation. (Master in Veterinary Science). Instituto de Veterinária, Departamento de Parasitologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2017.

Infectious Bronchitis Virus (vBIG) is a highly contagious viral agent among the species *Gallus gallus*, being considered one of the pathologies that most affects small and large world poultry producers. Vaccination as a form of prevention to this disease, has not been effective, due to the great genetic variability found. As in the world, in Brazil there are already several studies characterizing the genetic variability found in this virus. In Rio de Janeiro, poultry farming suffers from the disease, but there is no recent study to analyze the genetic variability of the strains found, as a way of supporting epidemiological studies that may help in the future, in the choice of Protocols. The objective of this study was to characterize the S1 gene of the Chicken Infectious Bronchitis virus (vBIG) in chickens farms in the southern region of Rio de Janeiro, as well as to evaluate the genetic variability of the S1 gene in a BIG outbreak on a farm Of laying hens of the northern region of. Tissue samples were collected from animals presenting BIG-compatible clinical signs, such as weight loss, respiratory problems and low productivity. Samples of collected tissues were stored in solution of RNA Later and formalin 10% buffered for molecular and histopathological diagnoses, respectively. In order to perform the molecular analyzes, RNA extraction techniques, as well as RT-PCR (Reverse Transcriptase, Polymerase Chain Reaction), real-time PCR (RT-qPCR), Nested PCR (RT-nPCR), and Sequencing of some samples collected. For the histopathological analyzes, cleavage and preparation of microscopy slides were performed. The results obtained from the sequencing were compared to the sequence of the Ma5 vaccine strain as reference strain, in addition to other sequences deposited on GenBank, exhibiting a variable identity percentage of 72.41% to 100%. Among the samples from each farm, there was variability, even within the same bird. All sequences analyzed were described as genotype 1, belonging to strains 1 and 11; In the comparison of amino acids, there were changes in the hypervariable regions of the virus in the sequences classified as BR-1, being able to explain the low cross-protection that have been occurring in Brazilian plants. These results demonstrated the importance of virus identification, since it becomes an important tool in epidemiological surveillance and in the elaboration of efficient vaccine protocols.

Keywords: *Gallus gallus*; tissue; RT-PCR; Coronaviruses; Infectious bronchitis of chickens;

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Informações epidemiológicas das sequências de amostras de vBIG coletadas e publicadas no GenBank utilizadas para a análise da variabilidade do gene S1 do vBIG. 18
- Tabela 2.** Análise em relação ao número e posição das substituições de aminoácidos da sequência de polipeptídeo deduzida de uma porção do gene S1 de amostras classificadas no sorotipo Massachusetts obtidas de frangos de corte e galinhas de postura positivas para o vBIG através da técnica de RT-nPCR em granjas do estado do Rio de Janeiro. A cepa vacinal Ma5 do sorotipo Massachusetts sob número de acesso KU367447 no GenBank foi utilizada como sequência de referência 35
- Tabela 3.** Análise em relação ao número e posição das substituições de aminoácidos da sequência de polipeptídeo deduzida de uma porção do gene S1 de amostras classificadas no sorotipo BR obtidas de frangos de corte positivos para o vBIG através da técnica de RT-nPCR em granjas do estado do Rio de Janeiro. A cepa USP sob número de acesso DQ4482741 no GenBank foi utilizada como sequência de referência. 38
- Tabela 4.** Alterações microscópicas observadas em cortes histológicos do tecido traquel, renal e intestinal de aves positivas para o vBIG através da técnica de RT-nPCR em granjas de frangos de corte e galinha de postura do estado do Rio de Janeiro. 42

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Estrutura do genoma do vBIG. Em verde representação do ORF 1(a e b), seguidos respectivamente das proteínas estruturais e acessórios (proteína S, E, M e N) em azul e (3 a/b e 5 a/b. Fonte: Perlman e Netland (2009) com adaptações. 6
- Figura 2.** Desenho esquemático da composição proteica do coronavírus, incluindo o vBIG. Fonte: Perlman e Netland (2009) com adaptações. 7
- Figura 3.** Localização geográfica das mesorregiões estudadas. A (Sul Fluminense) e B (Norte Fluminense), ambos coloridos em cinza. Fonte: <<http://www.mapasparacolorir.com.br/mapa-estado-rio-de-janeiro.php>>. 12
- Figura 4.** Curva de dissociação de um fragmento de 147 pares de base da região 5' UTR do genoma do vírus da Bronquite Infecciosa das Galinhas amplificado através da reação de RT-qPCR utilizando as amostras de cDNA de tecidos de aves naturalmente infectadas por vBIG em granjas do estado do Rio de Janeiro (Callison et al., 2006). 22
- Figura 5.** Eletroforese em gel de agarose 2% corado com brometo de etídeo mostrando a amplificação de 600 pares de base através da RT-nPCR do gene S1 do vírus da Bronquite Infecciosa das Galinhas. PM = Peso molecular de 1kb plus (Invitrogen), linha 1 = Controle negativo; linha 2 = Controle Positivo (cepa vacinal Ma5) e linhas 3 a 11 = amostras positivas para o vBIG da granja de frango de corte no município de Lidice, RJ. 23
- Figura 6.** Agrupamento filogenético baseado em 600 nucleotídeos do gene S1 do vBIG detectados por RT-nPCR em tecidos de aves naturalmente infectadas em granjas do estado do Rio de Janeiro. O conjunto de dados total foram de 245 sequências disponíveis no GenBank. Em G1 – 11, estão agrupados as sequências classificadas como variantes Brasileiras (BR) e no G1-1, as amostras classificadas como variantes da cepa Massachusetts. 25
- Figura 7.** Comparação par-a-par do Percentual de Identidade (diagonal inferior) e diferença (diagonal superior) de um fragmento de aproximadamente 600 pares de base do gene S1 do vírus da Bronquite infecciosa das Galinhas (vBIG) obtidas de amostras de tecido da traquéia, rim e intestino de aves positivas para o vBIG pela RT-nPCR em granjas de frangos de corte e galinha de postura do estado do Rio de Janeiro. A cepa vacinal Ma5 do sorotipo Massachusetts foi utilizada como sequência de referência. 26
- Figura 8.** Alinhamento local de nucleotídeos de uma sequência de aproximadamente 600 pares de base do gene S1 do vírus da Bronquite Infecciosa das Galinhas obtidas a partir dos tecidos da Traqueia, Rim e Intestino de aves positivas no RT-nPCR em granjas de frango de corte e galinha de postura no estado do Rio de Janeiro. Foi utilizado como referência a cepa vacinal 27

Ma5 com número de acesso no GenBank de KU736747.

- Figura 9.** Comparação par-a-par do Percentual de Identidade (diagonal inferior) e diferença (diagonal superior) de um fragmento de aproximadamente 600 pares de base do gene S1 do vírus da Bronquite infecciosa das Galinhas (vBIG) obtidas de amostras de tecido da traquéia, rim e intestino pertencentes ao sorotipo Massachusetts de aves positivas para o vBIG pela RT-nPCR em granjas de frangos de corte e galinha de postura do estado do Rio de Janeiro. A cepa vacinal Ma5 do sorotipo Massachusetts foi utilizada como sequência de referência. 31
- Figura 10.** Comparação par-a-par do Percentual de Identidade (diagonal inferior) e diferença (diagonal superior) de um fragmento de aproximadamente 600 pares de base do gene S1 do vírus da Bronquite infecciosa das Galinhas (vBIG) pertencentes ao Sorotipo BR obtidas de amostras de tecido da traquéia, rim e intestino de aves positivas para o vBIG pela RT-nPCR em granjas de frangos de corte do estado do Rio de Janeiro. A cepa UFMG do sorotipo BR (JX182775) foi utilizada como sequência de referência. 32
- Figura 11.** Comparação par-a-par do Percentual de Identidade (diagonal inferior) e diferença (diagonal superior) de um fragmento de aproximadamente 600 pares de base do gene S1 do vírus da Bronquite infecciosa das Galinhas (vBIG) pertencentes ao Sorotipo BR obtidas de amostras de tecido da traquéia, rim e intestino de aves positivas para o vBIG pela RT-nPCR em granjas de frangos de corte do estado do Rio de Janeiro. A cepa USP do sorotipo BR (DQ448274) foi utilizada como sequência de referência. 36
- Figura 12.** Percentual de similaridade de aminoácidos de uma porção do gene S1 de amostras variantes do tipo BR obtidas de aves naturalmente infectadas de granjas do Rio de Janeiro, comparadas a amostra referência DQ4482741 - USP. 39
- Figura 13.** Percentual de similaridade de aminoácidos de uma porção do gene S1 de amostras variantes do tipo BR obtidas de aves naturalmente infectadas de granjas do Rio de Janeiro, comparadas a amostra referência JX182775 - UFMG.
- Figura 14.** Agrupamento filogenético baseado em 600 nucleotídeos do gene S1 do vBIG detectados por RT-nPCR em tecidos de aves naturalmente infectadas em granjas do estado do Rio de Janeiro. O conjunto de dados total foram de 245 sequências disponíveis no GenBank. Em G1 – 11, estão agrupados as sequências classificadas como variantes Brasileiras (BR) e no G1-1, as amostras classificadas como variantes da cepa Massachusetts. 40
- Figura 15.** Análise histopatológica em tecidos de aves naturalmente infectadas com Bronquite Infecciosa das Galinhas em granjas do Estado do Rio de Janeiro. A: Traqueia de galinha da região de Macaé apresentando erosão epitelial, perda de cílios e infiltração da lâmina própria – aumento de 16X. B: Rim 43

de Galinha da região de Macaé com vaso congesto com presença de hemossiderina – aumento de 6.3X. C: Traqueia de Galinha da região de Vargem Alegre com desprendimento do epitélio – aumento de 16X. D: Rim de Galinha da região de Vargem Alegre com infiltração de células mononucleares multifocal – aumento de 40X. E: Traqueia de Galinha da região de Passa Três com Hipertrofia de células caliciformes – aumento de 6.3X; F: Tonsila Cecal de galinha com presença de detritos nucleares e figuras mitóticas – aumento de 40X. G: Traqueia de Galinha da região de Lidice com hipertrofia e hiperplasia de células caliciformes – aumento de 16X; H: Rim de Galinha da região de Lidice com proliferação de células mononucleares – aumento de 40X;

LISTA DE ABREVIATURAS

BIG	Bronquite Infecciosa das Galinhas
vBIG	Vírus da Bronquite Infecciosa das Galinhas
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
PCR	Reação em cadeia da polimerase (em inglês <i>Polymerase Chain Reaction</i>)
qPCR	PCR em Tempo Real
Macro	Macroscopia
RT-PCR	Reação da Transcriptase Reversa
Micro	Microscopia
OIE	World Organization for Animal Health
DEPC	Diétil Pirocarbonato
PBS	Tampão Fosfato Salino
cDNA	Dna complementar
RHV	Região Hiper Variável
PA	Altamente puro – para análise

Sumário

1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1 Breve histórico da avicultura brasileira.....	3
2.2 Bronquite Infecciosa das Galinhas.....	5
2.3 O agente etiológico.....	5
2.4 Proteína de Espícula (S).....	7
2.5 Patogênese do vBIG.....	8
2.6 Lesões Macro e Micro da BIG.....	9
2.7 Exames Diagnósticos	9
2.8.Prevenção e Controle.....	10
3. MATERIAL E MÉTODOS	12
3.1 Locais de coleta de amostras.....	12
3.2 Questionário Epidemiológico.....	12
3.3 Coleta.....	13
3.4 Vacinas.....	13
3.5 Extração de RNA.....	14
3.5.1 Extração de RNA das cepas vacinais.....	14
3.5.2 Extração de RNA de cartão FTA com cepa BR1.....	15
3.5.3 Extração de RNA dos tecidos.....	15
4 Detecção molecular do VBIG através da RT-PCR e RT-qPCR.....	15
4.1 Transcrição Reversa (Síntese de cDNA).....	16
5.1 Detecção molecular do vBIG por RT-qPCR.....	16
5.2 Detecção molecular do vBIG por RT-NestedPCR (RT-nPCR).....	17
5.3 Purificação dos produtos da RT-nPCR.....	17
5.4 Sequenciamento de um fragmento do gene S1 do vBIG.....	17
5.5 Análise da variabilidade do gene S1 do vBIG.....	17
6 Análise das lesões em nível microscópico em Traquéia, Rim e Intestino de aves positivas na RT-nPCR para o vBIG.....	20
7. RESULTADOS	21
7.1 Questionário Epidemiológico.....	21
7.2 Detecção molecular do vBIG através da RT-qPCR.....	21
7.3 Detecção molecular do vBIG por RT-nPCR.....	22
7.4.Análise da sequencia parcial de nucleotídeos do gene S1 do vBIG.....	23
7.5 Variabilidade na sequência de aminoácido deduzido do gene S1 do vBIG.....	34
7.6 Análise histopatológica.....	41
8. DISCUSSÃO	45
8.1 Análise da variabilidade genética do gene S1 do vBIG.....	45
8.2 Alterações histopatológicas.....	49

9. CONCLUSÃO	50
10. CONSIDERAÇÕES FINAIS	51
11. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	52

1 INTRODUÇÃO

A Bronquite Infecciosa das Galinhas (BIG) é uma doença com alta morbidade em aves domésticas da espécie *Gallus gallus*, e é causada por um agente viral (vBIG), que pertence a família *Coronaviridae*, sub-espécie *Gammacoronavirus*. Descrito inicialmente na Dakota do Norte, Estados Unidos, em 1931 e em Minas Gerais, Brasil, em 1957. Este agente pode afetar diversos sistemas fisiológicos das aves, como sistema respiratório, genito-urinário, reprodutor e intestinal, causando um prejuízo imenso para a indústria avícola (CAVANAGH, 2005, 2007; DIFÁBIO, VILLAREAL, 2009; JACKWOOD et al., 2012; LIN et al., 2012; BALESTRIN et al., 2014).

O setor avícola brasileiro possui uma grande representatividade, apresentando-se hoje como o maior exportador de carne de frango do mundo e segundo maior produtor (AGÊNCIA BRASIL, 2015). Devido a dimensão da produtividade observada neste setor da agropecuária, torna-se constante a busca de conhecimento sobre as patologias recorrentes, formas de prevenção e controle, visando biossegurança e rentabilidade nos plantéis avícolas. Dentre estas patologias, a BIG encontra-se atualmente como uma das patologias que causa maior prejuízo econômico para a indústria avícola, ficando abaixo somente da Influenza avícola de alta patogenicidade (CAVANAGH, 2007), tamanha sua importância, esta doença está incluída desde maio de 2013, na lista de doenças de importância econômica mundial da “World Organization for Animal Health” (OIE, 2013).

O vírus da BIG (vBIG) é um agente cujo o material genético é de natureza RNA, de fita simples, sentido positivo, com um tamanho aproximado de 27 kB. É um vírus com alto potencial mutagênico devido sua instabilidade genética, e ao longo dos anos, por todo mundo, inclusive no Brasil, é possível encontrar cepas variantes. O estudo de variabilidade das cepas é realizado principalmente por meio do estudo da porção S1 da glicoproteína S, a qual possui atribuições biológicas como a definição do tropismo celular, determinação sorotípica e indução de anticorpos neutralizantes (CAVANAGH, 2007; GALLARDO et al., 2011). Diversos estudos contribuem com possíveis explicações para o alto potencial de variabilidade do vBIG, desde deleções e inserções como sendo importantes estratégias de evolução do vírus (CAVANAGH; GELB, 2008; COOK et al., 2012; JACKWOOD, 2012; TORO et al., 2012).

A vacinação dos plantéis avícolas, de corte ou poedeiras, ocorre como forma de prevenção da doença. Contudo devido à emergência de cepas variantes é observada uma baixa proteção cruzada, pois não ocorre um prototipo eficiente quando a ave passa por um desafio a campo, mesmo vacinadas (JACKWOOD, 2012; WANG et al., 2012). É interessante citar, que esta doença descoberta há mais de 80 anos, ainda não possui a prevenção como forma de combate ao vírus, e somente há um controle de surtos utilizando a vacina (COOK, 2001; JACKWOOD, 2012).

Apesar de ser uma doença mundialmente estudada, ainda não foi possível a obtenção de um programa vacinal eficiente, observando-se emergência genotípica em diversos estados. A caracterização molecular, como ferramenta investigativa, torna-se importante para elucidar o tipo viral predominante em certa região, contribuindo com informações sobre o vBIG que pode futuramente auxiliar na prevenção da doença. Este trabalho teve como objetivos: 1) detecção molecular de vBIG em aves de granjas do RJ através de metodologias moleculares; 2) Caracterização genotípica de um fragmento do gene S1 de aves naturalmente infectadas por vBIG; 3) Análise histopatológica de tecidos de traqueia, rim e tonsila cecal de aves naturalmente infectadas por vBIG;

Os resultados obtidos no presente estudo demonstraram a prevalência duas linhagens virais em quatro granjas de mesorregiões do estado do Rio de Janeiro, sendo possível observar a co-existência de diferentes genótipos dentro de uma mesma granja e até mesmo dentro de uma mesma ave. A histopatologia demonstrou-se como uma ferramenta ainda deficiente no diagnóstico da BIG, por não apresentar características microscópicas próprias da doença, tornando-se inconclusiva, contudo, foi de alto valor investigativo na obtenção de maiores informações de lesões que possam ser passíveis de ocorrer em aves infectadas pelo vBIG. Espera-se que este trabalho possa contribuir em âmbito acadêmico e produtivo, visando apresentar a realidade da doença e o genótipo prevalente nestas propriedades.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Breve histórico da avicultura brasileira

A avicultura brasileira teve início por volta de 1500, época do Descobrimento do Brasil, segundo alguns relatos encontrados em cartas de Pero Vaz de Caminha, este, que era responsável pelos registros da viagem na esquadra Lusa, que aportou em 22 de abril de 1500, no litoral sul do que hoje conhecemos como Bahia. As primeiras matrizes avícolas chegaram através das primeiras caravelas, em 1502, no navio comandado por Gonçalo Coelho. Porém, em 1500, há relatos encontrados nas cartas de Pedro Vaz de Caminha, quando apresentaram animais que traziam nas embarcações aos indígenas, no trecho que dizia “*Mostralham-lhes uma galinha; quase tiveram medo dela, e não queriam pôr a mão. Depois lhe pegaram, mas como espantados*” (UBABEF, 2011; QUEVEDO, 2016).

As aves inicialmente trazidas ao Brasil eram mestiças e serviam para produção de carne e ovos para o consumo humano. Esta produção avícola mais rústica se desenvolveu primeiramente em cidades litorâneas do Brasil. Ao longo dos anos, com o crescimento demográfico, e o início da mineração de ouro, observou-se a necessidade e vantagem na produção de aves com fins comerciais, não mais de forma artesanal como anteriormente. O estado de Minas Gerais, no final do século XIX, foi o primeiro a ter uma produção que abastecesse diversos territórios do país (UBABEF, 2011).

Em 1895 se iniciou a produção de aves de linhagens puras, no Rio de Janeiro. Estes criadores eram chamados de “basse-cour”, e foram os grandes responsáveis pelo incentivo à avicultura nacional. Estudos realizados pela “Leste Basse-Cour” promoveram a seleção das raças de aves importadas com maior potencial econômico de produção, que favorecessem a criação avícola brasileira. A primeira raça criada no Brasil foi a “Orpington”, proveniente da Inglaterra, que teve boa adaptação ao clima brasileiro, o que favoreceu a sua difusão entre diversos estados, principalmente no Sul do Brasil. Esta raça possuía qualidades de boa poedeira e uma interessante produtora de carne, contribuindo para o melhoramento genético de plantéis já existentes. Também foram introduzidas raças como “Plymouth Rock”, trazidas pelo Dr. Salvador de Mendonça, antigo ministro plenipotenciário em Washington. A raça “Plymouth Rock”, hoje é a exemplar constituinte da “Plymouth Barred Rock”, conhecida popularmente como carijó, ave rústica que teve boa adaptação em produções rurais (UBABEF, 2011).

A avicultura brasileira foi desenvolvida através de muitos estudos sobre produção, tendo dois nomes como pioneiros nesta história, Delgado de Carvalho e J. Wilson da Costa, que com conhecimento de técnica de produção avícola européia e norte-americanas, construíram as bases responsáveis pela avicultura dos dias atuais. Até o século XIX o peso de abate de 2,5 kilos demorava até seis meses para engorda, logo, era necessário otimizar o tempo de engorda para produção de carne de frango, buscando se adaptar ao crescimento populacional que já passava de 30,6 milhões de habitantes (UBABEF, 2011).

No ano de 1913, foi fundada a Sociedade Brasileira de Avicultura, embasada em normas da “American Poultry Association”, com o objetivo de auxiliar no desenvolvimento de criação avícola do país, por meio de evento que trouxessem apoio e aperfeiçoamento na produção de pequenos e grandes produtores. Nesta mesma época, algumas escolas foram criadas, como “Ascurra Basse-Cour”, no Rio de Janeiro, e todas estas mudanças, demarcaram o início de uma produção que buscava o aprimoramento do produto que já se mostrava tão rentável (ARASHIRO, 1989; UBABEF, 2011).

A cadeia produtiva de carne de frango permaneceu como de subsistência até os anos 1970, sem uma expressividade econômica, contudo, a partir da introdução das linhagens das raças “Leghorn” e “New Hampshire” nos estados de São Paulo e Rio de Janeiro, com a intenção de substituir as raças rústicas antes criadas, houve um incentivo ao crescimento dos estudos genéticos no Instituto de Pesquisa e Experimentação Agropecuária do Centro Sul (IPEACS), na Granja Guanabara/RJ, na Escola Superior Luiz de Queiroz/SP e na Universidade de Viçosa/MG. Os resultados foram favoráveis a produção avícola, com uma redução de mortalidade, aumentando-se a capacidade de conversão alimentar, que favoreceu o ganho de peso com menor idade de abate e uma velocidade de crescimento maior as anteriores. Todas essas pesquisas resultaram em uma expansão da produtividade neste setor (CANEVER et al., 1997; FRANÇA, 2000; VIEIRA; DIAS, 2005; ALBINO; TAVERNARI, 2008; ESPINDOLA, 2012).

Entre os anos 1970 a 1990, o Brasil passou por uma segunda fase de crescimento do setor avícola, com modernização da produção, devido a instalação de novas plantas produtivas, na década de 80, já eram 32 abatedouros instalados em estados como São Paulo, Minas Gerais, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul (CANEVER et al., 1997; FRANÇA, 2000; VIEIRA; DIAS, 2005; ALBINO; TAVERNARI, 2008; ESPINDOLA, 2012). Inicia-se então a instalação de grandes empresas do setor avícola, como a Sadia, precursora do modelo de produção de aves integradas, Perdigão, Seara, entre outras.

Atualmente, a avicultura brasileira tomou proporções gigantescas frente a mercados internacionais, ocupando a liderança na exportação de carne de frango desde 2011, exportando para 155 países, cerca de 4,76 milhões de toneladas de frango (MAPA, SECEX, 2014). Em 2015, a Associação Brasileira de Proteína Animal (ABPA) publicou que o Brasil tornou-se o segundo maior produtor de carne de frango do mundo, ultrapassando a China, com até 13,1 milhões de toneladas.

O crescimento deste setor foi marcado por uma série de fatores que proporcionaram um investimento na área, favorecendo a produção, tais como: melhoramento genético de linhagens e insumos, investimentos em tecnologias de automatização do sistema produtivo, aperfeiçoamento em biossegurança, manejo produtivo e incentivo a um sistema de produção integrado (MAPA, 2012; OLIVEIRA; NÄÄS, 2012).

O processo de industrialização do setor avícola brasileiro trouxe mecanismos estruturais padronizados que resultaram em um crescimento importante para este setor frente à economia nacional.

Até os anos de 1970, o setor aviário possuía menor produtividade comparada a atual, contudo a necessidade de competitividade entre o mercado avícola brasileiro e outros países produtores impulsionou que houvesse maior auxílio por parte das grandes indústrias, que trouxeram insumos e tecnologias, juntamente a padronização das criações, visando qualidade total e competição do mercado avícola brasileiro com outros países produtores o Brasil conseguiu ter uma elevada ascensão deste mercado (DALLA COSTA; SHIMA, 2007).

Nas últimas três décadas, o Brasil apresentou uma avicultura de competitividade mercantil perante outros países, com altos índices de crescimento, tornando-se o líder mundial de exportação de carne de frango. Hoje, o Brasil exporta para mais de 142 países, sendo um importante setor do agronegócio brasileiro. A qualidade dos produtos avícolas brasileiros, juntamente a sanidade e preço, aumentaram a demanda produtiva do Brasil. A modernização do setor, o manejo adequado dos plantéis aviários, a

sanidade, a alimentação balanceada, melhoramento genético e a produção integrada fizeram deste mercado um exemplo para outros países. Segundo dados publicados pelo Ministério da Agricultura, Abastecimento e Pecuária (MAPA), a taxa de crescimento de produção da carne de frango, por exemplo, deve alcançar 4,22%, anualmente, nas exportações, com expansão prevista em 5,62% ao ano, o Brasil deverá continuar na liderança mundial (MAPA, 2016).

2.2 Bronquite Infecciosa das Galinhas

A primeira descrição da Bronquite Infecciosa das Galinhas (BIG) ocorreu em Dakota do Norte, Estados Unidos da América (EUA), por Shalk e Hawn, que relataram sintomas de uma patologia respiratório em aves jovens (*Gallus gallus*) (SCHALK; HAWN, 1931). O primeiro isolamento do vírus caracterizou a cepa como Massachusets (Mass) em 1930 e Connecticut (Conn) em 1950, e durante muitos anos foram as únicas cepas encontrada em diversos plantéis, até Jungherr et al obter uma variante das cepas existentes (COOK et al., 2012; DE WIT et al., 2011) em 1956 utilizando o método de vírus neutralização (JUNGHERR, 1956). Através da descoberta desta nova variante foi observado que não havia proteção cruzada entre as variantes existentes. Após estas descrições do vírus da Bronquite Infecciosa das Galinhas (VBIG), diversos outros sorotipos foram encontrados por plantéis em todo o mundo, por meio de diversos métodos diagnósticos, como: de neutralização de anticorpos, tipificação genotípica, análise de sequências de aminoácidos, principalmente da proteína de espícula (S) – porção S1, que é a porção mais estudada a fim de elucidar o nível de proteção cruzada das cepas existentes (CAVANAGH, 1997; LEE et al., 2003; LADMAN et al., 2006).

No Brasil, a BIG a cepa Mass foi inicialmente identificada em plantéis de Minas Gerais, por Hipólito em 1957 (SILVA, 2010). Sendo utilizada como cepa vacinal. Desde então, diversas cepas variantes são identificadas em produções avícolas por todo o Brasil e seus países vizinhos (ALVARADO et al., 2005; VILLARREAL et al., 2007; RIMONDI et al., 2009; FELIPPE et al., 2010). Dois estudos sugeriam uma prevalência de similaridade entre proteínas da porção S1 de uma cepa intitulada “Brazil” (BR-1) em diversos plantéis do país até o ano de 2009 (VILLARREAL et al., 2010; CHACÓN et al., 2011). Outros trabalhos foram descritos no Brasil, apresentando cepas variantes e a cada ano demonstra-se uma emergência de variabilidade gênica, o que causa uma preocupação constante a produção avícola.

2.3 O agente etiológico

O vírus da bronquite infecciosa das galinhas (VBIG) pertence à ordem *Nidovirales*, família *Coronaviridae*, representada por atualmente quatro subfamílias: *Alphacoronavirus* e *Betacoronavirus*, que podem infectar mamíferos de todas as espécies, incluindo o ser humano; *Gammacoronavirus* onde se inclui o VBIG e *Deltacoronavirus*, subfamília que inclui possível infecção em espécies de mamíferos e aves (WOO et al., 2012; ICTV, 2015).

Coronaviruses são encontradas em diversas espécies de animais, e possuem predileção por infecções em trato respiratório e entérico, contudo há descrições de serem também causadores de doenças neurológicas e hepáticas (LAI; CAVANAGH, 1997; WOO et al., 2012), algumas cepas de VBIG, também podem afetar o trato genito-

urinário e reprodutor (COOK et al., 2001; RESENDE, 2003; PERLMAN; NETLAND, 2009). Esta família de vírus é representada por grandes vírus envelopados, de cadeia simples, RNA sentido positivo com nucleocapsídeo helicoidal e grandes genomas, que variam entre 26 e 31 kb (SAWICKI et al., 2007; SAWICKI, 2009). Nas extremidades opostas 5' e 3' estão presentes metil-guanina e uma cauda poli A, respectivamente. Esta formação viral permite que seja um genoma com função de RNA mensageiro (RNAm), que quando realizada sua purificação, torna-se infeccioso (AMMAYAPPAN et al., 2008).

O VBIg se apresenta como uma molécula com tamanho de aproximadamente 27,6 kb, com uma estrutura inicialmente esférica, também podendo ser possível observar pleomorfismo. Tem o diâmetro de aproximadamente 120 nm, e suas glicoproteínas S projetadas possuem até 20 nm (CAVANAGH, 2007). Possui um genoma com gene de múltiplos domínios de replicação com uma ou mais janelas abertas de leitura (ORFs – “open reading frames”: 1a e 1b), que representam a codificação de proteínas não estruturais importante para transcrição e replicação do vírus, presentes próximos a extremidade 5' e ocupando dois terços do tamanho total do genoma (Figura 1) (BOURSNELL et al., 1987; ZIEBUHR, 2005; DE GROOT et al., 2012; NEUMAN et al., 2014). Quando infectadas, as células do hospedeiro realizam a tradução das ORF's do VBIg por meio de suas polimerases, transformando-as em poliproteínas que são iniciadoras de proteínas do complexo transcrição-replicação, o que inclui a RNA polimerase dependente de RNA viral (MO et al., 2012).

Também são codificadas proteínas estruturais e acessórios, de direção 5'-3': proteína de espícula (S), que possui receptores de ligação de membrana, subdivido em subunidade S1 que encontra-se sobreposta a subunidade S2; proteínas acessórios 3a e 3b com função ainda desconhecida; proteína de envelope (E), que é essencial para estruturação do vírus e sua entrada; a proteína de membrana (M), que participa tanto da estruturação externa e do núcleo do vírus; com proteínas acessórios 5a e 5b; e a nucleoproteína (N) que envolve o RNA viral (Figura 2) (BRIAN; BARIC, 2005; MASTERS, 2006; CAVANAGH, 2007; MASTERS; PERLMAN, 2013).

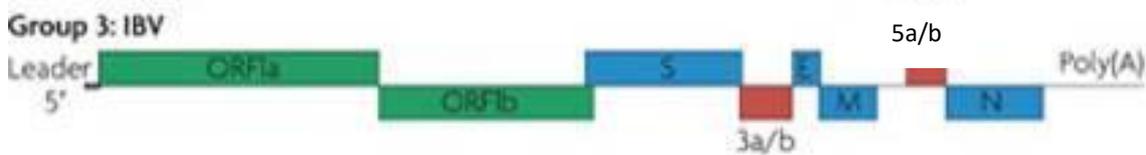


Figura 1: Estrutura do genoma do VBIg. Em verde representação do ORF 1(a e b), seguidos respectivamente das proteínas estruturais e acessórios (proteína S, E, M e N) em azul e (3 a/b e 5 a/b). Fonte: Perlman e Netland (2009) com adaptações.

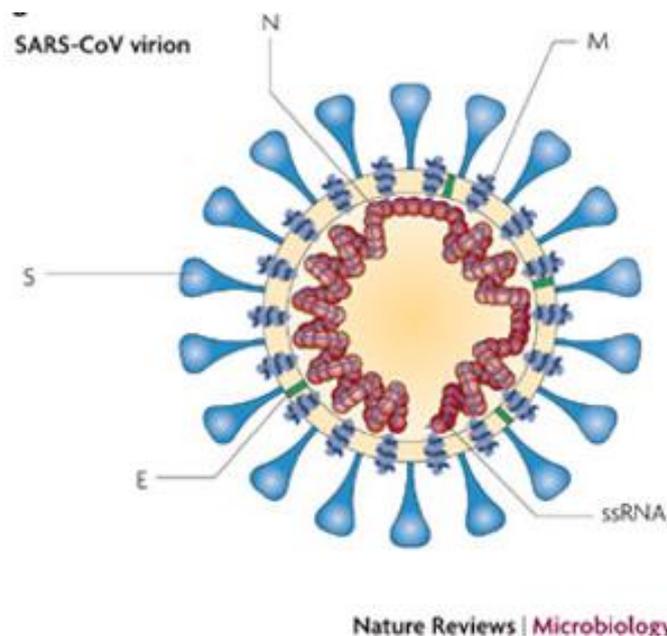


Figura 2: Desenho esquemático da composição proteica do coronavírus, incluindo o VBIG. Fonte: Perlman e Netland (2009) com adaptações.

2.4 Proteína de Espícula (S)

A glicoproteína S, com sua estrutura variável entre dimérica e trimérica, caracteriza-se por uma extremidade globular (S1) e uma haste carboxi-terminal (S2) que ancora-se sobre o envelope viral. Sendo o VBIG formado por 500 a 600 pares de base (CAVANAGH, 2007).

A subunidade S1 é a responsável pelo ataque viral a célula do hospedeiro (CAVANAGH, 1983; 1984; KOCK, 1990), pois esta, é a primeira a ser reconhecida pelo sistema imunológico do hospedeiro acionando anticorpos neutralizantes, também é responsável pela especificidade de espécie e determinação do tecido o qual a cepa de VBIG terá tropismo (CASAIS et al., 2003; FANG et al., 2005). Enquanto a porção S2 auxilia na fusão de membrana (CAVANAGH, 2005).

Quanto a patogenicidade viral do VBIG, não há estudos que comprovem que a proteína S tenha envolvimento como em outros coronavírus (NAVAS et al., 2001), porém, a patogenicidade é poligênica, podendo ser relacionada a fatores externos ao gene S1, como por exemplo as proteínas não estruturais que são responsáveis por cerca de dois terços do genoma (NSP – “nonstructural proteins”). Alguns trabalhos já estabelecem uma ligação entre a virulência do VBIG e as proteínas codificadas na região do gene NSP 2 -16, que são genes de replicação (AMMAYAPPAN et al., 2009; ARMESTO et al., 2009; PHILLIPS et al., 2012). Quando comparadas as sequências do genoma completo do VBIG de cepas atenuadas e virulentas, as alterações mais sobressalentes são na região dos NSP’s, principalmente NSP 3, demonstrando a importância quanto virulência (AMMAYAPPAN et al., 2009; PHILLIPS et al., 2011).

Em relação à evolução do VBIG e a variabilidade atualmente encontrada, o gene S1 tem maior relevância, pois é o responsável pela adaptação do vírus a programas vacinais (KUSTERS et al., 1987; 1989). E foi neste gene que este projeto teve maior

foco. Esta complexidade relacionada ao mecanismo de evolução responsáveis por contínuas emergências de novas cepas são ainda desconhecidas, porém alguns fatores Cavanagh (2007) cita como sendo importantes nesta relação: densidade alta de galinhas/frangos (por ano são mais de 40 bilhões de espécimes, pelo mundo) e o convívio estreito entre os animais na produção, que facilitam a transmissão viral entre os animais; também é necessário citar a co-existência de cepas distintas em um mesmo rebanho (CAPUA et al., 1999; CAVANAGH et al., 1999).

2.5 Patogênese do vBIG

O VBIG ao infectar uma ave, inicialmente penetra na célula por viropexia, sendo assim, ocorre a translocação de toda a estrutura viral através da membrana citoplasmática (PATTERSON; BINGHAM, 1976). A partir do momento em que o vírus se encontra dentro do organismo, inicia-se a replicação viral no sistema respiratório superior das galinhas, causando degeneração ciliar e acúmulo de muco (DHINAKAR RAJ, JONES; 1997).

Pode-se classificar a ocorrência das lesões em três estágios: (1) degenerativa, que é a manifestação da infecção dois dias após introdução viral, podendo causar perda de cílios, descamação do epitélio e células caliciformes, infiltração de heterófilos e linfócitos; (2) hiperplásica, em que é possível observar formação de novas células epiteliais, com possível observação de formas mitóticas; (3) regenerativa, que ocorre após 10 a 20 dias pós-infecção, com reparação do tecido lesado (NAKAMURA et al., 1991). A degeneração ciliar no trato respiratório superior facilita a ocorrência de infecções bacterianas secundárias, podendo gerar um alto índice de mortalidade em plantéis infectados (CAVANAGH; GELB, 2008; DI FÁBIO; BUITRAGO, 2009). Mesmo sendo a perda ciliar bastante descrita em diversos trabalhos, esta lesão pode não ocorrer em cepas que possuam tropismo por outros sistemas fisiológicos (CAVANAGH; GELB, 2008).

Após instalação da infecção, é possível isolar o vírus do trato respiratório, a partir do terceiro dia, com maior concentração na traqueia (DE WIT, 2000). Há decréscimo da titulação viral após a segunda semana, podendo até mesmo não ser possível o isolamento do vírus (DE WIT, 2000; MACLACHLAN; DUBOVI, 2011). A disseminação viral para outros tecidos ocorre posteriormente a infecção do trato respiratório, com replicação em túbulos contorcidos proximais e distais e túbulos coletores dos rins (CAVANAGH; GELB, 2008).

Em fêmeas, quando ocorre infecção pelo VBIG, pode ocorrer diminuição da altura das células do trato reprodutivo, com redução ou ausência de cílios, aumento glandular, focos linfocíticos e infiltração celular na lâmina própria. É possível a ocorrência de hipoplasia glandular em algumas áreas, reduzindo a síntese do albúmen. Quando menores de duas semanas de idades, as fêmeas acometidas pelo VBIG podem ter danos irreversíveis no trato reprodutivo, denominado como “síndrome das falsas poedeiras” (DHINAKAR RAJ; JONES, 1997). A infecção quando ocorre em fêmeas jovens, os anticorpos maternos auxiliam na prevenção dos danos ao oviduto, durante a infecção pelo VBIG. Nas aves poedeiras, a infecção pelo VBIG pode causar uma baixa produtividade de ovos com possível produção de ovos de péssima qualidade, tanto exteriormente quando interiormente. Também neste caso, cepas com tropismo às células do trato reprodutivo podem não causar sinais respiratórios nas aves acometidas (CAVANAGH; GELB, 2008).

O sistema digestivo também é um local de replicação viral do VBIG, podendo ocorrer a disseminação viral em esôfago, pró-ventrículo, duodeno, jejuno, tonsila cecal, reto e cloaca (CAVANAGH, 2007; DHINAKAR RAJ; JONES, 1997), sendo a replicação viral descrita principalmente em células da tonsila cecal (CAVANAGH, 2007; DHINAKAR RAJ; JONES, 1997). Mesmo sob condições de pH baixo e ação de enzimas digestivas, o VBIG pode se estabelecer (AMBALI, 1992).

2.6 Lesões Macro e Micro da BIG

A necropsia como uma forma de diagnóstico presuntivo, pode ser realizada em aves suspeitas de apresentarem a BIG. Os diversos sistemas acometidos: respiratório, genito-urinário, reprodutor e intestinal podem apresentar lesões que auxiliam no reconhecimento da patologia no animal *post mortem*. No sistema respiratório é possível encontrar congestão e edema em mucosa de traqueia e pulmão (PURCELL; MCFERRAN, 1972; BORROOMAND; ASASI; MOHAMMADI, 2012); em sistema genito-urinário as lesões variam caso ocorra cepas nefropatogênicas, sendo capaz de causar congestão em rins, com palidez, inchaço, apresentando rins manchados à necropsia, podendo evoluir para nefrite *ante mortem*; palidez de ureteres, que contenham depósitos de urato. E caso ocorra a infecção bacteriana concomitante de *E. coli*, por exemplo, pode haver um alto índice de mortalidade nos animais (BORROOMAND; ASASI; MOHAMMADI, 2012; CONG et al., 2013).

As fêmeas, quando têm seu sistema reprodutor acometido, o oviduto podem se apresentar à necropsia com aspecto disforme e hipoglandular (CHOUSALKAR; ROBERTS, 2007; CHOUSALKAR; ROBERTS; REECE, 2007); também há a possibilidade de ocorrer um derramamento de gema na cavidade abdominal das poedeiras, sendo bastante prejudicial quando há infecção bacteriana concomitante (WINTERFIELD; HITCHNER, 1962; DE WIT ET AL., 2011).

As descrições histopatológicas da traqueia incluem perda de cílios, edema, hiperplasia de células caliciformes, erosão de células epiteliais e infiltração linfocítica (TORO et al., 1996). Nos rins, é possível observar nefrite intersticial, degeneração tubular e infiltração de heterófilos; também pode-se encontrar necrose e dilatação dos túbulos, podendo aparecer cristais de urato por visualização em lâmina de microscopia (CAVANAGH; GELB, 2008).

2.7 Exames Diagnósticos

Diversos métodos diagnósticos são utilizados para detecção do VBIG a campo. O conhecimento do histórico do lote e a verificação de sinais compatíveis à doença são extremamente importantes para o diagnóstico de BIG a campo, sendo observados os sinais respiratórios como principal apresentação clínica da doença. A detecção viral para confirmação da doença é realizada por exames laboratoriais, como: inoculação em ovos embrionados, vírus-neutralização, ensaio imunoenzimático de absorção em fase sólida (ELISA), inibição da hemaglutinação e técnicas de biologia molecular, como reação em cadeia da polimerase (PCR) (LIMA, 2007).

O teste padrão ouro para detecção do agente é realizado com passagens virais em ovos embrionados de aves SPF (“Specific Pathogen Free”), porém é uma técnica que demanda tempo e é bastante trabalhosa (BRANDÃO et al., 2012). Logo, a técnica de

sorotipagem é um método bastante utilizado, devido o menor trabalho para elaboração de resultados, pois baseado em reações sorológicas, por meio de epítomos presentes na glicoproteína de espícula S1, é possível obter o sorotipo do agente presente no lote, caracterizando como homólogos, quando pertencentes ao mesmo sorotipo ou heterólogos quando apresentam divergência sorotípica (DI FÁBIO; BUITRAGO, 2009).

A reação de Transcrição Reversa (RT-PCR) é um método que vem sendo amplamente utilizado nos últimos anos para obtenção de diagnósticos rápidos, com a vantagem de ser possível realizar a genotipagem do agente. Este método age com foco em regiões conservadas do genoma viral, agindo sobre proteínas do nucleocapsídeo (MEIR et al., 2010) e 5' UTR (CALLISON et al., 2006). A região S1, que é altamente variável, também é utilizada para realização de tipificação genotípica, sendo a usualmente escolhida como melhor região para genotipagem das amostras de VBI (VILLARREAL, 2010).

É importante ressaltar que um mesmo sorotipo pode divergir no genótipo da cepa em questão, pois em reações sorológicas o alvo são os epítomos específicos da proteína S1, enquanto na genotipagem é possível analisar diferenças nas porções da proteína S1, podendo caracterizar como uma cepa variante (MONTASSIER, 2010; DE WIT et al., 2011).

Atualmente, metodologias moleculares estão sendo amplamente utilizadas na pesquisa de VBI por todo mundo (CAVANAGH et al., 2002 ; ABOLNIK, 2015; CHAMORRO, 2016; REDDY et al., 2016); por auxiliar em estudos epidemiológicos como ferramenta de pesquisa e diagnóstico (CHEN et al., 2015; FRAGA et al., 2013), demonstrando a magnitude da doença na região; auxiliando na vigilância e imunização, por detectar o sorotipo vigente (PEREIRA et al., 2016; VALASTRO et al., 2016), o que auxiliaria na escolha de um protectotipo eficiente. A obtenção do vírus a partir de passagens em ovos embrionados (GUY, 2008) é um método bastante utilizado, sendo eficiente para a amplificação do vírus in vivo, o que auxilia na detecção molecular, contudo, existem questões como recombinações que podem ocorrer durante estas passagens, que devem ser observadas com cuidado (BEAUDETTE, 1951; AMMAYAPPAN et al., 2009), para que o material genético extraído e estudado seja fiel a aquele que ocorre nas aves do local coletado. Visto isso, a obtenção de material genético diretamente de tecidos é um meio com maior fidelidade para diagnóstico, porém, certamente contendo algumas dificuldades enquanto técnica, pois há a questão da extração de pouco material genético, a perecibilidade do conteúdo e degradação do material (KULIWABA; FAZZALARI; FINDLAY, 2005).

2.8 Prevenção e Controle

A alta variabilidade viral da VBI é um dos maiores entraves, pois esta ampla existência de cepas distintas que ocorre de maneira imprevisível dificulta a implementação de um programa vacinal eficiente. E apesar da utilização massiva de vacinação para prevenção contra VBI, há um contínuo surgimento de cepas variantes, com genótipos, patótipos e sorotipos diferentes (CAVANAGH, 2005, 2007) o que torna esta doença um problema sanitário para a avicultura no Brasil e no mundo, em decorrência a toda a queda da produtividade dos animais acometidos.

O prejuízo causado por esta doença, mesmo após a vacinação, ocorre conforme a baixa produção de imunidade frente a cepa prevalente no plantel ou até mesmo a não existência de proteção cruzada entre a cepa vacinal e a campo (VILLARREAL et al., 2010; CHACÓN et al., 2011; FRAGA et al., 2013). São diversas as cepas vacinais encontradas hoje no mercado, com tipos diferentes de sorotipos, como Mass, Ark e D274 (LIMA, 2007). Sendo permitido a vacinação de lotes industriais apenas com a utilização de vacina licenciada pelo governo com cepa Mass viva atenuada (LIMA, 2007; MONTASSIER, 2010). Sendo utilizada por meio de aplicação por “spray” ou através da água até o 3º dia de vida dos pintinhos (LIMA, 2007). As vacinas utilizadas com vírus inativado são administradas individualmente em aves de postura que foram imunizadas anteriormente com vacinas vivas (DI FÁBIO; BUITRAGO, 2009).

Vacinas recombinantes, como Ma5, são meios de ampliação da gama antigênica, o que pode ser vantajoso quanto a desafios a campo que as aves possam ser submetidas, é interessante verificar que esta combinação de antígenos, auxilia na preparação do organismo das aves a um maior número de sorotipos que possam ocorrer, por amplificar os genótipos existentes no conteúdo da vacina (NIX et al., 2000), contudo é importante entender que também é possível que a partir desta variação antigênica, possa ocorrer a adaptação viral, promovendo o remanejamento de seu conteúdo genético, que pode gerar um novo tipo viral, aumentando a variabilidade do gene (JACKWOOD; SOMMER, 2002). Com a ocorrência de adaptação do agente, a proteção será diminuída e pode-se perder o perfil gênico daquele sorotipo, podendo afetar o sistema fisiológico das aves com o aparecimento da doença sem uma vacina eficiente.

Outras formas de prevenção são adotadas como medidas de biossegurança e manejo, a fim de tentar impedir a introdução de patógenos à produção avícola (DI FÁBIO; BUITRAGO, 2009). As medidas adotadas rigorosamente são: controle de trânsito, manejo de excremento, controle da matéria prima e genética da ave; intervalo entre lotes; controle dos pintos de um dia; controle da estrutura do local em que os animais permanecerão, mantendo temperatura e umidade adequada; oferecimento de água de qualidade; controle do estresse (INOUE; CASTRO, 2009).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Locais de coleta de amostras

As coletas das amostras utilizadas nesse estudo foram realizadas em duas mesorregiões do estado do Rio de Janeiro: Sul-Fluminense e Norte Fluminense (Figura 3), especificamente em granjas de grande porte de frangos de corte (acima de 100.000 aves) de Lídice e Passa Três (distritos do município de Rio Claro), Vargem Alegre (distrito do município de Barra do Piraí), e em uma granja de postura situada no município de Macaé.

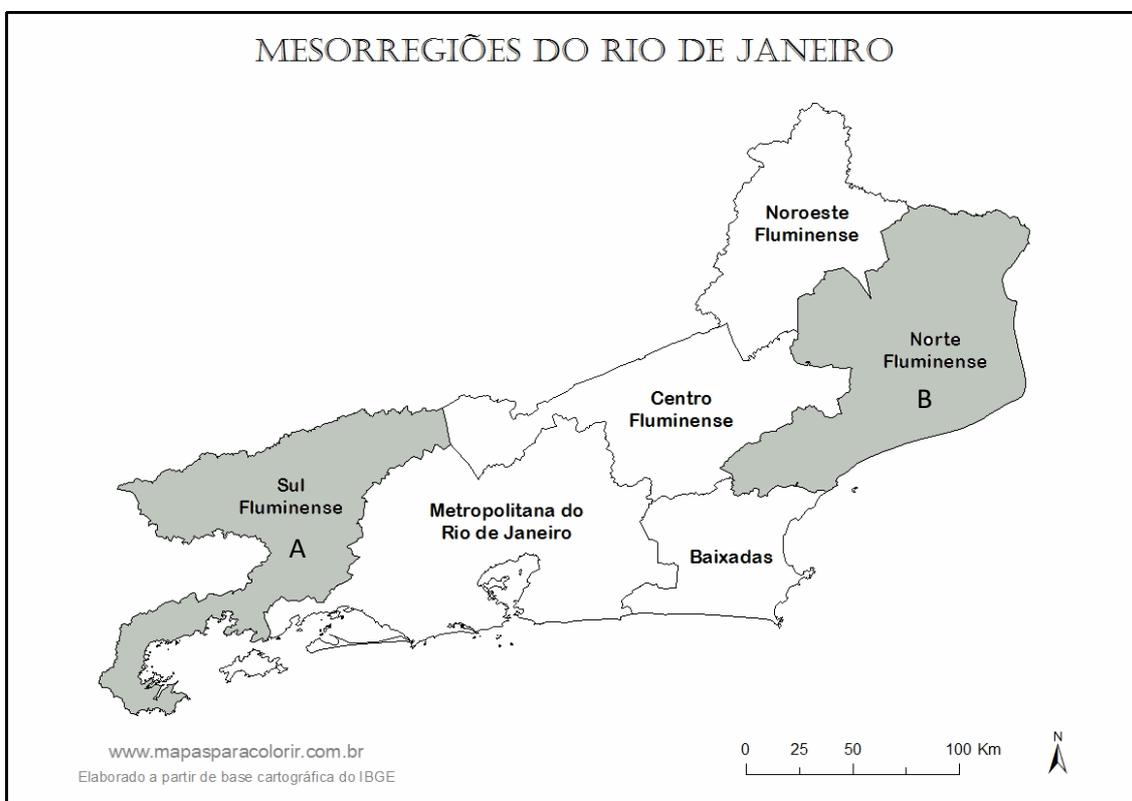


Figura 3: Localização geográfica das mesorregiões estudadas. A (Sul Fluminense) e B (Norte Fluminense), ambos coloridos em cinza. Fonte: <<http://www.mapasparacolorir.com.br/mapa-estado-rio-de-janeiro.php>>.

3.2 Questionário Epidemiológico

Foi proposto à realização de um questionário epidemiológico semi-estruturado ao responsável pela granja na forma de entrevista, que englobasse fatores predisponentes à ocorrência da BIG, tais como: doenças que pudessem acarretar em diminuição da imunidade das aves; erros ou falhas vacinais; determinação da mortalidade dos plantéis; densidade populacional do plantel. Também sendo observadas

questões estruturais como: circulação de ar; qualidade de camas, disponibilidade de ração, água e medicamentos. Todas essas informações adquiridas a partir de questões pré-estabelecidas foram tabuladas a fim de avaliar possíveis fatores associados à ocorrência de BIG nas granjas avaliadas.

3.3 Coleta das amostras e Amostragem

Os animais que foram utilizados para este projeto foram doados pelos proprietários das granjas participantes. A seleção dos animais a serem coletados foi através da observação de lotes que possuíam sintomatologia para BIG com sinais clínicos aparentes, como escore corporal abaixo do peso esperado para a idade; sinais de doenças respiratórias e reprodutivas. Foram selecionadas nas granjas de corte, aves entre 40-42 dias (idade pré-abate) e na granja de aves poedeiras, as aves apresentavam idade aproximada de 16 semanas.

As aves foram eutanasiadas individualmente, por meio da administração intravenosa de uma sobredosagem de anestésico da classe dos barbitúricos, seguindo as normas e diretrizes do CONCEA. Após a certificação da morte, as aves foram submetidas à necropsia e um fragmento dos seguintes órgãos foram coletados: traqueia, rim e tonsila cecal. Foram coletados amostras para análise molecular e uma outra porção dos mesmos órgãos foi preservada em formalina a 10% para análise histopatológica. Os tecidos para biologia molecular foram colocados separadamente em tubos de polipropileno de 2 mL contendo 1 mL de solução estabilizadora de ácidos nucleicos (RNA Later[®], Ambion) e identificados com o número do animal e órgão. As amostras armazenadas em formalina a 10% foram alocadas em recipientes formando “pools” dos órgãos de cada animal, sendo devidamente identificados.

Para determinação da amostragem, foram levados em consideração uma prevalência da doença de 5%, um nível de significância de 95% e uma precisão de 5%, tomando como base a população de aves do Estado do Rio de Janeiro. Os parâmetros estabelecidos anteriormente foram aplicados na fórmula descrita por Sampaio (2002).

$$n = p (1 - p) \cdot \alpha^2 \\ (d)^2$$

Sendo: n = número amostral; p = prevalência esperada; α^2 = fator determinante do grau de confiança; d = precisão.

$$n = 0,05 (1-0,05)/ 0,05^2 = 72 \text{ aves}$$

Desta forma, estabeleceu-se um total de 72 animais para serem coletados no Estado do Rio de Janeiro com a confiabilidade de 95% que a doença será detectada se presente. No entanto, foram coletadas em cada granja estudada um total de 25 aves com idade pré-abate de 40 dias, somando um total de 100 aves.

3.4 Vacinas vivas atenuadas do vBIG

Foram obtidas vacinas comerciais revendidas de laboratórios rotineiramente utilizados em granjas do Rio de Janeiro, e no Brasil. As cepas das vacinas foram H120 e

MA5, além da cepa BR1 gentilmente cedida pelo Professor Dr. Antonio José Piantino Ferreira, da faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia de São Paulo (USP). Os vírus vacinais foram utilizados como controle positivo para as reações moleculares de PCR convencional e qPCR.

3.5 Extração de RNA Total

3.5.1 Extração de RNA das cepas vacinais

Para realização da extração de RNA das cepas vacinais dos dois laboratórios foram pesadas 50 mg de cada vacina liofilizada em balança de precisão (as amostras não foram reconstituídas, foi utilizada o próprio líófilo). Após a mensuração do peso, foram colocadas separadamente em tubos de polipropileno de 1,5 mL devidamente identificados. A estes tubos contendo as vacinas foi adicionado 1 mL de reagente Trizol[®] (ThermoFisher) refrigerado a 4 °C, e posteriormente os tubos foram incubados por 7 minutos em recipiente contendo gelo. As amostras foram brevemente agitadas em vortex VM3000 - Vixar[®], após completa homogeneização do conteúdo, foi adicionado 200 µL de clorofórmio PA à mistura. Logo após, se procedeu a agitação vigorosa através de agitador vortex VM3000 - Vixar[®] por 15 segundos, seguida de incubação por 3 minutos em gelo. Os tubos com os conteúdos homogeneizados foram centrifugados em centrífuga Rotina 380R – Hettich Zentrifugen[®] (Alemanha) refrigerada a 12000 g por 15 minutos a 4 °C para separação da fase aquosa. Um volume de 400 µL da porção aquosa translúcida foi transferida para um novo tubo de polipropileno de 1,5 mL. Adicionados 500 µL de isopropanol puro, procedeu-se a homogeneização por inversão do tubo (nesta etapa observa-se a precipitação do material genético). Incubadas por 10 minutos em gelo, as amostras foram posteriormente centrifugadas em 12000 g por 10 minutos a 4°C. Após esta etapa, o sobrenadante foi cuidadosamente removido, de forma a preservar o “pellet” formado pelo acúmulo de material genético no fundo do tubo. Adicionou-se 950 µL de álcool etílico 75% gelado, e agitou-se em Agitador vortex para lavar o “pellet” do fundo do tubo. Novamente foi realizada a centrifugação deste homogeneizado a 7400 g por 5 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi cuidadosamente removido, evitando que o “pellet” fosse descartado. Após completa secagem, o material genético foi solubilizado em 100 µL de água tratada com Dietil Pirocarbonato (DEPC), livre de RNAses, DNAses e resíduos de proteínas .

A concentração e pureza de todas as amostras extraídas foram determinadas por espectrofotometria Nanodrop ND-2000[®] (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, DE, EUA), aliqüotadas em tubos 0,6 mL e acondicionados em freezer a -80 °C.

3.5.2 Extração de RNA total a partir do cartão FTA da cepa BR1

Um sexto (n=1/6) do cartão FTA com amostra da cepa BR1 foi picotado em colocado em tubo de polipropileno de 2 mL, adicionado 700 µL de Tampão Fosfato Salino (PBS) gelado em incubados em geladeira por 30 minutos. Em seguida os tubos foram submetidos a Agitação por 15 segundos. O material genético foi extraído através do RNeasy Mini kit (Qiagen) seguindo as instruções do fabricante.

As amostras extraídas foram quantificadas e analisadas quanto seu grau de pureza em espectrofotômetro Nanodrop ND-2000[®] (Thermo Fisher Scientific,

Wilmington, DE, EUA), aliquotadas na concentração $\pm 3,5$ ng/dL em tubos 0,6 mL e acondicionados em freezer a -80 °C.

3.5.3 Extração de RNA dos tecidos

Os tecidos coletados foram descongelados e pesados separadamente em balança de precisão. Os tecidos com o peso de 25 mg foram acondicionados em tubos de polipropileno de 1,5mL. Foi adicionado a cada tubo um volume de 500 μ L de água DEPC para lavagem, e retirada total da solução de RNA Lateral. Esta etapa foi executada duas vezes.

Após a etapa de lavagem, cada um destes tecidos foi colocado em gral autoclavado, onde foi adicionado nitrogênio líquido para auxiliar a maceração juntamente com o uso de pistilo também autoclavado. Após completa maceração do material, foi adicionado 1mL de reagente Trizol[®] gelado e transferido para um novo tubo de polipropileno de 1,5 mL, deixando incubar por 7 minutos em gelo. Posteriormente, os tubos foram agitados brevemente em Agitador vortex (VM3000 - Vixar[®]). Após completa homogeneização do conteúdo, foi adicionado 200 μ L de clorofórmio PA (Merck[®]) à mistura. Novamente, cada amostra foi homogeneizada vigorosamente em Agitador vortex (VM3000 - Vixar[®]) por 15 segundos e em seguida incubada por 3 minutos em gelo. Posteriormente, os tubos foram centrifugados em centrífuga refrigerada por 12000 g por 15 minutos a 4 °C para separação da fase aquosa. Um volume de 400 μ L da porção aquosa translúcida foi transferida para um novo tubo de polipropileno de 1,5 mL. Em cada tubo foi adicionado 500 μ L de álcool isopropanol e então procedeu-se a homogeneização por inversão (nesta etapa observa-se precipitação do material genético). Os tubos foram incubados por 10 minutos em gelo, e posteriormente centrifugados em 12000 g por 10 minutos a 4 °C. Após esta etapa, o sobrenadante foi cuidadosamente removido de forma a preservar o “pellet” formado pelo acúmulo de material genético no fundo do tubo. Adicionou-se 950 μ L de álcool etílico 75% gelado, agitado em Agitador vortex VM3000 - Vixar[®] para lavar o “pellet” do fundo do tubo. Novamente foi realizada a centrifugação a 7400 g por 5 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi removido cuidadosamente para não descartar o “pellet” formado. Após completa secagem, o material genético foi solubilizado em 100 μ L de água tratada por DEPC no volume.

Todas as amostras extraídas foram quantificadas e analisadas quanto ao seu grau de pureza em espectrofotômetro Nanodrop ND-2000[®] (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, DE, EUA), aliquotadas na concentração que variou de 100 à 500ng/dL em tubos 0,6 mL e acondicionados em freezer a -80 °C.

4 Detecção molecular do VBIG através da RT-PCR e RT-qPCR

4.1 Transcrição Reversa (Síntese de cDNA)

Dentre as amostras coletadas e extraídas, foram selecionadas 10 amostras de cada tecido de cada granja. As amostras de RNA total foram descongeladas. A reação de síntese de cDNA foi realizada através do Kit High Capacity cDNA Reverse Transcription (ThermoFisher Scientific), sem inibidor de RNase.

O RT Master Mix foi preparado em fluxo laminar, com volume final da reação de 20 µL. A reação foi preparada utilizando 2 µL do RT Buffer, 0,8 µL de dNTP mix (100mM), 2 µL RT Random Primers, 1 µL da enzima MultiScribe Reverse Transcriptase, 3,2 µL de água livre de nucleasse e 10 µL de RNA total na concentração de 100ng/µL.

Após o preparo do mix a reação de transcrição reversa foi realizada em termociclador (Eppendorf®) sob as seguintes condições: etapa 1) 25 °C por 10 minutos; etapa 2) 37 °C por 120 minutos; etapa 3) 85 °C por 5 minutos. Após o término das reações as amostras foram acondicionadas em freezer -20 °C.

5.1 Detecção molecular do vBIG por RT-qPCR

A RT-qPCR foi utilizada neste trabalho como uma reação de triagem, separando as amostras positivas das negativas para o vBIG. O protocolo utilizado para esta reação foi baseado na descrição de Callison et al. (2006).

Os oligonucleotídeos iniciadores utilizados foram: VBIG5'GU391 (5'-GCTTTTGAGCCTAGCGTT-3') e anti-sensu VBIG5'GL533 (5'-GCCATGTTGTCAGTCTATTG-3'). O mix para reação foi preparado no volume final de 20 µL, contendo: 4 µL de EvaGreen 1X (5x HOT FIREPol® EvaGreen® qPCR Mix Plus (no ROX)), 1 µL de ambos os oligonucleotídeos iniciadores na concentração de 10 mM, 12 µL de H₂O ultra-pura e 3µL de cDNA a 100ng/mL de cada amostra. As condições de termociclagem foram: desnaturação inicial a 95°C/10minutos, seguidos de 40 ciclos a 95°C/15 segundos e 60°C/60segundos. Ao término da reação foi adicionado uma curva de dissociação para avaliar a especificidade das reações em relação a amostra do controle positivo. Foram consideradas positivas amostras com C_q abaixo ou igual a 35 ciclos e com temperatura de dissociação igual a do controle positivo.

5.2 Detecção molecular do vBIG por RT-NestedPCR (RT-nPCR)

As amostras positivas na reação de Callison et al. (2006) foram submetidas a RT-nPCR utilizando os oligoiniciadores descritos por Kwon; Jackwood; Gelb, (1993) e Keeler et al. (1998). Ao final, os oligoiniciadores foram utilizados para amplificar aproximadamente 600 pares de base do gene S1 do vBIG. A primeira reação do RT-nPCR foi realizada em volume final de 25 µL, com um Mix: 12,5µL de 2x Master Mix Platinum Taq DNA Polimerase, 0,5µM dos oligonucleotídeos iniciadores sensu S1OLIGO3' (5'-CATAACTAACATAAGGGGCAA-3' e anti-sensu S1OLIGO5' (5'-TGAAAAGTGAACAAAAGACA-3') (KWON; JACKWOOD; GELB, 1993), 8,25µL de H₂O para PCR e 3 µL de cDNA a 100ng/mL. Estes oligonucleotídeos amplificam 1720 bases do gene S1. As condições de termociclagem da primeira reação foram: desnaturação inicial 94° C/ 5 minutos, seguidos de 35 ciclos a 94°C/30segundos, 50°C/45segundos e 72°C/2minutos. Um passo de extensão final a 72°C/5minutos foi adicionado ao final a reação de termociclagem.

Após concluída a primeira reação, 3 µL do produto da primeira reação foi utilizado como molde na segunda reação da RT-nPCR. A segunda reação foi realizada em volume final de 25 µL, contendo: 12,5µL de 2x Master Mix Platinum Taq DNA Polimerase, e 0,3 µM dos oligonucleotídeos iniciadores sendo sensu CK4 (5' TCAAAGCTTCANGGNGGNGCNTA 3') e anti-sensu CK2 (5'

CTCGAATCCCNGTRTTRTAYTGRCA 3') (KEELER et al., 1998). Sendo estes os oligonucleotídeos responsáveis pela amplificação de um fragmento de 600 pb do gene S1. As condições de termociclagem foram as seguintes: desnaturação inicial a 94°C/5 minutos, seguidos de 40 ciclos a 94°C/30 segundos, 50°C/30 segundos e 72°C/30 segundos. Um passo de extensão final a 72°C/5 minutos foi adicionado ao final a reação de termociclagem.

Ao final da reação, os produtos de amplificação foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1,5%. A eletroforese foi realizada durante 60 minutos a 75 volts (5 V/cm). Posteriormente, o gel foi corado com brometo de etídio (0,4 mg/mL) e visualizado sob luz ultravioleta no foto documentador sistema E-Gel® Imager Camera (Life Technology – ThermoFisher Scientific) para observação dos produtos amplificados desejados de aproximadamente 600 pb. Ambas as reações foram realizadas no termociclador Eppendorf.

5.3 Purificação dos produtos da RT-nPCR

As amostras que apresentaram bandas de forte intensidade no gel foram selecionadas e purificadas. As amostras que apresentaram banda dupla foram cortadas de um gel de 1% e purificadas logo em seguida, e as amostras com banda única foram purificadas diretamente do produto amplificado. A purificação foi realizada através do kit “Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega) seguindo os procedimentos descritos pelo fabricante.

5.4 Sequenciamento de um fragmento do gene S1 do vBIG

Os produtos de PCR foram sequenciados em ambas as direções utilizando os mesmos iniciadores utilizados na segunda reação do RT-nPCR. O sequenciamento foi realizado no Centro de Estudos do Genoma Humano da Universidade de São Paulo (USP) utilizando o equipamento ABI 3730 DNA Analyser – Applied Biosystems/Perkin Elmer, CA, USA).

5.5 Análise da variabilidade do gene S1 do vBIG

A qualidade dos eletroferogramas das amostras sequenciadas foi analisada no software CLC Main Workbench Version 7.2 (Qiagen: CLC bio). As sequências consenso “contigs” foram montadas no mesmo programa e a similaridade de cada sequência foi obtida através de uma busca inicial por meio da ferramenta BLAST disponível no endereço eletrônico <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>.

Para o estudo da variabilidade genética do gene S1 do vBIG entre as sequências obtidas neste estudo foi realizado o alinhamento local utilizando o algoritmo ClustalW disponível no software CLC Main Workbench Version 7.2 (Qiagen: CLC bio) tomando como referência a cepa vacinal Ma5 disponível no Genbank sob número de acesso KU736747 (PEREIRA et al., 2016) e para alinhar separadamente as cepas BR foi utilizado como referência a cepa BR disponível no Genbank sob número de acesso JX182775 (SANTOS et al., 2012). A partir do alinhamento de nucleotídeos das sequências foi possível determinar o percentual de identidade entre as sequências assim como os locais de polimorfismos. O percentual de identidade entre as sequências

obtidas na presente pesquisa também foi calculado a partir das sequências de aminoácidos, assim como a posição dos polimorfismos no gene S1 do vBIG.

A análise dos agrupamentos genotípicos do vBIG realizados neste estudo seguiu o método preconizado por Valastro et al. (2016) como uma tentativa de harmonizar a classificação do vírus da BIG. Um banco de dados do gene S1 foi montado a partir das 23 sequências obtidas neste estudo, 10 sequências descritas por Pereira et al. (2016), 14 sequências obtidas de isolados brasileiros do vBIG todas disponíveis no Genbank (Tabela 1) e um banco de dados que compreende 199 sequências contendo 6 sequências representativas de cada linhagem do vBIG identificadas por Valastro et al. (2016), além de 26 cepas identificadas como variantes únicas do vBIG. O banco de dados final totalizou 246 sequências. As 246 sequências foram alinhadas utilizando o algoritmo ClustalW obedecendo a configuração padrão do software Mega 7.0 (THOMPSON et al., 1994). As extremidades das sequências alinhadas foram cortadas de forma que todas as sequências apresentassem o mesmo tamanho no alinhamento final. Os agrupamentos genéticos foram formados através do método de Maximum Likelihood implementado no software MEGA 7.0. Para analisar a confiança dos agrupamentos formados foi utilizado o teste de Bootstrap com 1000 réplicas. O modelo de substituição de nucleotídeos utilizado foi Kimura-2-parâmetros. Todas as análises de agrupamento foram realizadas no software Mega 7.0.

Tabela 1. Informações epidemiológicas das sequências de amostras de vBIG coletadas e publicadas no GenBank utilizadas para a análise da variabilidade do gene S1 do vBIG.

Identificação	Ano de detecção	Amostra de tecido	Estado	Região	Grupo	Nº acesso GenBank
VBIG/Brazil/2009/ USP-	2009	-	PR	S	BR-I	GU383109
VBIG/BRAZIL/2011/SB-	2011	Tonsila cecal	RS	S	BR-I	JX559803
VBIG/BRAZ	2010	Tonsila	GO	C.O.	BR-I	JX559804
VBIG/BRAZ	2011	Tonsila	RS	S	BR-I	JX559802
VBIG/Brazil/	2009	-	MT	C.O.	BR-I	GU38310
VBIG/Brazil/	2007	-	PR	S	BR-I	GU38309
VBIG/BRAZ	2010	Tonsila	MT	C.O.	BR-II	JX559819
VBIG/BRAZ	2010	Tonsila	MT	C.O.	BR-II	JX559821
VBIG/BRAZ	2010	Tonsila	MT	C.O.	BR-II	JX559817
UFMG/290	1983	-	-	-	BR-I	JX182786

UFMG/351	1984	-	-	-	BR-I	JX182784
UFMG/208	1972	-	-	-	Mass	JX182788
UFMG/200	1981	-	-	-	Mass	JX182789
UFMG/29-	1978	-	-	-	Mass	JX182790
UFV_bursa_	2013	Bursa de	MG	SE	Mass	KU73675
UFV_intestin	2013	Intestino	MG	SE	Mass	KU73675
UFV_intestin	2014	Intestino	MG	SE	Mass	KU73675
UFV_kidney	2013	Rim	MG	SE	Mass	KU73675
UFV_kidney	2014	Rim	MG	SE	Mass	KU73675
UFV_embry	2014	Fluído	MG	SE	Mass	KU73675
UFV_lung/B	2013	Pulmão	MG	SE	Mass	KU73675
UFV_oviduc	2014	Oviduto	MG	SE	Mass	KU73676
UFV_trachea	2013	Traqueia	MG	SE	Mass	KU73676
UFV_cecal_t	2014	Tonsila	MG	SE	BR-I	KU73676
Amostra	2016	Tonsila	RJ	SE	Mass	-
Amostra	2016	Rim	RJ	SE	Mass	-
Amostra	2016	Traqueia	RJ	SE	Mass	-
Amostra	2016	Rim	RJ	SE	Mass	-
Amostra	2016	Tonsila	RJ	SE	BR-I	-
Amostra	2016	Traqueia	RJ	SE	BR-I	-
Amostra	2016	Rim	RJ	SE	BR-I	-
Amostra	2016	Tonsila	RJ	SE	BR-I	-
Amostra 55	2016	Traqueia	RJ	SE	BR-I	-
Amostra 55	2016	Rim	RJ	SE	BR-I	-
Amostra 57	2016	Rim	RJ	SE	BR-I	-
Amostra 57	2016	Traqueia	RJ	SE	BR-I	-
Amostra 58	2016	Traqueia	RJ	SE	BR-I	-
Amostra 58	2016	Rim	RJ	SE	BR-I	-
Amostra	2016	Traqueia	RJ	SE	BR-I	-

Amostra	2016	Rim	RJ	SE	BR-I	-
Amostra	2016	Tonsila	RJ	SE	BR-I	-
Amostra	2016	Tonsila	RJ	SE	Mass	-
Amostra	2016	Traqueia	RJ	SE	Mass	-
Amostra	2016	Traqueia	RJ	SE	Mass	-
Amostra	2016	Tonsila	RJ	SE	Mass	-
Amostra	2016	Tonsila	RJ	SE	Mass	-
Amostra	2016	Traqueia	RJ	SE	Mass	-

6 Análise das lesões em nível microscópico em Traqueia, Rim e Intestino de aves positivas na RT-nPCR para o vBIG

Foram confeccionadas no laboratório de Anatomia Patológica da UFRRJ lâminas de histopatologia para observação das lesões nos tecidos de traqueia, rim e tonsila cecal dos animais considerados positivos na RT-nPCR e qPCR. As amostras coletadas foram retiradas da formalina a 10%, clivadas, coladas em cassetes e preparados cubos de corte. As lâminas confeccionadas foram coradas em HE (hematoxilina e eosina) e observadas em microscópio com aumentos que variavam entre 4X, 6.3X, 16X, 25X e 40X, dependendo do foco e tecido analisado. Foram obtidas algumas imagens para auxiliar no diagnóstico e demonstrar as lesões mais predominantes, foram feitas duas imagens por granja, de algum dos órgãos coletados e analisados (traqueia, rim e tonsila cecal). As imagens foram obtidas utilizando o microscópio LEITZ WETZLAR (Germany) com câmera acoplada marca Sony DSC-F707 do laboratório de Anatomia Patológica da UFRRJ, com aumentos de 6.3X, 16X, 25X e 40X conforme o foco e imagem desejada. Todo o trabalho histopatológico foi por meio de auxílio e suporte da Prof^a Dra. Marilene de Farias Brito de Queiroz.

7 RESULTADOS

7.1 Questionário Epidemiológico

Não foi possível a realização da análise epidemiológica devido a dificuldades de diversas naturezas relacionadas à obtenção de dados sanitários das granjas estudadas neste trabalho. Porém alguns observados são possíveis de serem fatores predisponentes a BIG, como a reutilização de cama, alta densidade de animais, excesso de amônia, entre outras questões.

7.2 Detecção molecular do vBIG através da RT-qPCR

A técnica de RT-qPCR foi utilizada para realizar a detecção molecular do vBIG em um total de 50 aves. Em cada ave a presença do vBIG foi avaliado nos tecidos da traqueia, rim e intestino. Foi considerada positiva a ave na qual o vírus foi detectado em pelo menos um dos tecidos avaliados. Utilizando esse critério, um total de 90% (n=45/50) das aves foram positivas. A frequência de aves positivas em cada granja foi 76,92% (n=10/13) em Macaé, 94,12% em Vargem Alegre, 90% (n=9/10) em Lidice e 100% em Passa Três (n=10/10). Passaram pela triagem de positividade para vBIG 116 amostras de cDNA, de traqueia, rim e intestino de animais de quatro granjas de diferentes regiões. Do total de amostras testadas, 70,68% foram consideradas positivas (n=82/116) para vBIG (figura 4).

A frequência de amostras positivas independente do tecido testado encontradas em cada granja foi de aproximadamente: 86,6% (n=26/30) em Vargem Alegre, 68,4% (n=13/19) em Lidice, 90,3% (n=27/30) em Passa Três e 43,2% (n=15/37) em Macaé.

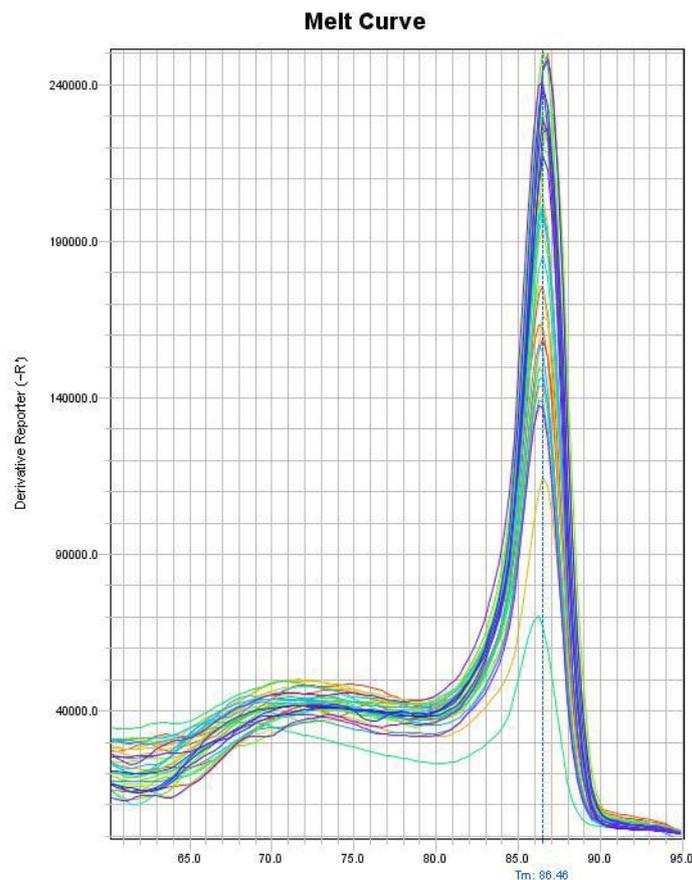


Figura 4: Curva de dissociação de um fragmento de 147 pares de base da região 5' UTR do genoma do vírus da Bronquite Infecciosa das Galinhas amplificado através da reação de RT-qPCR utilizando 116 amostras de cDNA de tecidos de aves naturalmente infectadas por vBIG em granjas do estado do Rio de Janeiro (Callison et al., 2006). Controle positivo em azul.

7.3 Detecção molecular do vBIG por RT-nPCR

Das amostras positivas na RT-qPCR foram selecionados aleatoriamente cinco animais de Vargem Alegre, cinco animais de Lidice e de Macaé e quatro animais de Passa Três. Os tecidos da traqueia, rim e intestino de cada ave foram testados pela RT-nPCR com alvo em aproximadamente 600pb do gene S1 do vBIG. Todas as 57 amostras que passaram pela reação de RT-nPCR foram positivas (Figura 5). porém, apenas 23 foram sequenciadas. Na granja de Lidice foram sequenciadas três amostra de traqueia e três de rim. Na granja de Vargem Alegre foram sequenciadas quatro amostras de traqueia, uma amostra de rim e quatro de intestino. Em Passa Três foram sequenciadas uma amostra da traqueia, uma do rim e duas do Intestino. Em uma granja de postura de Macaé foram sequenciadas uma amostra do intestino, duas amostras do rim e uma amostra da traqueia.

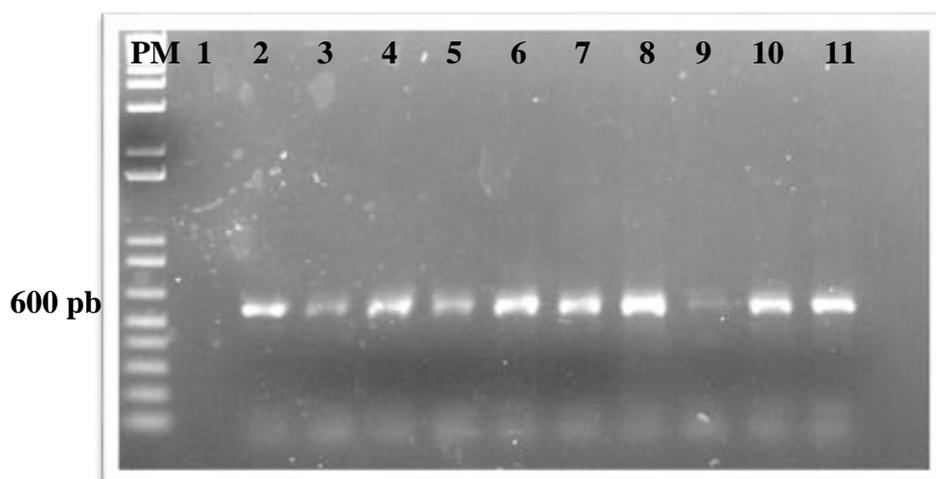


Figura 5: Eletroforese em gel de agarose 2% corado com brometo de etídeo mostrando a amplificação de 600 pares de base através da RT-nPCR do gene S1 do vírus da Bronquite Infecciosa das Galinhas. PM = Peso molecular de 1kb plus (Invitrogen), linha 1 = Controle negativo de amplificação; linha 2 = Controle Positivo (cepa vacinal Ma5) e linhas 3 a 11 = amostras positivas para o vBIG da granja de frango de corte no município de Lidice, RJ.

7.4 Análise da sequência parcial de nucleotídeos do gene S1 do vBIG

A análise filogenética realizada a partir das sequências obtidas no presente estudo com 222 sequências do gene S1 do vBIG de diferentes países demonstrou que todas as 23 sequências pertencem ao genótipo 1, para elucidar melhor, segue um resumo do que foi obtido: foi realizado um banco de dados contendo 23 sequências próprias deste estudo, adicionadas de 10 descritas por Pereira et al., (2016) e 14 isolados brasileiros que estavam presentes no GenBank, para finalizar, foram adicionados ao banco de dados mais 199 sequências, sendo seis sequências representativas de cada linhagem descrita por Valastro et al., (2016).

Dentro do genótipo 1, um total de 10 sequências se agruparam na linhagem 1 (GI-1) onde estão agrupadas as linhagens do vBIG pertencentes ao sorotipo Massachusetts e as demais amostras (13 amostras) agruparam-se com as sequências pertencentes a linhagem 11 (GI-11) juntamente com as sequências classificadas como variantes brasileiras do sorotipo BR (Figura 6). Dessa forma, com base na análise filogenética realizada classificamos as amostras do presente estudo como variantes virais do sorotipo Massachusetts (Mass) e BR. O percentual de identidade das sequências de nucleotídeos obtidas neste estudo a partir de amostras de tecidos da traqueia, rim e intestino de galinhas positivas pela técnica de RT-nPCR para o vBIG foram primeiramente comparadas a sequência da vacina Ma5 (KU736747) do sorotipo Massachusetts, estabelecendo-a como cepa de referência (Figura 7 e 8). O percentual de identidade variou de 72,41 a 100% entres as 23 sequências obtidas no presente estudo utilizando a cepa vacinal Ma5 como referência no alinhamento. Como pode ser observado nas figuras 7, 8, 9 e 10 um maior grau de polimorfismo foi verificado entre as cepas pertencentes ao sorotipo BR. O percentual de identidade verificado entre as amostras classificadas no sorotipo BR variou de 90,64 a 100%. No entanto, em relação à sequência UFMG (JX182775) utilizada como referência no alinhamento o percentual

de identidade variou de 87,68 a 88,83% com as amostras obtidas neste estudo (Figura 10). Porém, quando a cepa USP (DQ448274) serviu de referência no alinhamento o percentual de identidade foi consideravelmente superior variando de 91,68 a 100% (Figura 11). Das 13 amostras classificadas dentro do sorotipo BR, três pertenciam a granja de Vargem Alegre, seis a granja de Lidice e quatro granja de Passa Três. Das três amostras detectadas na granja de Vargem Alegre, todas pertenciam a mesma ave, sendo uma sequência obtida de cada tecido. Na granja de Lidice, três amostras foram obtidas do tecido traqueal e três do intestinal. Na granja de Passa Três, uma amostra foi obtida da traqueia, uma do rim e duas do intestino. O percentual de identidade das amostras pertencentes ao sorotipo BR entre as granjas de Vargem Alegre, Lidice e Passa Três variou de 90,80 a 100%

Entre as amostras classificados dentro do sorotipo Mass o percentual de identidade variou de 96,43 a 100%, em relação a cepa de referência (Figura 9). Esses valores demonstram uma maior estabilidade genética dentro do sorotipo Massachusetts quando comparado com o sorotipo BR.

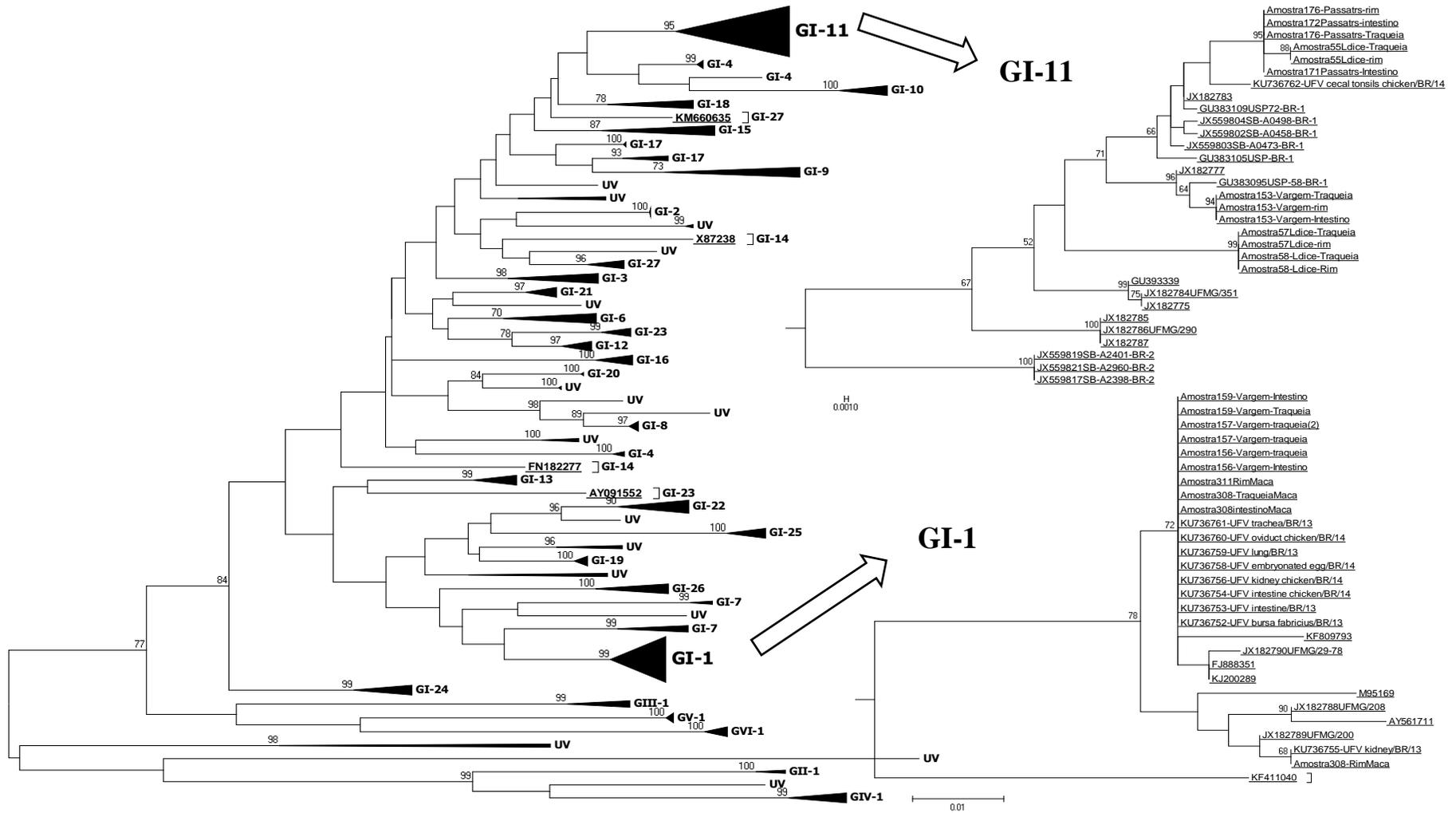
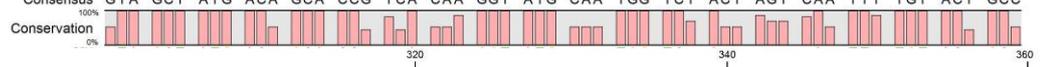


Figura 6. Agrupamento filogenético baseado em 600 nucleotídeos do gene S1 do vBIG detectados por RT-nPCR em tecidos de aves naturalmente infectadas em granjas do estado do Rio de Janeiro. O conjunto de dados total foram de 245 sequências disponíveis no GenBank. Em G1 – 11, estão agrupados as sequências classificadas como variantes Brasileiras (BR) e no G1-1, as amostras classificadas como variantes da cepa Massachusetts.

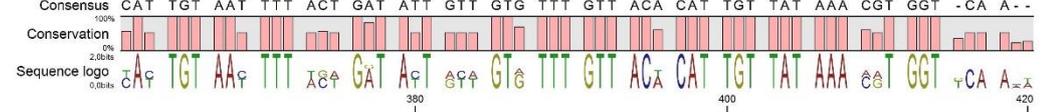
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
KU736747.1 (cepa Ma5 vacinal)	1		19	0	1	1	2	2	2	2	0	2	166	166	166	159	159	160	158	160	160	148	148	148	148
Amostra308-Macacô-Rim	2	96,77		19	20	20	21	21	21	21	19	21	160	160	160	154	154	155	153	155	155	141	141	141	141
Amostra311-Macacô-Rim	3	100,00	96,77		1	1	2	2	2	2	0	2	166	166	166	159	159	160	158	160	160	148	148	148	148
Amostra308-Macacô-Intestino	4	99,83	96,60	99,83		0	1	1	1	1	1	1	167	167	167	158	158	159	157	159	159	148	148	148	148
Amostra308-Macacô-Traqueia	5	99,83	96,60	99,83	100,00		1	1	1	1	1	1	167	167	167	158	158	159	157	159	159	148	148	148	148
Amostra159-Vargem-Intestino	6	99,66	96,43	99,66	99,83	99,83		0	0	0	2	0	168	168	168	159	159	158	158	160	160	149	149	149	149
Amostra159-Vargem-Traqueia	7	99,66	96,43	99,66	99,83	99,83	100,00		0	0	2	0	168	168	168	159	159	158	158	160	160	149	149	149	149
Amostra156-Vargem-Traqueia	8	99,66	96,43	99,66	99,83	99,83	100,00	100,00		0	2	0	168	168	168	159	159	158	158	160	160	149	149	149	149
Amostra157-Vargem-Traqueia	9	99,66	96,43	99,66	99,83	99,83	100,00	100,00	100,00		2	0	168	168	168	159	159	158	158	160	160	149	149	149	149
Amostra157-Vargem-Intestino	10	100,00	96,77	100,00	99,83	99,83	99,66	99,66	99,66	99,66		2	166	166	166	159	159	160	158	160	160	148	148	148	148
Amostra156-Vargem-Intestino	11	99,66	96,43	99,66	99,83	99,83	100,00	100,00	100,00	100,00	99,66		168	168	168	159	159	158	158	160	160	149	149	149	149
Amostra153-Vargem-Traqueia	12	72,74	73,73	72,74	72,58	72,58	72,41	72,41	72,41	72,41	72,74	72,41		0	0	29	29	30	28	31	31	52	52	52	52
Amostra153-Vargem-Intestino	13	72,74	73,73	72,74	72,58	72,58	72,41	72,41	72,41	72,41	72,74	72,41	100,00		0	29	29	30	28	31	31	52	52	52	52
Amostra153-Vargem-Rim	14	72,74	73,73	72,74	72,58	72,58	72,41	72,41	72,41	72,41	72,74	72,41	100,00	100,00		29	29	30	28	31	31	52	52	52	52
Amostra176-Passatê-Rim	15	73,89	74,71	73,89	74,06	74,06	73,89	73,89	73,89	73,89	73,89	73,89	95,24	95,24	95,24		0	1	1	4	4	55	55	55	55
Amostra172-Passatê-Intestino	16	73,89	74,71	73,89	74,06	74,06	73,89	73,89	73,89	73,89	73,89	73,89	95,24	95,24	95,24	100,00		1	1	4	4	55	55	55	55
Amostra171-Passatê-Intestino	17	73,73	74,55	73,73	73,89	73,89	74,06	74,06	74,06	74,06	73,73	74,06	95,07	95,07	95,07	99,84	99,84		2	3	3	56	56	56	56
Amostra176-Passatê-Traqueia	18	74,06	74,88	74,06	74,22	74,22	74,06	74,06	74,06	74,06	74,06	74,06	95,40	95,40	95,40	99,84	99,84	99,87		5	5	54	54	54	54
Amostra55-Lidice-Rim	19	73,73	74,55	73,73	73,89	73,89	73,73	73,73	73,73	73,73	73,73	73,73	94,91	94,91	94,91	99,34	99,34	99,18	99,18		0	57	57	57	57
Amostra55-Lidice-Traqueia	20	73,73	74,55	73,73	73,89	73,89	73,73	73,73	73,73	73,73	73,73	73,73	94,91	94,91	94,91	99,34	99,34	99,18	99,18	100,00		57	57	57	57
Amostra57-Lidice-Rim	21	75,70	76,85	75,70	75,70	75,70	75,53	75,53	75,53	75,53	75,70	75,53	91,46	91,46	91,46	90,97	90,97	90,80	91,13	90,64	90,64		0	0	0
Amostra57-Lidice-Traqueia	22	75,70	76,85	75,70	75,70	75,70	75,53	75,53	75,53	75,53	75,70	75,53	91,46	91,46	91,46	90,97	90,97	90,80	91,13	90,64	90,64	100,00		0	0
Amostra58-Lidice-Rim	23	75,70	76,85	75,70	75,70	75,70	75,53	75,53	75,53	75,53	75,70	75,53	91,46	91,46	91,46	90,97	90,97	90,80	91,13	90,64	90,64	100,00	100,00		0
Amostra58-Lidice-Traqueia	24	75,70	76,85	75,70	75,70	75,70	75,53	75,53	75,53	75,53	75,70	75,53	91,46	91,46	91,46	90,97	90,97	90,80	91,13	90,64	90,64	100,00	100,00	100,00	

Figura 7. Comparação par-a-par do Percentual de Identidade (diagonal inferior) e diferença (diagonal superior) de um fragmento de aproximadamente 600 pares de base do gene S1 do vírus da Bronquite infecciosa das Galinhas (vBIG) obtidas de amostras de tecido da traquéia, rim e intestino de aves positivas para o vBIG pela RT-nPCR em granjas de frangos de corte e galinha de postura do estado do Rio de Janeiro. A cepa vacinal Ma5 do sorotipo Massachusetts foi utilizada como sequência de referência.

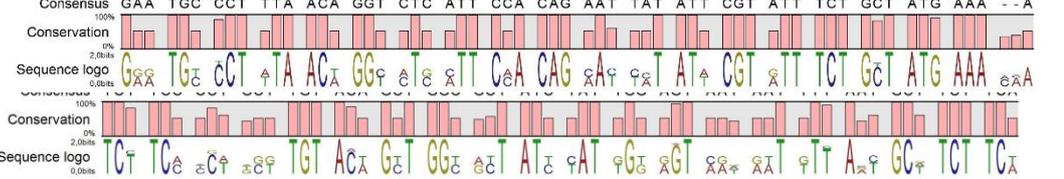
KU736747.1 (cepa Ma5 vacina)	ATA	GCT	ATG	ACG	GCA	CCG	TCA	TCA	GGT	ATG	GCT	TGG	TCT	AGC	AGT	CAG	TTT	TGT	ACT	GCA	300		
Amostra308-Macaé-Rim	177	
Amostra311-Macaé-Rim	177	
Amostra308-Macaé-Intestino	177	
Amostra308-Macaé-Traqueia	177	
Amostra159-Vargem-Intestino	177	
Amostra159-Vargem-Traqueia	177	
Amostra156-Vargem-Traqueia	177	
Amostra157-Vargem-Traqueia	177	
Amostra157-Vargem-Intestino	177	
Amostra156-Vargem-Intestino	177	
Amostra153-Vargem-Traqueia	G	.	.	A	.	T	T	CAG	.	CAA	.	.	C	CT	TCA	.	A	.	C	.	A	C	177
Amostra153-Vargem-Intestino	G	.	.	A	.	T	T	CAG	.	CAA	.	.	C	CT	TCA	.	A	.	C	.	A	C	177
Amostra153-Vargem-Rim	G	.	.	A	.	T	T	CAG	.	CAA	.	.	C	CT	TCA	.	A	.	C	.	A	C	177
Amostra176-Passatrés-Rim	G	.	.	A	.	C	T	CA	.	CAA	.	.	CT	.	A	.	A	.	C	.	A	C	177
Amostra172-Passatrés-Intestino	G	.	.	A	.	C	T	CA	.	CAA	.	.	CT	.	A	.	A	.	C	.	A	C	177
Amostra171-Passatrés-Intestino	G	.	.	A	.	C	T	CA	.	CAA	.	.	CT	.	A	.	A	.	C	.	A	C	177
Amostra176-Passatrés-Traqueia	G	.	.	A	.	C	T	CA	.	CAA	.	.	CT	.	A	.	A	.	C	.	A	C	177
Amostra55-Lidice-Rim	G	.	.	A	.	C	T	CA	.	CAA	.	.	CT	.	A	.	A	.	C	.	A	C	177
Amostra55-Lidice-Traqueia	G	.	.	A	.	C	T	CA	.	CAA	.	.	CT	.	A	.	A	.	C	.	A	C	177
Amostra57-Lidice-Rim	G	.	.	A	.	T	CA	CA	.	CAA	.	.	A	CT	CA	G	A	.	.	.	G	C	177
Amostra57-Lidice-Traqueia	G	.	.	A	.	T	CA	CA	.	CAA	.	.	A	CT	CA	G	A	.	.	.	G	C	177
Amostra56-Lidice-Rim	G	.	.	A	.	T	CA	CA	.	CAA	.	.	A	CT	CA	G	A	.	.	.	G	C	177
Amostra58-Lidice-Traqueia	G	.	.	A	.	T	CA	CA	.	CAA	.	.	A	CT	CA	G	A	.	.	.	G	C	177



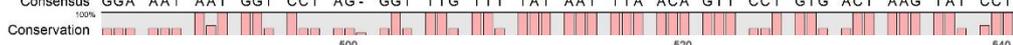
KU736747.1 (cepa Ma5 vacina)	TAC	TGT	AAC	TTT	TCA	GAT	ACT	ACA	GTG	TTT	GTT	ACA	CAT	TGT	TAT	AAA	CAT	GGT	---	---	---	354
Amostra308-Macaé-Rim	C	231
Amostra311-Macaé-Rim	231
Amostra308-Macaé-Intestino	231
Amostra308-Macaé-Traqueia	231
Amostra159-Vargem-Intestino	231
Amostra159-Vargem-Traqueia	231
Amostra156-Vargem-Traqueia	231
Amostra157-Vargem-Traqueia	231
Amostra157-Vargem-Intestino	231
Amostra156-Vargem-Intestino	231
Amostra153-Vargem-Traqueia	C	T	.	.	T	.	A	T	.	T	GTT	.	A	.	.	.	AG	.	.	TCA	ACA	237
Amostra153-Vargem-Intestino	C	T	.	.	T	.	A	T	.	T	GTT	.	A	.	.	.	AG	.	.	TCA	ACA	237
Amostra153-Vargem-Rim	C	T	.	.	T	.	A	T	.	T	GTT	.	A	.	.	.	AG	.	.	TCA	ACA	237
Amostra176-Passatrés-Rim	C	T	.	.	T	.	AGT	.	T	GTT	.	T	AG	.	.	TCA	AAT	237
Amostra172-Passatrés-Intestino	C	T	.	.	T	.	AGT	.	T	GTT	.	T	AG	.	.	TCA	AAT	237
Amostra171-Passatrés-Intestino	C	T	.	.	T	.	AGT	.	T	GTT	.	T	AG	.	.	TCA	AAT	237
Amostra176-Passatrés-Traqueia	C	T	.	.	T	.	AGT	.	T	GTT	.	T	AG	.	.	TCA	AAT	237
Amostra55-Lidice-Rim	C	T	.	.	T	.	AGT	.	T	GTT	.	T	AG	.	.	TCA	AAT	237
Amostra55-Lidice-Traqueia	C	T	.	.	T	.	AGT	.	T	GTT	.	T	AG	.	.	TCA	AAT	237
Amostra57-Lidice-Rim	C	T	.	.	T	.	AGT	G	.	T	GTT	.	A	.	.	.	G	.	.	GCA	ATA	237
Amostra57-Lidice-Traqueia	C	T	.	.	T	.	AGT	G	.	T	GTT	.	A	.	.	.	G	.	.	GCA	ATA	237
Amostra58-Lidice-Rim	C	T	.	.	T	.	AGT	G	.	T	GTT	.	A	.	.	.	G	.	.	GCA	ATA	237
Amostra58-Lidice-Traqueia	C	T	.	.	T	.	AGT	G	.	T	GTT	.	A	.	.	.	G	.	.	GCA	ATA	237



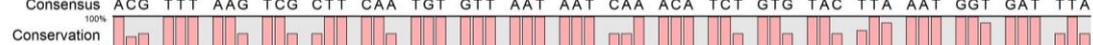
KU736747.1 (cepa Ma5 vacina)	GGG	TGT	CCT	ATA	ACT	GGC	ATG	CTT	CAA	CAG	CAT	TCT	ATA	CGT	GTT	TCT	GCT	ATG	AAA	---	---	411	
Amostra308-Macaé-Rim	288	
Amostra311-Macaé-Rim	288	
Amostra308-Macaé-Intestino	288	
Amostra308-Macaé-Traqueia	288	
Amostra159-Vargem-Intestino	288	
Amostra159-Vargem-Traqueia	288	
Amostra156-Vargem-Traqueia	288	
Amostra157-Vargem-Traqueia	288	
Amostra157-Vargem-Intestino	288	
Amostra156-Vargem-Intestino	288	
Amostra153-Vargem-Traqueia	.AA	.	C	T	.	T	.	A	.	T	C	C	A	.	C	.	A	C	CA	.	T	.	297
Amostra153-Vargem-Intestino	.AA	.	C	T	.	T	.	A	.	T	C	C	A	.	C	.	A	C	CA	.	T	.	297
Amostra153-Vargem-Rim	.AA	.	C	T	.	T	.	A	.	T	C	C	A	.	C	.	A	C	CA	.	T	.	297
Amostra176-Passatrés-Rim	.AA	.	C	.	T	.	A	.	T	C	C	A	.	C	.	A	C	CA	.	T	.	R	297
Amostra172-Passatrés-Intestino	.AA	.	C	.	T	.	A	.	T	C	C	A	.	C	.	A	C	CA	.	T	.	R	297
Amostra171-Passatrés-Intestino	.AA	.	C	.	T	.	A	.	T	C	C	A	.	C	.	A	C	CA	.	T	.	R	297
Amostra176-Passatrés-Traqueia	.AA	.	C	.	T	.	A	.	T	C	C	A	.	C	.	A	C	CA	.	T	.	R	297
Amostra55-Lidice-Rim	.AA	.	C	.	T	.	A	.	T	C	C	A	.	C	.	A	C	CA	.	T	.	R	297
Amostra55-Lidice-Traqueia	.AA	.	C	.	T	.	A	.	T	C	C	A	.	C	.	A	C	CA	.	T	.	R	297
Amostra57-Lidice-Rim	.AA	.	C	.	T	.	A	.	T	C	C	A	.	C	.	A	CA	.	T	.	.	T	297
Amostra57-Lidice-Traqueia	.AA	.	C	.	T	.	A	.	T	C	C	A	.	C	.	A	CA	.	T	.	.	T	297
Amostra58-Lidice-Rim	.AA	.	C	.	T	.	A	.	T	C	C	A	.	C	.	A	CA	.	T	.	.	T	297
Amostra58-Lidice-Traqueia	.AA	.	C	.	T	.	A	.	T	C	C	A	.	C	.	A	CA	.	T	.	.	T	297



KU736747.1 (cepa Ma5 vacina)	---	---	AAT	GGC	C	---	---	AGC	TT	TTC	TAT	AAT	TTA	ACA	GTT	AGT	GTA	GCT	AAG	TAC	CCT	459
Amostra308-Macaé-Rim	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	336
Amostra311-Macaé-Rim	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	336
Amostra308-Macaé-Intestino	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	336
Amostra308-Macaé-Traqueia	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	336
Amostra159-Vargem-Intestino	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	336
Amostra159-Vargem-Traqueia	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	336
Amostra156-Vargem-Traqueia	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	336
Amostra157-Vargem-Traqueia	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	336
Amostra157-Vargem-Intestino	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	336
Amostra156-Vargem-Intestino	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	336
Amostra153-Vargem-Traqueia	GGA	AAT	.C	.T	.CT	AGC	G.T	.G	.T						CC.	.G	A.		.T	T.		357
Amostra153-Vargem-Intestino	GGA	AAT	.C	.T	.CT	AGC	G.T	.G	.T						CC.	.G	A.		.T	T.		357
Amostra153-Vargem-Rim	GGA	AAT	.C	.T	.CT	AGC	G.T	.G	.T						CC.	.G	A.		.T	T.		357
Amostra176-Passatrés-Rim	GGA	AAT	.T	.CT	AGT	G.T	.G	.T							CC.	.G	A.		.T	T.		357
Amostra172-Passatrés-Intestino	GGA	AAT	.T	.CT	AGT	G.T	.G	.T							CC.	.G	A.		.T	T.		357
Amostra171-Passatrés-Intestino	GGA	AAT	.T	.CT	AGT	G.T	.G	.T							CC.	.G	A.		.T	T.		357
Amostra176-Passatrés-Traqueia	GGA	AAT	.T	.CT	AGT	G.T	.G	.T							CC.	.G	A.		.T	T.		357
Amostra55-Lidice-Rim	GGA	AAT	.C	.T	.CT	AGT	G.T	.G	.T						CC.	.G	A.		.T	T.		357
Amostra55-Lidice-Traqueia	GGA	AAT	.C	.T	.CT	AGT	G.T	.G	.T						CC.	.G	A.		.T	T.		357
Amostra57-Lidice-Rim	GGA	AAT	.C	.T	.CT	AGT	G.T	.G	.T						CC.	.G	A.		.T	T.		357
Amostra57-Lidice-Traqueia	GGA	AAT	.C	.T	.CT	AGT	G.T	.G	.T						CC.	.G	A.		.T	T.		357
Amostra58-Lidice-Rim	GGA	AAT	.C	.T	.CT	AGT	G.T	.G	.T						CC.	.G	A.		.T	T.		357
Amostra58-Lidice-Traqueia	GGA	AAT	.C	.T	.CT	AGT	G.T	.G	.T						CC.	.G	A.		.T	T.		357
Consensus	GGA	AAT	AAT	GGT	CCT	AG-	GGT	TTG	TTT	TAT	AAT	TTA	ACA	GTT	CCT	GTG	ACT	AAG	TAT	CCT		



KU736747.1 (cepa Ma5 vacina)	ACT	TTT	AAA	TCA	TTT	CAG	TGT	GTT	AAT	AAT	TTA	ACA	TCC	GTA	TAT	TTA	AAT	GGT	GAT	CTT	519	
Amostra308-Macaé-Rim	396	
Amostra311-Macaé-Rim	396	
Amostra308-Macaé-Intestino	396	
Amostra308-Macaé-Traqueia	396	
Amostra159-Vargem-Intestino	396	
Amostra159-Vargem-Traqueia	396	
Amostra156-Vargem-Traqueia	396	
Amostra157-Vargem-Traqueia	396	
Amostra157-Vargem-Intestino	396	
Amostra156-Vargem-Intestino	396	
Amostra153-Vargem-Traqueia	.AG		.G	.G	C.	.A				CA.		.T	.G	.C	C.					T.A	417	
Amostra153-Vargem-Intestino	.AG		.G	.G	C.	.A				CA.		.T	.G	.C	C.						T.A	417
Amostra153-Vargem-Rim	.AG		.G	.G	C.	.A				CA.		.T	.G	.C	C.						T.A	417
Amostra176-Passatrés-Rim	.AG		.G	.G	C.	.A				CA.		.T	.G	.C	C.						T.A	417
Amostra172-Passatrés-Intestino	.AG		.G	.G	C.	.A				CA.		.T	.G	.C	C.						T.A	417
Amostra171-Passatrés-Intestino	.AG		.G	.G	C.	.A				CA.		.T	.G	.C	C.						T.A	417
Amostra176-Passatrés-Traqueia	.AG		.G	.G	C.	.A				CA.		.T	.G	.C	C.						T.A	417
Amostra55-Lidice-Rim	.AG		.G	.G	C.	.A				CA.		.T	.G	.C	C.						T.A	417
Amostra55-Lidice-Traqueia	.AG		.G	.G	C.	.A				CA.		.T	.G	.C	C.						T.A	417
Amostra57-Lidice-Rim	.GG		.G	.G	C.	.A				CA.		.T	.G	.C	C.	G			C		T.A	417
Amostra57-Lidice-Traqueia	.GG		.G	.G	C.	.A				CA.		.T	.G	.C	C.	G			C		T.A	417
Amostra58-Lidice-Rim	.GG		.G	.G	C.	.A				CA.		.T	.G	.C	C.	G			C		T.A	417
Amostra58-Lidice-Traqueia	.GG		.G	.G	C.	.A				CA.		.T	.G	.C	C.	G			C		T.A	417
Consensus	ACG	TTT	AAG	TCG	CTT	CAA	TGT	GTT	AAT	AAT	CAA	ACA	TCT	GTG	TAC	TTA	AAT	GGT	GAT	TTA		



KU736747.1 (cepa Ma5 vacina)	GTT	TAC	ACC	TCT	AAT	GCG	ACC	ACA	GAT	GTT	ACA	TCT	GCA	GGT	GTT	TAT	TTT	AAA	GCT	GGT	579
Amostra308-Macaé-RimA					.GT	GGC					.C		.C	.A	477
Amostra311-Macaé-RimGT	GGC					.C		.C	.A	477
Amostra308-Macaé-IntestinoGT	GGC					.C		.C	.A	477
Amostra308-Macaé-TraqueiaGT	GGC					.C		.C	.A	477
Amostra159-Vargem-IntestinoGT	GGC					.C		.C	.A	477
Amostra159-Vargem-TraqueiaGT	GGC					.C		.C	.A	477
Amostra156-Vargem-TraqueiaGT	GGC					.C		.C	.A	477
Amostra157-Vargem-TraqueiaGT	GGC					.C		.C	.A	477
Amostra157-Vargem-IntestinoGT	GGC					.C		.C	.A	477
Amostra156-Vargem-IntestinoGT	GGC					.C		.C	.A	477
Amostra153-Vargem-TraqueiaTT	.T			.A		.A			.GT	GGC					.C		.C	.A	477
Amostra153-Vargem-IntestinoTT	.T			.A		.A			.GT	GGC					.C		.C	.A	477
Amostra153-Vargem-RimTT	.T			.A		.A			.GT	GGC					.C		.C	.A	477
Amostra176-Passatrés-RimTT	.T			.A		.A			.GT	GGC					.C		.C	.A	477
Amostra172-Passatrés-IntestinoTT	.T			.A		.A			.GT	GGC					.C		.C	.A	477
Amostra171-Passatrés-IntestinoTT	.T			.A		.A			.GT	GGC					.C		.C	.A	477
Amostra176-Passatrés-TraqueiaTT	.T			.A		.A			.GT	GGC					.C		.C	.A	477
Amostra55-Lidice-RimTT	.T			.A		.A			.GT	GGC					.C		.C	.A	477
Amostra55-Lidice-TraqueiaTT	.T			.A		.A			.GT	GGC					.C		.C	.A	477
Amostra57-Lidice-RimTT	.T			.A		.AT			.GT	GGC					.C		.C	.A	477
Amostra57-Lidice-TraqueiaTT	.T			.A		.AT			.GT	GGC					.C		.C	.A	477
Amostra58-Lidice-RimTT	.T			.A		.AT			.GT	GGC					.C		.C	.A	477
Amostra58-Lidice-TraqueiaTT	.T			.A		.AT			.GT	GGC					.C		.C	.A	477
Consensus	GTT	TTT	ACT	TCT	AAT	GAG	ACC	AAA	GAT	GTT	AGT	GGC	GCA	GGT	GTT	TAT	TTT	AAA	GCT	GGT	



utilizado como referência a cepa vacinal Ma5 com número de acesso no GenBank de KU736747.

Das 10 amostras obtidas neste estudo e classificadas dentro do sorotipo Massachusetts, quatro pertenciam a granja de frangos de corte de Macaé e seis a granja de Vargem Alegre. Das quatro amostras de Macaé, duas foram obtidas a partir do rim, uma da traquéia e uma do intestino. Em relação as seis amostras de Vargem Alegre, três foram oriundas da traquéia e três do Intestino. O percentual de identidade das sequências desse estudo do sorotipo Massachusetts entre as granjas de Macaé e Vargem Alegre variou de 96,43 a 100%. A amostra 308 Macaé – Rim foi a que apresentou menor percentual de identidade, tanto em relação a sequência de referência (96,77%), quanto em relação as demais amostras deste trabalho (96,43 a 96,77%), mudanças nas estrutura de S1 são associadas com alterações no tropismo, como é o caso desta amostra. É interessante notar que relação a amostra 308 o vírus detectado no tecido renal apresentou um percentual de identidade de 96,6% com relação ao vírus detectado no tecido da traquéia e do intestino. Isso demonstra que diferentes variantes virais pode co-existir em uma mesma ave (Figura 9). Ainda com relação a amostra 308 Macaé-Rim que apresentou a maior variabilidade genética foi possível observar 16 substituições de nucleotídeos, dessas 10 ocorreram no nucleotídeo da terceira posição do códon. Normalmente, substituições de nucleotídeos nessa posição do códon não altera o aminoácido e conseqüentemente a proteína, sendo conhecida nesse caso como substituições silenciosas. Na granja de frangos de corte de Vargem Alegre foi possível observar a presença dos sorotipos Massachusetts e BR no mesmo lote em aves da mesma idade. Esse resultado prova que é possível que um mesmo lote de aves pode se infectar por mais de um sorotipo viral, e que a vacina utilizada (cepa Ma5 do sorotipo Massachusetts) não foi capaz de proteger as aves do desafio de campo. O percentual de identidade observado entre as amostras do sorotipo Massachusetts e a amostra 153 do sorotipo BR variou de 72,41 a 72,74% na granja de Vargem Alegre, com variação de 168 nucleotídeos sendo que as substituições no terceiro nucleotídeo do códon foi observada em apenas 50 posições. Dessa forma, a maioria das substituições alteram o aminoácido e conseqüentemente a proteína.

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
KU736747.1 (cepa Ma5 vacina)	1		96,77	100,00	99,83	99,83	99,66	99,66	99,66	99,66	100,00	99,66
Amostra308-Macaé-Rim	2	19		96,77	96,60	96,60	96,43	96,43	96,43	96,43	96,77	96,43
Amostra311-Macaé-Rim	3	0	19		99,83	99,83	99,66	99,66	99,66	99,66	100,00	99,66
Amostra308-Macaé-Intestino	4	1	20	1		100,00	99,83	99,83	99,83	99,83	99,83	99,83
Amostra308-Macaé-Traqueia	5	1	20	1	0		99,83	99,83	99,83	99,83	99,83	99,83
Amostra159-Vargem-Intestino	6	2	21	2	1	1		100,00	100,00	100,00	99,66	100,00
Amostra159-Vargem-Traqueia	7	2	21	2	1	1	0		100,00	100,00	99,66	100,00
Amostra156-Vargem-Traqueia	8	2	21	2	1	1	0	0		100,00	99,66	100,00
Amostra157-Vargem-Traqueia	9	2	21	2	1	1	0	0	0		99,66	100,00
Amostra157-Vargem-Intestino	10	0	19	0	1	1	2	2	2	2		99,66
Amostra156-Vargem-Intestino	11	2	21	2	1	1	0	0	0	0	2	

Figura 9. Comparação par-a-par do Percentual de Identidade (diagonal inferior) e diferença (diagonal superior) de um fragmento de aproximadamente 600 pares de base do gene S1 do vírus da Bronquite infecciosa das Galinhas (vBIG) obtidas de amostras de tecido da traquéia, rim e intestino pertencentes ao sorotipo Massachusetts de aves positivas para o vBIG pela RT-nPCR em granjas de frangos de corte e galinha de postura do estado do Rio de Janeiro. A cepa vacinal Ma5 do sorotipo Massachusetts foi utilizada como sequência de referência.

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
JX182775.1 UFMG	1		88,34	88,34	88,34	88,51	88,67	88,83	88,67	88,83	88,83	87,68	87,68	87,68	87,68
Amostra153-Vargem-Traqueia	2	71		100,00	100,00	95,07	95,24	95,40	95,24	94,91	94,91	91,46	91,46	91,46	91,46
Amostra153-Vargem-Intestino	3	71	0		100,00	95,07	95,24	95,40	95,24	94,91	94,91	91,46	91,46	91,46	91,46
Amostra153-Vargem-Rim	4	71	0	0		95,07	95,24	95,40	95,24	94,91	94,91	91,46	91,46	91,46	91,46
Amostra171-Passatrês-Intestino	5	70	30	30	30		99,84	99,67	99,84	99,18	99,18	90,80	90,80	90,80	90,80
Amostra172-Passatrês-Intestino	6	69	29	29	29	1		99,84	100,00	99,34	99,34	90,97	90,97	90,97	90,97
Amostra176-Passatrês-Traqueia	7	68	28	28	28	2	1		99,84	99,18	99,18	91,13	91,13	91,13	91,13
Amostra176-Passatrês-Rim	8	69	29	29	29	1	0	1		99,34	99,34	90,97	90,97	90,97	90,97
Amostra55-Lídice-Traqueia	9	68	31	31	31	5	4	5	4		100,00	90,64	90,64	90,64	90,64
Amostra55-Lídice-Rim	10	68	31	31	31	5	4	5	4	0		90,64	90,64	90,64	90,64
Amostra57-Lídice-Traqueia	11	75	52	52	52	56	55	54	55	57	57		100,00	100,00	100,00
Amostra57-Lídice-Rim	12	75	52	52	52	56	55	54	55	57	57	0		100,00	100,00
Amostra58-Lídice-Traqueia	13	75	52	52	52	56	55	54	55	57	57	0	0		100,00
Amostra58-Lídice-Rim	14	75	52	52	52	56	55	54	55	57	57	0	0	0	

Figura 10. Comparação par-a-par do Percentual de Identidade (diagonal inferior) e diferença (diagonal superior) de um fragmento de aproximadamente 600 pares de base do gene S1 do vírus da Bronquite infecciosa das Galinhas (vBIG) pertencentes ao Sorotipo BR obtidas de amostras de tecido da traquéia, rim e intestino de aves positivas para o vBIG pela RT-nPCR em granjas de frangos de corte do estado do Rio de Janeiro. A cepa UFMG do sorotipo BR (JX182775) foi utilizada como sequência de referência.

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
DQ448274.1 (USP)	1		100,00	100,00	100,00	94,64	94,45	94,64	94,82	94,27	94,27	91,68	91,68	91,68	91,68
Amostra153-Vargem-Traqueia	2	0		100,00	100,00	94,64	94,45	94,64	94,82	94,27	94,27	91,68	91,68	91,68	91,68
Amostra153-Vargem-Intestino	3	0	0		100,00	94,64	94,45	94,64	94,82	94,27	94,27	91,68	91,68	91,68	91,68
Amostra153-Vargem-Rim	4	0	0	0		94,64	94,45	94,64	94,82	94,27	94,27	91,68	91,68	91,68	91,68
Amostra172-Passatrês-Intestino	5	29	29	29	29		99,82	100,00	99,82	99,26	99,26	91,13	91,13	91,13	91,13
Amostra171-Passatrês-Intestino	6	30	30	30	30	1		99,82	99,63	99,08	99,08	90,94	90,94	90,94	90,94
Amostra176-Passatrês-Rim	7	29	29	29	29	0	1		99,82	99,26	99,26	91,13	91,13	91,13	91,13
Amostra176-Passatrês-Traqueia	8	28	28	28	28	1	2	1		99,08	99,08	91,31	91,31	91,31	91,31
Amostra55-Lídice-Rim	9	31	31	31	31	4	5	4	5		100,00	90,76	90,76	90,76	90,76
Amostra55-Lídice-Traqueia	10	31	31	31	31	4	5	4	5	0		90,76	90,76	90,76	90,76
Amostra57-Lídice-Rim	11	45	45	45	45	48	49	48	47	50	50		100,00	100,00	100,00
Amostra57-Lídice-Traqueia	12	45	45	45	45	48	49	48	47	50	50	0		100,00	100,00
Amostra58-Lídice-Rim	13	45	45	45	45	48	49	48	47	50	50	0	0		100,00
Amostra58-Lídice-Traqueia	14	45	45	45	45	48	49	48	47	50	50	0	0	0	

Figura 11. Comparação par-a-par do Percentual de Identidade (diagonal inferior) e diferença (diagonal superior) de um fragmento de aproximadamente 600 pares de base do gene S1 do vírus da Bronquite infecciosa das Galinhas (vBIG) pertencentes ao Sorotipo BR obtidas de amostras de tecido da traqueia, rim e intestino de aves positivas para o vBIG pela RT-nPCR em granjas de frangos de corte do estado do Rio de Janeiro. A cepa USP do sorotipo BR (DQ448274) foi utilizada como sequência de referência.

7.5 Variabilidade na sequência de aminoácidos deduzido do gene S1 do vBIG

Um alinhamento das sequências dos polipeptídeos também foi realizado utilizando as amostras do sorotipo Massachusetts, tendo como referência a cepa vacinal Ma5 (KU736747), como também as amostras dos sorotipos BR, utilizando como referências as cepas UFMG (JX182775) e USP (DQ448274). Por meio destes alinhamentos foi possível a construção de tabelas que auxiliam na visualização e na localização dos aminoácidos que divergem comparados à amostra referência. A região conservada do gene S1 do vBIG não foi analisada, pois a qualidade do sequenciamento dessa região não foi satisfatória. O gene S1 do vBIG possui duas regiões hipervariáveis (KUTERS et al., 1989) que estão localizadas entre aminoácidos das posições 54 a 68 (região Hipervariável 1 - RHV) e 116 a 141 região RHV 2. Nestas regiões é esperada uma maior frequência de polimorfismos, contudo, também são pontuadas outros aminoácidos que apresentaram divergentes em relação às amostras que serviram de referência no alinhamento.

Na Tabela 1, são pontuados o número e a posição dos aminoácidos divergentes entre as amostras do sorotipo Massachusetts desse estudo e a cepa vacinal Ma5 de referência. Foi possível verificar que a amostra 308 Macaé – rim possui uma maior frequência de substituições na sequência do polipeptídeo, tanto em relação a cepa vacinal Ma5 quanto as demais amostras descritas nesse estudo. No entanto, a maioria das substituições ocorreram fora das regiões hipervariáveis, conforme pode ser observado na Tabela 1. Na figura 12, estão relacionados os percentuais de identidade entre as amostras obtidas nesse estudo pertencentes ao sorotipo Massachusetts em relação a cepa vacinal Ma5.

Os percentuais de identidade de aminoácidos de todas as amostras do sorotipo Massachusetts obtidas de aves naturalmente infectadas variou de 96,92 a 100% com relação a cepa vacinal Ma5. Um resultado semelhante foi observado entre as amostras obtidas nesse estudo, onde o percentual de identidade variou de 95,90 a 100%. Apesar da variabilidade genética observada entre as amostras desse estudo e a cepa vacinal Ma5 ainda é possível que haja proteção cruzada, devido a alta similaridade entre as amostras observadas quando comparadas a cepa vacinal e as poucas alterações nas regiões hipervariáveis, que seriam de maior relevância para alterar a proteção cruzada (LENZ, 2006).

Tabela 2 – Análise em relação ao número e posição das substituições de aminoácidos da sequência de polipeptídeo deduzida de uma porção do gene S1 de amostras classificadas no sorotipo Massachusetts obtidas de frangos de corte e galinhas de postura positivas para o vBIG através da técnica de RT-nPCR em granjas do estado do Rio de Janeiro. A cepa vacinal Ma5 do sorotipo Massachusetts sob número de acesso KU367447 no GenBank foi utilizada como sequência de referência

Amostras	Região conservada 43	Região hipervariável 1 64				Região hipervariável 2 130		
			70	74	101		179	205
KU367447 –	H	S	I	G	Y	S	A	R
308 – intestino -	H	<u>P</u>	I	G	Y	S	A	R
308 – traqueia -	H	<u>P</u>	I	G	Y	S	A	R
308 – rim -	H	S	<u>T</u>	<u>D</u>	<u>H</u>	<u>F</u>	<u>E</u>	<u>K</u>
311 – Rim -	H	S	I	G	Y	S	A	R
159 – intestino	<u>Y</u>	<u>P</u>	I	G	Y	S	A	R
159 – traqueia –	<u>Y</u>	<u>P</u>	I	G	Y	S	A	R
156 – intestino	<u>Y</u>	<u>P</u>	I	G	Y	S	A	R
156 – traqueia –	<u>Y</u>	<u>P</u>	I	G	Y	S	A	R
157 – traqueia –	<u>Y</u>	<u>P</u>	I	G	Y	S	A	R
157 – intestino	H	S	I	G	Y	S	A	R

Na Tabela 2, estão pontuados o número e posição dos aminoácidos divergentes entre as amostras pertencentes ao sorotipo BR quando comparadas com a cepa USP do sorotipo BR. Neste caso, uma maior frequência no número de substituições de aminoácidos foi observada nas regiões hipervariáveis 1 e 2 quando comparadas com outras regiões da sequência de polipeptídeo deduzido do gene S1 do vBIG (Tabela 3). Quando o percentual de identidade entre a cepa USP e as amostras desse estudo foi comparado verificou-se uma variação de 90,45 a 100%. É possível verificar um percentual de 100% de identidade na sequência de aminoácidos entre as amostras de Vargem Alegre 153 (intestino, rim e traqueia) com as amostras referência da USP. A maior variabilidade genética na sequência de aminoácido foi observada entre as sequências da granja de Passa Três juntamente com a amostra 55 da granja de Lidice (Traqueia e Rim) em relação as demais amostras da granja de Lidice e Vargem Alegre. O percentual de identidade entre essas amostras variou de 88,20 a 88,76%.

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
KU736747.1 (cepa Ma5 vacina) (+1)	1		96,92	99,49	99,49	100,00	98,97	98,97	98,97	98,97	98,97	100,00
Amostra308-RimMacaé (+1)	2	6		96,41	96,41	96,92	95,90	95,90	95,90	95,90	95,90	96,92
Amostra308-intestinoMacaé (+1)	3	1	7		100,00	99,49	99,49	99,49	99,49	99,49	99,49	99,49
Amostra308-TraqueiaMacaé (+1)	4	1	7	0		99,49	99,49	99,49	99,49	99,49	99,49	99,49
Amostra311-RimMacaé (+1)	5	0	6	1	1		98,97	98,97	98,97	98,97	98,97	100,00
Amostra159-Vargem-Intestino (+1)	6	2	8	1	1	2		100,00	100,00	100,00	100,00	98,97
Amostra159-Vargem-Traqueia (+1)	7	2	8	1	1	2	0		100,00	100,00	100,00	98,97
Amostra156-Vargem-Intestino (+1)	8	2	8	1	1	2	0	0		100,00	100,00	98,97
Amostra156-Vargem-traqueia (+1)	9	2	8	1	1	2	0	0	0		100,00	98,97
Amostra157-Vargem-traqueia (+1)	10	2	8	1	1	2	0	0	0	0		98,97
Amostra157-Vargem-intestino (+1)	11	0	6	1	1	0	2	2	2	2	2	

Figura 11. Comparação par-a-par do Percentual de Identidade (diagonal inferior) e diferença (diagonal superior) de um fragmento de aproximadamente 200 aminoácidos deduzidos de uma porção do gene S1 do vírus da Bronquite infecciosa das Galinhas (vBIG) pertencentes ao Sorotipo Massachusetts obtidas de amostras de tecido da traqueia, rim e intestino de aves positivas para o vBIG pela RT-nPCR em granjas de frangos de corte e galinhas de postura do estado do Rio de Janeiro. A cepa vacinal Ma5 foi utilizada como referência (KU736747).

Quando a cepa UFMG foi utilizada como sequência de referência uma variabilidade de 72,43 a 75,31% foi observado em relação as amostras obtidas no presente estudo. É nitidamente notável que o percentual de identidade é consideravelmente inferior quando a cepa da UFMG foi utilizada como referência. Possivelmente, tal fato esteja relacionado com a época de isolamento das duas cepas. A cepa da UFMG foi isolada na década de 70, porém a cepa da USP foi isolada no ano de 2004. Dessa forma, é perfeitamente aceitável que as amostras obtidas neste estudo apresentem o percentual de identidade mais próximo da sequência mais recente (USP). O percentual de identidade entre as amostras do sorotipo BR detectadas neste estudo, quando comparados a cepa UFMG de referência (Figura 14), apresentou um percentual de identidade abaixo de 80%, o que pode representar pouca proteção-cruzada caso a cepa UFMG fosse utilizada como cepa vacinal. Entretanto, com relação a cepa USP poderia proteger as aves com maior eficácia, devido a alta similaridade na sequência de aminoácidos, seguindo a teoria de Landman et al., (2006).

Tabela 3. Análise em relação ao número e posição das substituições de aminoácidos da sequência de polipeptídeo deduzida de uma porção do gene S1 de amostras classificadas no sorotipo BR obtidas de frangos de corte positivos para o vBIG através da técnica de RT-nPCR em granjas do estado do Rio de Janeiro. A cepa USP sob número de acesso DQ4482741 no GenBank foi utilizada como sequência de referência.

Amostras	Região conservada	Região hipervariável 1												Região hipervariável 2														
		43	55	56	57	64	65	67	71	78	88	96	97	106	107	118	120	121	124	133	138	139	141	144	161	162	189	199
DQ4482741	H	Q	T	N	S	S	K	A	S	L	S	Q	T	D	S	S	T	S	H	A	M	P	T	S	K	K	K	L
176 – Passa	H	<u>H</u>	<u>R</u>	<u>A</u>	<u>P</u>	S	<u>T</u>	<u>X</u>	T	L	S	Q	S	D	S	S	<u>N</u>	<u>P</u>	H	A	<u>X</u>	<u>Q</u>	<u>N</u>	S	K	K	<u>T</u>	<u>V</u>
172 – Passa	<u>Y</u>	<u>H</u>	<u>R</u>	<u>A</u>	<u>P</u>	S	<u>T</u>	A	T	L	S	Q	S	D	S	S	<u>N</u>	<u>P</u>	H	A	<u>X</u>	<u>Q</u>	<u>N</u>	S	K	K	<u>T</u>	<u>V</u>
171 – Passa	H	<u>H</u>	<u>R</u>	<u>A</u>	<u>P</u>	S	<u>T</u>	A	T	L	S	Q	S	D	S	S	<u>N</u>	<u>P</u>	H	A	M	<u>Q</u>	<u>N</u>	S	K	K	<u>T</u>	<u>V</u>
176 – Passa	H	<u>H</u>	<u>R</u>	<u>E</u>	<u>P</u>	S	<u>T</u>	A	T	L	S	Q	S	D	S	S	<u>N</u>	<u>P</u>	H	A	M	<u>Q</u>	<u>N</u>	S	K	K	<u>T</u>	<u>V</u>
55 – Lidice	H	<u>H</u>	<u>G</u>	<u>A</u>	<u>P</u>	S	<u>T</u>	A	T	L	S	Q	S	D	S	S	<u>N</u>	<u>P</u>	<u>Y</u>	A	M	<u>Q</u>	T	S	K	K	<u>T</u>	<u>V</u>
55 – Lidice	H	<u>H</u>	<u>G</u>	<u>A</u>	<u>P</u>	S	<u>T</u>	A	T	L	S	Q	S	D	S	S	<u>N</u>	<u>P</u>	<u>Y</u>	A	M	<u>Q</u>	T	S	K	K	<u>T</u>	<u>V</u>
58 – Lidice	H	Q	T	N	S	<u>T</u>	<u>T</u>	A	T	<u>Q</u>	<u>T</u>	<u>E</u>	S	<u>G</u>	<u>R</u>	<u>A</u>	<u>I</u>	<u>P</u>	H	<u>V</u>	M	<u>K</u>	T	<u>P</u>	<u>R</u>	<u>N</u>	K	<u>V</u>
57 – Lidice	H	Q	T	N	S	<u>T</u>	<u>T</u>	A	T	<u>Q</u>	<u>T</u>	<u>E</u>	S	<u>G</u>	<u>R</u>	<u>A</u>	<u>I</u>	<u>P</u>	H	<u>V</u>	M	<u>K</u>	T	<u>P</u>	<u>R</u>	<u>N</u>	K	<u>V</u>
58 – Lidice	H	Q	T	N	S	<u>T</u>	<u>T</u>	A	T	<u>Q</u>	<u>T</u>	<u>E</u>	S	<u>G</u>	<u>R</u>	<u>A</u>	<u>I</u>	<u>P</u>	H	<u>V</u>	M	<u>K</u>	T	<u>P</u>	<u>R</u>	<u>N</u>	K	<u>V</u>
153 –	H	Q	T	N	S	S	<u>T</u>	A	T	L	S	Q	T	D	S	S	T	S	H	A	M	P	T	S	K	K	K	L
153 –	H	Q	T	N	S	S	<u>T</u>	A	T	L	S	Q	T	D	S	S	T	S	H	A	M	P	T	S	K	K	K	L
153 –	H	Q	T	N	S	S	<u>T</u>	A	T	L	S	Q	T	D	S	S	T	S	H	A	M	P	T	S	K	K	K	L

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
DQ448274.1 (USP) (+1)	1		92,70	92,70	92,13	92,70	92,70	92,70	90,45	90,45	90,45	100,00	100,00	100,00
Amostra176-Passatrês-rim (+1)	2	13		100,00	99,44	99,44	98,31	98,31	88,76	88,76	88,76	92,70	92,70	92,70
Amostra172-Passatrês-intestino (+1)	3	13	0		99,44	99,44	98,31	98,31	88,76	88,76	88,76	92,70	92,70	92,70
Amostra171-Passatrês-Intestino (+1)	4	14	1	1		98,88	97,75	97,75	88,20	88,20	88,20	92,13	92,13	92,13
Amostra176-Passatrês-Traqueia (+1)	5	13	1	1	2		97,75	97,75	88,76	88,76	88,76	92,70	92,70	92,70
Amostra55-Lídice-Traqueia (+1)	6	13	3	3	4	4		100,00	88,76	88,76	88,76	92,70	92,70	92,70
Amostra55-Lídice-rim (+1)	7	13	3	3	4	4	0		88,76	88,76	88,76	92,70	92,70	92,70
Amostra58-Lídice-Rim (+1)	8	17	20	20	21	20	20	20		100,00	100,00	90,45	90,45	90,45
Amostra57-Lídice-Traqueia (+1)	9	17	20	20	21	20	20	20	0		100,00	90,45	90,45	90,45
Amostra58-Lídice-Traqueia (+1)	10	17	20	20	21	20	20	20	0	0		90,45	90,45	90,45
Amostra153-Vargem-Intestino (+1)	11	0	13	13	14	13	13	13	17	17	17		100,00	100,00
Amostra153-Vargem-rim (+1)	12	0	13	13	14	13	13	13	17	17	17	0		100,00
Amostra153-Vargem-Traqueia (+1)	13	0	13	13	14	13	13	13	17	17	17	0	0	

Figura 12. Comparação par-a-par do Percentual de Identidade (diagonal inferior) e diferença (diagonal superior) de um fragmento de aproximadamente 200 aminoácidos deduzidos de uma porção do gene S1 do vírus da Bronquite infecciosa das Galinhas (vBIG) pertencentes ao Sorotipo BR obtidas de amostras de tecido da traqueia, rim e intestino de aves positivas para o vBIG pela RT-nPCR em granjas de frangos de corte do estado do Rio de Janeiro. A cepa USP do sorotipo BR foi utilizada como referência (DQ448274).

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
JX182775.1 UFMG (+1)	1		73,66	73,66	73,66	74,90	74,90	74,49	74,90	75,31	75,31	72,43	72,43	72,43
Amostra153-Vargem-Traqueia (+1)	2	64		100,00	100,00	93,56	93,56	93,07	93,56	93,56	93,56	90,59	90,59	90,59
Amostra153-Vargem-Intestino (+1)	3	64	0		100,00	93,56	93,56	93,07	93,56	93,56	93,56	90,59	90,59	90,59
Amostra153-Vargem-rim (+1)	4	64	0	0		93,56	93,56	93,07	93,56	93,56	93,56	90,59	90,59	90,59
Amostra176-Passatrês-rim (+1)	5	61	13	13	13		100,00	99,50	99,50	98,51	98,51	89,11	89,11	89,11
Amostra172-Passatrês-intestino (+1)	6	61	13	13	13	0		99,50	99,50	98,51	98,51	89,11	89,11	89,11
Amostra171-Passatrês-Intestino (+1)	7	62	14	14	14	1	1		99,01	98,02	98,02	88,61	88,61	88,61
Amostra176-Passatrês-Traqueia (+1)	8	61	13	13	13	1	1	2		98,02	98,02	89,11	89,11	89,11
Amostra55-Lidice-Traqueia (+1)	9	60	13	13	13	3	3	4	4		100,00	89,11	89,11	89,11
Amostra55-Lidice-rim (+1)	10	60	13	13	13	3	3	4	4	0		89,11	89,11	89,11
Amostra58-Lidice-Traqueia (+1)	11	67	19	19	19	22	22	23	22	22	22		100,00	100,00
Amostra58-Lidice-Rim (+1)	12	67	19	19	19	22	22	23	22	22	22	0		100,00
Amostra57-Lidice-Traqueia (+1)	13	67	19	19	19	22	22	23	22	22	22	0	0	

Figura 13. Comparação par-a-par do Percentual de Identidade (diagonal inferior) e diferença (diagonal superior) de um fragmento de aproximadamente 200 aminoácidos deduzidos de uma porção do gene S1 do vírus da Bronquite infecciosa das Galinhas (vBIG) pertencentes ao Sorotipo BR obtidas de amostras de tecido da traquéia, rim e intestino de aves positivas para o vBIG pela RT-nPCR em granjas de frangos de corte do estado do Rio de Janeiro. A cepa UFMG do sorotipo BR foi utilizada como referência (JX182775).

7.6 Análise Histopatológica

Os achados histopatológicos nos tecidos de traqueia foram de intensidades variadas, sendo o tecido mais afetado em todas as aves. Foi possível visualizar perda de cílios, erosão epitelial, desprendimento do epitélio, focos de inflamação com infiltrados mononucleares, hipertrofia, hiperplasia de células caliciformes e presença de muco em algumas lâminas. Figura 15 A, C, E, G

Nos rins, em galinhas de postura da granja de Macaé apresentavam acúmulo de gordura, visíveis em lâmina, contudo foi possível verificar nestas aves e das outras granjas a presença de alguns focos de necrose, presença de picnose e cariorrexia, congestão com hemossiderina, degeneração vacuolar, com acidofilia citoplasmática, além de células atípicas, sendo as aves da granja de Passa três com maior incidência destas figuras mitóticas e com maior número de lesões em rim. Figura 15 B.

Nas lâminas de tonsila cecal, foram visualizadas figuras mitóticas em Passa três; em Macaé, como foi verificado a presença de parasito em uma das lâminas, qualquer lesão no tecido foi desconsiderada pela impossibilidade de descrever a lesão como causa da doença. As granjas de Lidice e Vargem Alegre não apresentaram lesões dignas de nota.

As amostras de tecidos analisadas em lâminas de microscopia foram distribuídas na Tabela 4 abaixo com as lesões de maior frequência de aparecimento a cada órgão por granja, segue abaixo com os seguintes resultados:

Tabela 4. Alterações microscópicas observadas em cortes histológicos do tecido traqueal, renal e intestinal de aves positivas para o vBIG através da técnica de RT-nPCR em granjas de frangos de corte e galinha de postura do estado do Rio de Janeiro.

Granja	Tecidos		
	Traqueal	Renal	Intestinal
Macaé	Perda de cílios; erosão do epitélio; descamação; hiperplasia de células caliciformes e infiltrado mononuclear; Presença de exsudato serohemorrágico e mucofibrinoso no lúmen.	Alguns focos de necrose; presença de picnose e cariorrexia; Congestão com hemossiderina; degeneração vacuolar	Devido presença de parasito <i>Heterakis gallinarum</i> , desconsideramos qualquer achado
Vargem Alegre	Perda de cílios; erosão do epitélio; descamação; hiperplasia de células caliciformes e infiltrado mononuclear;	Infiltração de células inflamatórias multifocal	Sem alterações dignas de nota.
Passa Três	Perda de cílios; erosão do epitélio; descamação; hiperplasia de células caliciformes e infiltrado mononuclear;	Proliferação de células mononucleares, presença de picnose e acidofilia citoplasmática; presença de células atípicas bizarras tanto em células epiteliais como em glomerulos	Presença de figuras mitóticas; proliferação de células atípicas na mucosa.
Lidice	Perda de cílios; erosão do epitélio; descamação; hiperplasia de células caliciformes e infiltrado	Infiltração de células mononucleares	Sem alterações dignas de nota.

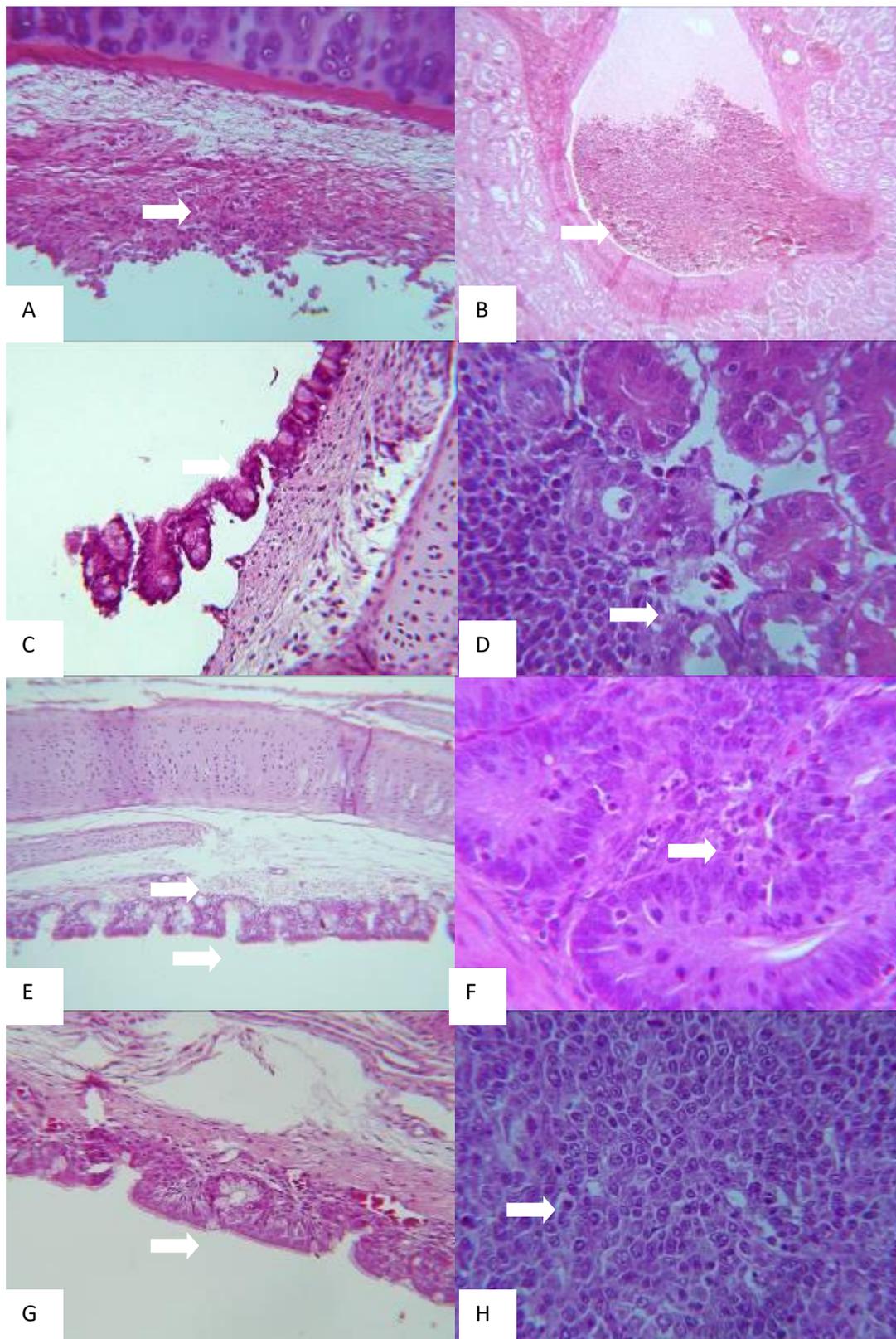


Figura 15 – Análise histopatológica em tecidos de aves naturalmente infectadas com Bronquite Infecciosa das Galinhas em granjas do Estado do Rio de Janeiro. A: Traqueia de galinha da região de Macaé apresentando erosão epitelial, perda de cílios e infiltração da lâmina própria – aumento de 16X. B: Rim de Galinha da região de Macaé com vaso

congesto com presença de hemossiderina – aumento de 6.3X. C: Traqueia de Galinha da região de Vargem Alegre com desprendimento do epitélio – aumento de 16X. D: Rim de Galinha da região de Vargem Alegre com infiltração de células mononucleares multifocal – aumento de 40X. E: Traqueia de Galinha da região de Passa Três com Hipertrofia de células caliciformes – aumento de 6.3X; F: Tonsila Cecal de galinha com presença de detritos nucleares e figuras mitóticas – aumento de 40X. G: Traqueia de Galinha da região de Lidice com hipertrofia e hiperplasia de células caliciformes – aumento de 16X; H: Rim de Galinha da região de Lidice com proliferação de células mononucleares – aumento de 40X;

8 DISCUSSÃO

8.1 Análise da variabilidade genética do gene S1 do vBIG

A contínua emergência de variantes virais de vBIG é um agravante para a produção avícola, pois apesar da existência de protocolos vacinais, ainda é possível a ocorrência de surtos da doença. No presente estudo foi obtida uma frequência de 90% de positividade para vBIG em aves que foram previamente vacinadas, esta detecção foi realizada por meio da reação de RT-qPCR que é uma reação bastante sensível com alta especificidade (CALLISON et al., 2006; ZHAO et al., 2015; FRAGA et al., 2016). Porém somente a detecção do agente não seria suficiente para elaboração deste estudo, logo foi necessário aprofundar na genealogia das amostras estudadas, com a realização de uma reação de RT-nPCR seguida de sequenciamento, que tornou possível a análise de um fragmento do gene S1, de aproximadamente 600 pb, demonstrando a presença de alta variabilidade do gene S1 do vBIG com a ocorrência de variantes virais pertencentes aos sorotipos Mass e BR nas granjas estudadas. A análise molecular de isolados a campo de vBIG pode auxiliar em protocolos vacinais, devido a obtenção de informações importantes em relação a sequência do vírus presente em surtos, possibilitando a comparação entre amostra coletada e amostra vacinal, podendo determinar a probabilidade de proteção-cruzada entre elas (CAVANAGH, 2003; COOK et al., 1999, GELB et al., 2005), além disso, auxilia no enriquecimento sobre a doença e seu agente, podendo servir quem sabe como fonte em estudos epidemiológicos.

A obtenção das amostras de RNA extraídas diretamente de tecidos é uma prática que apresenta algumas dificuldades para gerar um material genético de boa qualidade, pois pode ocorrer a diminuição de amplificação das sequências, por diversos motivos, tais como a alta quantidade de material genético do próprio hospedeiro, por exemplo. Logo, é necessário preservar o tecido para prevenir a degradação do material genético durante o processo de coleta, transporte e processamento, considerando que para garantir o isolamento ou a amplificação, a temperatura ideal para armazenagem e transporte da amostra seja de até 4°C (KULIWABA; FAZZALARI; FINDLAY, 2005). Outro aspecto importante a considerar é a baixa concentração de RNA viral no tecido quando se realiza a extração direta (CHAMORRO, 2015), o que torna muito comum o uso da técnica de extração de RNA viral após inoculação em ovos embrionados (GUY, 2008) como realizado em diversos trabalhos de análise do gene S1 de vBIG no Brasil (OKINO, 2007; FERNANDO, 2013; PEREIRA, 2015). Neste trabalho, foi realizada a coleta dos tecidos e armazenamento em RNA later, que é um reagente que garante a preservação do conteúdo coletado até mesmo em temperatura ambiente (25°C), porém as amostras foram refrigeradas em freezer -80°C e todo processo de extração foi realizado em gelo, para garantir que as amostras não degradassem. Mesmo com as dificuldades apresentadas acima, a extração direta do tecido é um método utilizado por diversos autores (SANTOS, 2012; CHAMORRO, 2015) assim como foi feito neste trabalho. Dessa forma, a escolha de realizar a detecção e caracterização molecular do vBIG diretamente do tecido foi tomada uma vez que o vírus quando inoculado em ovos embrionados ou em qualquer outro sistema de isolamento viral pode sofrer mutação. Sendo assim, a variante viral detectada pode não representar aquela que ocorre no campo (BEAUDETTE, 1951; AMMAYAPPAN et al., 2009).

Neste trabalho além da coleta de amostras de traqueia, também foram realizadas coleta de rim e tonsila cecal, pois já existem publicações que comprovam que o vBIG infecta inicialmente o sistema respiratório superior e pode realizar sua replicação em

tecidos dos sistemas digestivos e genito-urinário e reprodutor (SCHALK; HAWN, 1931; GANAPATHY et al., 2012; TORRES et al., 2013; BALESTRIN et al., 2014).

Quanto aos resultados deste trabalho, a obtenção de sequências de S1 similares à sequência vacinal do sorotipo Mass é um achado frequente em estudos realizados no Brasil, em que mesmo após vacinação, é possível a ocorrência de sinais clínicos compatíveis com a doença (VILLARREAL et al., 2010; CHACÓN et al., 2011; FRAGA et al., 2013). Di Fábio et al. (2000) foram um dos primeiros autores que analisaram amostras das regiões Norte, Nordeste, Sul e Sudeste do Brasil, incluindo amostras provenientes de granjas do estado do RJ. As aves que tinham sido vacinadas com H120, após um tempo apresentaram sinais clínicos, somente respiratórios a princípio, e compatíveis com a doença, e nesta amostra analisada foi detectada similaridade ao sorotipo vacinal, com pouca variação, já no presente estudo, foram detectadas sequências de similaridade com sorotipo do tipo Mass, além de variantes BR, que vêm ocorrendo por todo território nacional (ABREU et al., 2010; FELIPPE et al., 2010; VILLARREAL et al., 2010; CHACON et al., 2011; BALESTRIN et al., 2012; FRAGA et al., 2013).

A respeito da semelhança de sequências coletadas a campo, tal qual foi realizado neste estudo, com de sorotipos vacinais, é necessário considerar alguns pontos essenciais, como: o RT-PCR não enseja a distinção entre a presença do RNA genômico e a ocorrência de transcrição de RNA mensageiro, que auxiliaria na confirmação do tecido coletado estar infectado de fato, ou se a presença do conteúdo viral fosse devido à viremia, pois assim que há a replicação viral no trato respiratório superior, com a presença do vírus no sangue, ocorre a disseminação do agente para outros tecidos, (CUNNINGHAM, 1975; DHINAKAR RAJ; JONES, 1997). Contudo, as aves que participaram deste estudo apresentavam sinais clínicos correspondentes a BIG, entretanto não é possível afirmar que todas as amostras positivas analisadas fossem correspondentes à ocorrência de processos patológicos correspondentes a este vírus em questão, no momento de coleta da ave.

Quanto à emergência de variantes virais, que são distintas dos sorotipos vacinais, a questão da pressão imunológica sob o vírus é bastante importante, pois o instinto de sobrevivência do agente irá acionar mecanismos de adaptação que podem gerar através de processos de deleção, recombinação e inserção, o surgimento de variantes, que podem ou não apresentar proteção-cruzada. Por meio da análise do percentual de identidade de aminoácidos nas sequências de S1, é possível verificar um indício de um isolado apresentar maior ou menor proteção cruzada comparada a cepa referência, caso esta, seja uma cepa vacinal, podendo sugerir sua eficácia; as amostras com percentual elevado, como encontrada nas amostras de Macaé e seis amostras de Vargem Alegre, (96,98% a 100%), podem apresentar níveis altos de proteção-cruzada, comparada a amostras com menor identidade (CAVANAGH et al., 1997; LANDMAN et al., 2006).

A vacinação como forma de prevenção, não vem sendo eficiente, promovendo pouca ou nenhuma proteção em lotes vacinados, com vacinas vivas atenuadas ou vírus morto. A própria formulação das vacinas, utilizando mais de um tipo antigênico, a fim de auxiliar na proteção das aves quando desafiadas com variantes virais, pode promover a incidência de novas variantes, através da pressão imunológica criada sobre o agente, oferecendo assim uma oportunidade de escape com adaptação ou mutação do vírus (GANDON, 2001; GANDON; DAY, 2008). Diversos trabalhos demonstram a pressão do sistema imune como um fator importantíssimo para a emergência de variantes virais. Toro et al., (2012) realizaram um trabalho experimental com dosagens variadas da vacina utilizada na região, tipo Arkansas (Ark), com inúmeras passagens em ovos

embrionados de aves imunocomprometidas; o resultado obtido foi uma variabilidade do vírus extraído destas amostras, que segundo este autor, devido a pressão de seleção imune, o agente necessita driblar as medidas de proteção do organismo para sobreviver, podendo utilizar mecanismos de deleção, inserção e recombinação para continuar a replicação viral e garantir a sobrevivência do vírus.

As vacinas vivas apresentam eficácia em controle de doenças virais, porém existe a possibilidade da ocorrência da doença por reversão da virulência nestas vacinas (HOPKINS; YODER, 1986; NIX et al., 2000). A vacina do sorotipo Mass, amostra Ma5, utilizada como sequência referência neste trabalho, foi introduzida no Brasil no início dos anos 90, com a promessa de proteger os lotes tanto contra variantes do sorotipo Mass quanto variantes brasileiras. Esta vacina é produzida por processo de purificação e clonagem biológica em cultura de células de embriões de galinhas livres de patógenos específicos (SPF - do inglês Specific Pathogen Free). Como uma vacina atual, a Ma5 tem reduzida taxa de ocorrência no Brasil, contudo, novos casos surgem no decorrer dos anos, como o encontrado nas granjas estudadas neste estudo. Apesar dos sinais clínicos compatíveis com BIG nas aves estudadas, é necessário salientar que há a possibilidade da ocorrência da doença por falha vacinal, baixa dose ou imunidade comprometida da ave no momento da inoculação (HOEER, 2010); ou até mesmo a ocorrência da BIG pela cepa do tipo Mass, contudo, existem outras doenças que podem acometer lotes industriais de aves, que possuem sinais clínicos bastante similares, como Newcastle, Laringotraqueíte e coriza infecciosa, sendo possível a confirmação, somente com diagnóstico diferencial (HIPÓLITO et al., 1979).

Quando se utiliza vacinas recombinantes, esta variabilidade gênica proporciona novos obstáculos ao vírus, entretanto, quando o vírus consegue se adaptar as mudanças ambientais a que esta sendo desafiado, ele pode infectar outros tecidos do hospedeiro, em busca de sobrevivência (JACKWOOD E SOMMER, 2002). Porém, também pode se levar em conta que a ampliação de genótipos virais em vacinas pode ser vantajoso para a proteção, já que haverá maior resposta antigênica, o que aumentaria a proteção do organismo desafiado a campo (NIX et al., 2000).

Em alguns trabalhos, é possível encontrar a estimativa de taxa de mutabilidade do vírus encontrada após utilização de vacinas recombinantes, as maiores taxas, que ficam em torno de 3×10^{-3} e $1,5 \times 10^{-2}$, são utilizando cepas modificadas, tipo 793/B VBIG (CAVANAGH et al., 1998) e tipo DE072 (LEE; JACKWOOD, 2001), respectivamente. As cepas do sorotipo Massachusetts, utilizadas como cepas vacinais por todo o mundo, inclusive no Brasil, é o único sorotipo utilizado em programas vacinais permitidos pelo Governo e tem uma taxa mutacional estimada em $1,9 \times 10^{-3}$ (MCKINLEY et al., 2011).

Os estudos acima citados, que demonstram a constante identificação de variantes distintos do sorotipo utilizado em programas vacinais, assim como, os resultados apresentados neste trabalho, em que foi verificado um percentual de identidade com variação de 72,41% a 100% nas 23 sequências obtidas através de alinhamento de nucleotídeos, confirmam estudos como de Toro et al (2012), que verifica que a evolução do vírus é gerada por pressão do sistema imune das aves. Também existem evidências de recombinação de sorotipo Mass vacinal com amostras a campo em condições naturais (LIU et al., 2013).

Por meio de comparações de sequências de amostras coletadas a campo e amostras vacinais como referência, de diferentes sorotipos, é possível realizar uma determinação antigênica com maior precisão (NIESTERS et al., 1986; CAVANAGH; DAVIS; MOCKETT, 1988). A glicoproteína S1 é responsável pelas respostas de

neutralização e produção de anticorpos específicos, portanto mudanças na sequência deste gene refletem diretamente na determinação do sorotipo e a produção do complexo antígeno-anticorpo (KWON, 1993), sendo assim, quaisquer alterações em S1 próximas do domínio de ligação do receptor podem modificar a afinidade dos coronavírus para diferentes glicoproteínas presentes em sua superfície (CAVANAGH et al., 1992; SCHULTZE et al., 2005). A ocorrência de modificações na sequência de aminoácidos localizadas nas duas regiões hipervariáveis RHV 1 (56-69) e RHV 2 (117-133), que coincidem com epítomos conformacionais de neutralização podem interferir na resposta vacinal, diminuindo sua eficácia, podendo até inativá-la. Os epítomos do vBIG são responsáveis pela organização dos antígenos (KUSTERS et al., 1989) e quando apresentam-se com sequências distintas das sequências utilizadas em vacinas, esta não consegue realizar a proteção por produzir anticorpos distintos aos antígenos que estão sendo introduzidos no organismo (LENZ, 2004).

As sequências variantes do sorotipo BR obtidas neste estudo apresentaram alterações nas RHV (Tabela 3) comparadas a cepa Ma5 que pertence ao sorotipo Massachusetts, podendo demonstrar uma modificação nos epítomos conformacionais gerando baixa proteção-cruzada quando vacinadas com vacinas do sorotipo Mass, lembrando que Ma5 é utilizada nas granjas do estado do Rio de Janeiro e possui uma maior identidade com as variantes virais detectadas em granjas do estado. Outro fator que pode significar baixa produção de imunidade cruzada é a baixa similaridade das sequências de aminoácidos (Figura 12) com a sequência Ma5 referência, pois segundo Landman et al., (2006), quando o percentual de identidade está menor ou igual a 74%, podem resultar em baixa proteção cruzada, o que é esperado nas amostras do sorotipo BR quando comparadas ao sorotipo Mass apresentadas neste estudo.

Foi possível analisar o agrupamento das sequências obtidas por meio da análise filogenética (figura 6) das amostras estudadas, comparando-as com sequências já publicadas no GenBank, que ressaltou a similaridade entre sequências pertencentes a linhagem 1, onde estão agrupadas as cepas do sorotipo Mass, e a linhagem 11, onde estão agrupados as variantes virais brasileiras do sorotipo BR-1. A ocorrência de genótipos variáveis em um mesmo estado, até mesmo dentro de uma mesorregião, como no caso da Sul-fluminense (Lidice, Vargem Alegre e Passa Três), demonstra a capacidade de disseminação do vírus no espaço geográfico em questão. Di Fábio et al (2000), quando analisaram amostras do RJ de sistema respiratório, somente foi encontrado variantes do sorotipo vacinal. Então, a ocorrência de variantes virais do sorotipo BR-1 (CHACÓN et al., 2011), confirma a evolução e distribuição deste sorotipo em um curto período no estado do RJ. As variantes de vBIG encontradas neste trabalho, assim como os *Coronavirus* em geral, podem ser considerados como *quasispecies*, pois se enquadra na teoria de genótipos da mesma família que coexistem em um ambiente de pressão seletiva, como ocorre com o uso das vacinas, por exemplo. Desta relação é esperada a emergência de variantes de fenótipos diferentes, que se adaptam as condições a que são submetidos, garantindo a sobrevivência de determinados genótipos da população viral (DOMINGO et al., 1985; NIX et al., 2000). A teoria dos *quasispecies* poderia elucidar melhor sobre o aparecimento de cepas que afetam outros sistemas além do sistema respiratório, como as encontradas em rim e tonsila cecal na presente pesquisa.

8.2 Alterações histopatológicas

O exame histopatológico auxilia na visualização dos efeitos deletérios do agente patogênico sobre o sistema orgânico, contudo, a BIG apresenta lesões histopatológicas comuns a doenças respiratórias, e não permite fechar diagnóstico por meio de lesões características apenas desta doença ou corpo de inclusão como ocorre na laringotraqueíte (PIROZOK et al. 1957, BAGUST; GUY, 1997; BELTRÃO et al., 2004), hepatite por adenovírus (METTIFOGO et al., 2014) e Bouda aviário (FLETCHER 2008; KUNERT-FILHO et al., 2016). Logo, os exames histopatológicos são importantes para verificar como as aves estão sendo acometidas pelo vírus, porém são poucos os trabalhos na literatura que realizam uma análise histopatológica mais completa, como se tentou realizar neste trabalho.

As amostras apresentaram lesões compatíveis a diversas descrições de alterações histopatológicas, as alterações de traqueia foram mais predominantes, sendo possível verificar uma traqueíte aguda nos animais, as alterações foram perda de cílios, edema, hiperplasia de células caliciformes, desprendimento de células epiteliais e infiltração de células mononucleares (PURCELL et al., 1976; TORO et al., 1996; BANDE et al., 2016); Nos rins, as lesões foram variáveis quanto a visualização em lâmina, contudo, algumas lesões encontradas neste trabalho foram compatíveis com lesões encontradas na literatura, tais como: necrose epitelial, com picnose em túbulos e ductos, degeneração renal, infiltração de células inflamatórias, degeneração vacuolar (PURCELL et al., 1976; TORO et al., 1996; BANDE et al., 2016). Não foi encontrada na literatura descrição sobre lesões em tonsila cecal, porém, em Purcell et al. (1976) há descrições de aparecimento de figuras mitóticas nos tecidos lesados de aves positivas para BIG, compatível com o achado histopatológico encontrada em tonsilas cecais da granja de Passa três.

9. CONCLUSÃO

- A RT-qPCR utilizada nesse trabalho é uma excelente ferramenta para detecção molecular do vBIG a partir de tecidos da traqueia, rim e intestino
- As amostras virais detectadas por RT-nPCR diretamente dos tecidos da traqueia, rim e intestino apresentaram alta variabilidade do gene S1 do vBIG em relação a cepa vacinal Ma5.
- Nas condições do presente estudo ocorreram diferentes sorotipos virais do vBIG em uma mesma granja e até mesmo em diferentes tecidos de uma mesma ave.
- Nas duas mesorregiões estudadas, em granjas de frangos de corte e galinhas de postura ocorre o genótipo I e as linhagens virais 1, onde estão agrupadas as cepas pertencentes ao sorotipo Massachusetts e a linhagem 11 onde estão agrupadas as variantes virais brasileiras pertencentes ao sorotipo BR.
- A identificação gênica torna-se uma ferramenta de suma importância para elaboração da vigilância epidemiológica da doença, auxiliando na adaptação do protocolo vacinal à variante que possa estar ocorrendo.

10. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O Brasil como sendo um dos principais produtores e exportadores de carne de frango do mundo sempre terá sua preocupação quanto a prevenção de doenças em granjas avícolas. A constante emergência de linhagens de VBIg variantes da cepa vacinal Mass e variantes de cepas emergentes no país, como no caso das cepas BR, é um importante dado a ser analisado. Para haver uma eficácia na prevenção é necessário que haja uma proteção cruzada entre as linhagens encontradas com as cepas utilizadas em vacinas, porém esta é uma realidade diferente da que ocorre nos dias de hoje.

A classificação genotípica é importante para analisar a ocorrência de novos sorotipos virais, o sequenciamento focado no gene S1 é o mais utilizado devido as atribuições biológicas desta porção do vírus, que auxilia na classificação da linhagem das cepas encontradas a campo e sua distribuição, porém muitos trabalhos poderiam ter maior consistência e resultados mais amplos caso outras tecnologias fossem utilizadas, como por exemplo o sequenciamento de alta profundidade, que permitiria a análise do RNA, sem necessidade da limitação de selecionar fragmentos, como os realizados utilizando fragmentos de S1. No entanto, com a metodologia utilizada neste trabalho foi possível encontrar uma variabilidade ampla em amostras obtidas de aves naturalmente infectadas em granjas do Rio de Janeiro, e sendo um experimento a campo, os resultados obtidos foram bastante satisfatórios visando ser um mecanismo auxiliador da vigilância vacinal do estado do Rio de Janeiro. São necessários muitos estudos acerca deste tema, pois é um agente que traz muitos prejuízos a produção avícola. Contudo, é necessário ampliar nosso conhecimento com utilização de metodologias mais recentes, como o sequenciamento em larga escala (RNA-Seq) visando aprofundar o nosso conhecimento sobre a variabilidade genética do coronavírus aviário com o objetivo de desenvolver ferramentas capazes de prevenir de forma eficaz as aves em diferentes sistemas de criação.

11. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABREU, J.; MOURÃO, M.; SANTOS, C.; VELOSO, C.; RESENDE, J.; FLATSCHAR, R.; FOLGERAS-FLATSCHART, A.; JÚNIOR, S.; SANTORO, M.; MENDES, A.; FRANCO, G.; SILVA, A.; CAMPOS, A.; FERNANDEZ, S. Molecular studies of the Brazilian infectious bronchitis virus isolates. **Brazilian Journal of Poultry Science**, v. 12, n. 2, p. 107–110, 2010.

ALBINO, L.F.T.; TAVERNARI, F.C. **Produção e manejo de frangos de corte**. Viçosa: UFV, 2008.

ALDOUS, E.W., MYNN, J.K., BANKS, J., ALEXANDER, D.J., 2003. A molecular epidemiological study of avian paramyxovirus type 1 (Newcastle disease virus) isolates by phylogenetic analysis of a partial nucleotide sequence of the fusion protein gene. **Avian Pathol.** v. 32, n. 3, p. 239–256, 2003.

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

AMBALI, A.G. Recent studies on the enterotropic strain of avian Infectious bronchitis virus. **Veterinary Research Communications.** v.16, p.153-157, 1992.

BRANDÃO, P.E., LOVATO, L.T., SLHESSARENKO, R.D. Coronaviridae. In: FLORES, E. F. **Virologia Veterinária**. 2. Ed. Santa Maria. Editora da UFSM, 2012.

AMMAYAPPAN A, UPADHYAY C, GELB J, VAKHARIA V. Complete genomic sequence analysis of infectious bronchitis virus Ark DPI strain and its evolution by recombination. **Virol J**, v.5, p. 157, 2008.

AMMAYAPPAN, A.; UPADHYAY, C.; GELB JR., J.; VAKHARIA, V.N. Identification of sequence changes responsible for the attenuation of avian infectious bronchitis virus strain Arkansas DPI. **Arch. Virol.** v.154, n.3, p.495-499, 2009.

ARASHIRO, O. A história da avicultura do Brasil. Gessulli Editores Ltda., 1989. História econômica do Brasil, Caio Prado Júnior, Editora Brasiliense, 37ª edição, 1976. BNDES, 50 anos de desenvolvimento, versão online, 2002.

ARMESTO, M.; CAVANAGH, D.; BRITTON, P. The replicase gene of avian coronavirus infectious bronchitis virus is a determinant of pathogenicity. **PLoS One**, v.4, n.10, p.1-11, 2009.

BAGUST, T.J. & GUY J.S. Laryngotracheitis, p.527-539. In: Calnek B.W., Barnes H.J., Beard C.W., McDougald L.R. & Saif Y.M. (ed.) **Diseases of Poultry**. v. 10. Iowa State University Press, Ames, 1997.

BALESTRIN, E.; FRAGA, A. P.; IKUTA, N.; CANAL, C. W.; FONSECA, S. K.; LUNGE, V. R. Infectious bronchitis virus in different avian physiological systems — A field study in Brazilian poultry flocks. **Poultry Science**, v. 93, p. 1922–1929, 2012.

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

BANDE, F., ARSHAD, S.S., OMAR, A.R., BEJO, M.H., ABUBAKAR, M.S., ABBA, Y. Review Article Pathogenesis and Diagnostic Approaches of Avian Infectious Bronchitis. **Advances in Virology**. 2016.

BEAUDETTE, F.R. Infectious bronchitis and New Castle disease. **Can. J. Comp. Med.** V. 15, p. 67-71, 1951.

BELTRÃO N., FURIAN T.Q., LEÃO J.A., PEREIRA R.A., MORAES L.B., CANAL C.W. Detection of infectious laryngotracheitis virus in chickens in Brazil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 24, n. 2, p. 85-88, 2004.

BOURSNELL, M. E. G. et al. Completion of the sequences of the genome of the coronavirus avian infectious bronchitis virus. **J. Gen. Virol., Reading**, v.68, n.1, p.57-77, 1987.

BOROOMAND, Z., ASASI, K., MOHAMMADI, A. Pathogenesis and tissue distribution of avian infectious bronchitis virus isolate IRFVBIG32 (793/B serotype) in experimentally infected broiler chickens, **The ScientificWorld Journal**, 2012.

BRIAN, D.A., BARIC, R.S. Coronavirus genome structure and replication. **Curr Top Microbiol Immunol.** V. 287, p. 1-30, 2005.

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 Virological Methods**. v.138, p.60-65, 2006.

CANEVER, M.D. et al. **A cadeia produtiva de frango de corte no Brasil e na Argentina**. Concórdia: EMBRAPA-CNPSA, 1997.

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

CAPUA, I., MINTA, Z., KARPINSKA, E., et al., “Co-circulation of four types of infectious bronchitis virus (793/B, 624/I, B1648 and Massachusetts),” **Avian Pathology**, v. 28, n. 6, p. 587–592, 1999.

CAVANAGH, D. Coronavirus VBIG: structural characterization of the spike protein. **J. Gen. Virol.** V. 64, p. 2577–2583. 1983.

CAVANAGH, D. Severe acute respiratory syndrome vaccine development: experiences of vaccination against avian infectious bronchitis coronavirus. **Avian Pathology**, v.32, n.6, p.567- 582, 2003.

CAVANAGH, D. Nidovirales: a new order comprising Coronaviridae and Arteriviridae. **Archives of Virology**, v. 142, p. 629-633, 1997.

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

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

CAVANAGH, D., MAWDITT, K., BRITTON, P., NAYLOR, C.Y. Longitudinal field studies of infectious bronchitis virus and avian pneumovirus in broilers using type-specific polymerase chain reactions. **J. Avian Pathology**, v. 28, n. 6, p.593-605, 1999.

CAVANAGH, D., MAWDITT, K., ADZHAR, A., GOUGH, R.E., PICAULT, J.P., NAYLOR, C.J., HAYDON, D., SHAW, K., BRITTON, P., Does VBIG change slowly despite the capacity of the spike protein to vary greatly. **Adv. Exp. Med. Biol.** v. 440, p. 729–734, 1998.

CAVANAGH, D.; GELB, J. INFECTIOUS BRONCHITIS. IN: SAIF, Y.M.; FADLY, A.M.; GLISSON, J.R; MCDOUGALD, L.R.; NOLAN, L.K.; SWAYNE, D.E. **Diseases of Poultry**. 12th ed. Ames, IA, Blackwell Publishing, Ames, Iowa. p.117-135, 2008.

CHACÓN, J. L., J. N. RODRIGUES, M. S. ASSAYAG JR., C. PELOSO, A. C. PEDROSO, AND A. J. P. FERREIRA. Epidemiological survey and molecular characterization of avian infectious bronchitis virus in Brazil between 2003 and 2009. **Avian Pathol.** v.40, p. 153–162, 2011.

CHAMORRO, C.C. **Genetic diversity of avian coronavirus infectious bronchitis detected from commercial poultry in Brazil.** 38 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, São Paulo, 2015.

CHOUSALKAR, K.K., ROBERTS, J.R. Ultrastructural study of infectious bronchitis virus infection in infundibulum and magnum of commercial laying hens,” **Veterinary Microbiology**, vol. 122, n.. 3-4, p. 223–236, 2007.

CONG F., LIU X., HAN Z., SHAO Y., KONG X., LIU S. Transcriptome analysis of chicken kidney tissues following coronavirus avian infectious bronchitis virus infection. **BMC Genomics**, v. 4, p. 743. 2013.

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.477-85, 1999.

COOK, J.K., JACKWOOD, M.W., JONES, R.C. The long view: 40 years of infectious bronchitis research, **Avian Pathology**, v. 41, n. 3, p. 239-250, 2012.

DALLA COSTA, A., SHIMA, W.T. Tecnologia e competitividade do trabalho na avicultura brasileira. **Economia & Tecnologia** - Ano 03, Vol. 08 2007.

DASZAK, P., EATON, B.T., ZHANG, S., WANG, L.F. Bats are natural reservoirs of SARS-like coronaviruses. **Science**, v. 310, p. 676–679, 2005.

DE ALMEIDA, R.S., HAMMOUMI, S., GIL, P., BRIAND, F.X., MOLIA, S., GAIDET, N., CAPPELLE, J., CHEVALIER, V., BALANÇA, G., TRAORÉ, A., GRILLET, C., MAMINIAINA, O.F., GUENDOOUZ, S., DAKOUO, M., SAMAKÉ, K., BEZEID OEL, M., DIARRA, A., CHAKA, H., GOUTARD, F., THOMPSON, P., MARTINEZ, D., JESTIN, V., ALBINA, E., New avian paramyxoviruses type I strains identified in Africa provide new outcomes for phylogeny reconstruction and genotype classification. **PLoS ONE** v. 8, n. 10, 2013.

DE GROOT R. J. , BAKER S. C., BARIC R. , ENJUANES L. , GORBALENYA A. E. , HOLMES K. V., PERLMAN S., POON L., ROTTIER P. J. M. et al. Family Coronaviridae . In **Virus Taxonomy, Classification and Nomenclature of Viruses, Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses**, p.. 806–828, 2012.

DE WIT, J.J.; NIEUWENHUISEN-VAN WILGEN, J.; HOOGKAMER, A.; VAN DE SANDE, H.; ZUIDAM, G.J.; FABRI, T.H. Induction of cystic oviducts and protection

against early challenge with infectious bronchitis virus serotype D388 (genotype QX) by maternally derived antibodies and by early vaccination. **Avian Pathology**, v.40, p.463-471, 2011.

DE WIT. J.J. Technical Review: Detection of infectious bronchitis virus. **Avian Pathology**. v.29, n.2, p.71-93, 2000.

DI FABIO, J.; ROSSINI, L.I.; ORBELL, S.J.; PAUL, G.; HUGGINS, M.B.; MALO, A.; SILVA, B.G.M.; Cook, J.K.A. Characterization of infectious bronchitis viruses isolated from outbreaks of disease in commercial flocks in Brazil. **Avian Diseases**, v. 44, n.3, p. 582-589, 2000.

DI FÁBIO, J., BUITRAGO, L.Y.B. Bronquite infecciosa das galinhas. in Doenças das aves, 2nd ed. A. Berchieri Jr, E. N. Silva, J. Di Fábio, L. Sesti, and M. A. F. Zuanaze, ed. **Facta, Campinas, Brasil**, p. 631-648, 2009.

DI FÁBIO, J.; VILLARREAL, L. Y. B. Bronquite Infecciosa das Galinhas. In: BERCHIERI JR., A.; SILVA, E. N.; DI FÁBIO, J.; SESTI, L.; ZUANAZE, M. A. F. Doença das aves. 2. ed. Campinas: **Fundação APINCO de Ciência e Tecnologia Avícolas**, p. 631-648, 2009.

DOMINGO E, MARTÍNEZ-SALAS E, SOBRINO F, DE LA TORRE JC, PORTELA A, ORTÍN J, LÓPEZ-GALINDEZ C, PÉREZ-BREÑA P, VILLANUEVA N, NÁJERA R. The quasispecies (extremely heterogeneous) nature of viral RNA genome population; biological relevance-a review. **Gene**, v. 40, p. 1-8, 1985.

DHINAKAR RAJ, G.; JONES, R. C. Infectious bronchitis virus: immunopathogenesis of infection in the chicken. **Avian Pathology**, v. 26, n. 3, p. 677-706, 1997.

ESPÍNDOLA, C.J. Trajetórias do progresso técnico na cadeia produtiva de carne de frango do Brasil. **Revista Geosul**, v. 27, n. 53, p. 89-113, 2012.

FANG, S.G., SHEN, S., TAY, F.P.L., LIU, D.X. Selection of and recombination between minor variants lead to the adaptation of an avian coronavirus to primate cells. **Biochem Biophys Res Commun**. v. 336, n. 2, p. 417-423, 2005.

FELIPPE, P. A. N., L. H. A. SILVA, M. M. A. B. SANTOS, F. R. SPILKI, AND C. W. ARNS. Genetic diversity of avian infectious bronchitis virus isolated from domestic chicken flocks and coronaviruses from feral pigeons in Brazil between 2003 and 2009. **Avian Dis**. n.54, p.1191-1196. 2010.

FERNANDO, F.S. **Avaliação da patogenicidade e da imunidade cruzada de estirpe variante do vírus da bronquite infecciosa aviária isolada no Brasil**. 111 f.

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

Fletcher, O.J. **Avian Histopathology**. 3rd ed. North Carolina: American Association of Avian Pathologist, 2008.

FRAGA, A.P.; BALESTRIN, E.; IKUTA, N.; FONSECA, A.S.K.; SPILKI, F.R.; CANAL, C.W.; LUNGE, V.R. Emergence of a new genotype of avian infectious bronchitis virus in Brazil. **Avian Diseases**, v.57, n.2, p.225-232, 2013.

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

FRANÇA, L.R. **A evolução da base técnica da avicultura de corte no Brasil: transformações, determinantes e impactos**. Dissertação (Mestrado em Desenvolvimento Econômico) – Instituto de Economia, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia; pag.141; 2000.

GALLARDO, R.A.; HOERR, F.J.; BERRY, W.D.; VAN SANTEN, V.L.; TORO, H. Infectious bronchitis virus in testicles and venereal transmission. **Avian Diseases**. v.55, n.2, p.255-258, 2011.

GANAPATHY, K.; WILKINS, M.; FORRESTER, A.; LEMIERE, S.; CSEREP, T.; MCMULLIN, P.; JONES, R. C. QX-like infectious bronchitis virus isolated from proventriculitis in commercial broilers in England. **Veterinary Record**, v. 171, p. 597, 2012.

GANDON, S., DAY, T., Evidences of parasite evolution after vaccination. **Vaccine** 26 (Suppl. 3), C4–7, 2008.

GANDON, S., MACKINNON, M.J., NEE, S., READ, A.F., Imperfect vaccines and the evolution of pathogen virulence. **Nature**, v. 414, p. 751–756, 2001.

GELB JRJ, WEISMAN Y, LADMAN BS, MEIR R. S1 gene characteristics and efficacy of vaccination against infectious bronchitis virus field isolates from the United States and Israel (1996 to 2000). **Avian Pathology**, v.34, p. 194-203, 2005.

GUY, J. S. Isolation and propagation of coronaviruses in embryonated eggs. **Methods in Molecular Biology**, v. 454, p. 109–17, 2008.

HIPÓLITO, O., SILVA, J.L.M, HSIUNG, H.M., ITO, N.M.K. **Bronquite infecciosa das galinhas: a doença no Brasil**. Trabalho agraciado com o III Prêmio Dow de Veterinária, 72p, 1979.

HOERR, F.J. Clinical aspects of immunosuppression in poultry. **Avian Dis.**, v.54, p.2-15, 2010.

HOPKINS, S.R.; YODER JR, H.W. Increased incidence of airsacculitis in broilers infected with *Mycoplasma synoviae* and chicken-passaged infectious bronchitis vaccine virus. **Avian Diseases**, v.28, p.386-396, 1984.

INOUE, A.Y., CASTRO, A.G.M. Fisiopatologia do Sistema Respiratório. In: BERCHIERI JÚNIOR, A., SILVA, E.N., DI FÁBIO, J., SESTI, L., ZUANAZE, M.A.F. **Doenças das Aves**. 2.ed. Campinas: **FACTA**, 2009.

INTERNATIONAL COMMITTEE ON TAXONOMY OF VIRUSES (ICTV), 2012. In: King, A.M.Q., Adams, M.J., Carstens, E.B., Lefkowitz, E.J. (Eds.), **Virus Taxonomy: Classification and Nomenclature of Viruses: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses**. Elsevier Academic Press, San Diego, CA (<http://www.ictvonline.org/virustaxonomy.asp>).

JACKWOOD, M.W. Review of infectious bronchitis virus around the world. **Avian Dis.** V. 56, n. 4, p. 634–641, 2012.

JACKWOOD, M.W., HALL, D., HANDEL, A. Molecular evolution and emergence of avian gammacoronaviruses. **Infect Genet Evol.** v. 12, p. 1305–1311, 2012,

JACKWOOD MW, ROSENBLOOM R, PETTERUTI M, HILT DA, MCCALL AW, WILLIAMS SM. Avian coronavirus infectious bronchitis virus susceptibility to botanical oleoresins and essential oils in vitro and in vivo. **Virus Res.** V. 149, n. 1, p. 86-94, 2010.

JACKWOOD, D.J.; SOMMER, S.E. Identification of infectious bursal disease virus quasispecies in commercial vaccines and field isolates of this double-stranded RNA virus. **Virology**, n.304, p.105-113, 2002.

JUNGHERR, E. L. et al. Immunological differences in strains of infectious bronchitis virus. **Proceedings of the 60th U.S Livestock Sanitary Association**, p.203-209, 1956.

KEELER, C.L. JR., REED, K.L., NIX, W.A., GELB, J.JR. Serotype identification of avian infectious bronchitis virus by RT-PCR of the peplomer (S-1) gene. **Avian Dis** v. 42, p. 275–284, 1998.

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

KULIWABA, J. S.; FAZZALARI, N. L.; FINDLAY, D. Stability of RNA isolated from human trabecular bone at post-mortem and surgery. **Biochimica et Biophysica ACTA Molecular Basis of Disease**, v. 1740, n. 1, p. 1–11, 2005.

KUNERT-FILHO H.C., CIBULSKI S.P., FINKLER F., GRASSOTTI T.T., JAENISCH F.R.F., BRITO, K.C.T., CARVALHO D., LOVATO M., BRITO B.G. First phylogenetic analysis of Avipoxvirus (APV) in Brazil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 36, n. 5, p. 357-362, 2016.

KUSTERS, J.G., NIESTERS, H.G.M.; BLEUMINK-PLUYM, N.; DAVELAAR, F.G.; HORZINEK, M.C.; VAN DER ZEIJST, B.A.M. Molecular epidemiology of infectious bronchitis virus in the Netherlands. **J. Gen. Virol.**, v.68, p.343, 1987.

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

KWON, H.M., JACKWOOD, M.W., GELB, J.JR. Differentiation of infectious bronchitis virus serotypes using polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism analysis. **Avian Dis**, v. 37, p. 194–202, 1993.

LADMAN, B. S.; LOUPOS, A. B.; GELB JR., J. Infectious bronchitis virus S1 gene sequence comparison is a better predictor of challenge of immunity in chickens than serotyping by virus neutralization. **Avian Pathology**, v. 35, p. 127-133, 2006.

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

LEE, C.W., HILT, D.A., JACKWOOD, M.W. Typing of field isolates of infectious bronchitis virus based on the sequence of the hypervariable region in the S1 gene. **J. Vet. Diagn. Investig.** V. 15, n. 4, p. 344–348, 2003.

LEE, C.W., JACKWOOD, M.W. Origin and evolution of Georgia 98 (GA98), a new serotype of avian infectious bronchitis virus. **Virus Res.** v.80, n. 1–2, p. 33–39, 2001.

LENZ, G. Métodos Imunológicos. **Biofísica**, 2004

LIMA, E.T. Bronquite Infecciosa das Galinhas. In: ANDREATTI FILHO, R.L. **Saúde Aviária e Doenças**. São Paulo: Roca, 2007.

LIU, X.; SHAO, Y.; MA, H.; SUN, C.; ZHANG, X.; LI, C.; HAN, Z.; YAN, B.; KONG, X.; LIU, S. Comparative analysis of four Massachusetts type infectious bronchitis coronavirus genomes reveals a novel Massachusetts type strain and evidence of natural recombination in the genome. **Infection, Genetics and Evolution**, v.14, p.29-38, 2013.

MACLACHLAN, N. J., DUBOVI, E.J. Coronaviridae. in Fenner's **Veterinary Virology**. v. 4, p. 393–413, 2011.

MASTERS P.S., PERLMAN S. **Coronaviridae**. In *Fields Virology*, 6th edn, pp. 825–854. Edited by Knipe D. M., Howley P. M., Cohen J. I., Griffin D. E., Lamb R. A., Martin M. A., Racaniello V. R., Roizman B., editors. Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins, 2013.

MCKINLEY, E.T., JACKWOOD, M.W., HILT, D.A., KISSINGER, J.C., ROBERTSON, J.S., LEMKE, C., PATERSON, A.H. Attenuated live vaccine usage affects accurate measures of virus diversity and mutation rates in avian coronavirus infectious bronchitis virus. **Virus Res**. v. 158, p. 225–234, 2011.

MEIR, R., MAHARAT, O., FARNUSHI, Y., SIMANOV, L. Development of a real-time TaqMan® RT-PCR assay for the detection of infectious bronchitis virus in chickens, and comparison of RT-PCR and virus isolation. **Journal of Virological Methods**. v.163, n.2, p.190-194, 2010.

METTIFOGO, E., L. F. NUNEZ, J. L. CHACÓN,S.H., SANTANDER PARRA, C. S. ASTOLFI-FERREIRA, J. A., JEREZ, R. C. JONES, A. J., PIANTINO FERREIRA. Emergence of enteric viruses in production chickens is a concern for avian health. **Sci. World J**. 2014.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO – MAPA. *Brasil Projeções do Agronegócio 2011/12 a 2021/22*. Brasília, 2012, 50 p. Disponível em: < <http://www.agricultura.gov.br>>. Acesso em: agosto de 2016

MO, M., HUANG, B., WEI, P., WEI, T., CHEN, Q., WANG, X., LI, M., FAN, W. Complete genome sequences of two chinese virulent avian coronavirus infectious bronchitis virus variants. **J Virol**. v.86, n.19, p.10903-10904, 2012.

MONTASSIER, H.J. Molecular epidemiology and evolution of avian infectious bronchitis virus. **Brazilian Journal of Poultry Science**. v.12, n.2, p.87-96, 2010.

NAKAMURA, K., COOK, J.K.A., OTSUKI, K., HUGGINS, M.B., FRAZIER, J.A. Comparative study of respiratory lesions in two chicken lines of different susceptibility ,

infected with infectious bronchitis virus: histology, ultrastructure and immunochemistry. **Avian Pathology**, v.20, p.245-261, 1991.

NAVAS, S., SEO, S.H., CHUA, M.M., SARMA, J. D., LAVI, E., HINGLEY, S.T., WEISS, S.R. Murine coronavirus spike protein determines the ability of the virus to replicate in the liver and cause hepatitis. **J. Virol.** V. 75, p. 2452–2457, 2001.

NEUMAN, B.W., ANGELINI, M.M., BUCHMEIER, M.J. Review Does form meet function in the coronavirus replicative organelle. **Trends in Microbiology.** V. 22, n. 11, p. 642–647, 2014.

NIX, W.A.; TROEBER, D.S.; KINGHAM, B.F.; KEELER, C.L.JR; GELB, J.JR. Emergence of subtype strains of the Arkansas serotype of infectious bronchitis virus in Delmarva broiler chickens. *Avian Diseases*, v.44, n.3, p.568-581, 2000.

OIE - Organização Mundial da Saúde Animal. Avian Infectious Bronchitis, Version adopted by the World Assembly of Delegates of the OIE in May 2013. Chapter 2.3.2. Disponível em: http://www.oie.int/fileadmin/Home/fr/Health_standards/tahm/2.03_02_AIB.pdf visitado em: 02/11/2016

OKINO, C.H. **Desenvolvimento da Técnica de RT-PCR em tempo real para detecção e diferenciação de estirpes do vírus da bronquite infecciosa das galinhas.** 104f. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2007.

OLIVEIRA, D.R.M.S. & NÄÄS, I.A. Issues of sustainability on the Brazilian broiler meat production chain. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ADVANCES IN PRODUCTION MANAGEMENT SYSTEMS, 2012, Rhodes. **Anais...Competitive Manufacturing for Innovative Products and Services: proceedings, Greece: InternacionaI Federation for Information Processing, 2012.**

PATTERSON, S., BINGHAM, R.W. Electron microscope observations on the entry of avian infectious bronchitis virus into susceptible cells. **Archives of Virology**, v. 52, n. 3, p. 191 – 200, 1976.

PEREIRA, C.G. **Caracterização biológica e molecular de estirpes vacinais e isolados de campo de Infectious bronchitis virus.** 87f. Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa, MG, 2015.

PEREIRA, C.G., SARAIVA, G.L., VIDIGAL, P.M.P., FIETTO., BRESSAN, G.C., MOREIRA, M.A.S., ALMEIDA, M.R., J.L., JUNIOR, A.S., Distribution of infectious bronchitis virus strains in different organs and evidence of vertical transmission in natural infection. **Arch Virol**, v. 161, p. 3355–3363, 2016.

PERLMAN, S., NETLAND, J. Coronaviruses post-SARS: update on replication and pathogenesis. **Nat Rev Microbiol.** v.7, n. 6, p. 439-50, 2009.

PIROZOK R.P., HELMBOLT C.F., JUNGHER E.L. A rapid histological technique for the diagnosis of infectious avian laryngotracheitis. **J. Am. Vet. Med. Assoc.** v. 103, p. 406-407, 1957.

PHILLIPS, J.E.; JACKWOOD, M.W.; MCKINLEY, E.T.; THOR, S.W.; HILT, D.A.; ACEVEDOL, 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**, v.44, n.1, p.63-74, 2012.

PURCELL, D.A., MCFERRAN, J.B. 'The histopathology of infectious bronchitis in the domestic fowl', **Research in Veterinary Science**, v. 13, p. 116–122, 1972.

QUEVEDO, A. A história da avicultura brasileira. baseada na obra A História do Agribusiness Brasileiro, de Rogério Furtado. Disponível em: <http://www.aviculturaindustrial.com.br/imprensa/a-historia-da-aviculturabrasileira/2003-0520-151203-0539> - acesso em: 12/12/2016.

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.** 163p. Tese (Doutorado) - Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2003.

RIMONDI, A., M. I. CRAIG, A. VAGNOZZI, G. KOENIG, M. DELAMER, AND A. PEREDA. Molecular characterization of avian infectious bronchitis virus strain from outbreaks in Argentina (2001–2008). **Avian Pathol.** n.38, p.149–153. 2009.

SANTOS, S., **Caracterização e comparação molecular de estirpes de referência e de campo do vírus da bronquite infecciosa das galinhas.** 2012. 63 f. Tese (Mestre em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade de São Paulo. 2012

SILVA, E. N. Infectious bronchitis in Brazilian chickens: current data and observations of field service personnel. **Rev. Bras. Cienc. Avic.** n. 12, p.197–203. 2010.

SCHALK, A. F.; HAWN, M. C.; DAK, F. N. An apparently new respiratory disease of baby chicks. *Journal of the American Veterinary Medicine Association*, v.78. p.413-423. 1931.

TORRES, C. A.; VILLARREAL, L. Y. B.; AYRES, G. R. R.; RICHTZENHAIN, L. J.; BRANDA, P. E. An avian coronavirus in quail with respiratory and reproductive signs. **Avian Diseases**, v. 57, p. 295–299, 2013.

TORO, H., GODOY, V., LARENAS, J., REYES, E., KALETA, E.F. Avian infectious bronchitis: viral persistence in the harderian gland and histological changes after eyedrop vaccination,” **Avian Diseases**, v. 40, n. 1, p. 114–120, 1996.

TORO, H.; VAN SANTEN, V.L.; JACKWOOD, M.W. Genetic diversity and selection regulates evolution of infectious bronchitis Virus. **Avian Diseases**, v.56, n.3, p.449-455, 2012.

UBABEF .The saga of the Brazilian poultry industry: how Brazil has become the world’s largest exporter of chicken meat = A saga da avicultura brasileira : como o Brasil se tornou o maior exportador mundial de carne de frango / [coordenação Sergio Costa ; tradução Vice Versa Tradução Escrita e Interpretação]. - Rio de Janeiro : Insight ; São Paulo : UBABEF , 120p. 2011

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. **Infect Genet Evol**, v. 39, p. 349–364, 2016.

VIEIRA, N.M. & DIAS, R.S. Uma abordagem sistêmica da avicultura de corte na economia brasileira. In: CONGRESSO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ECONOMIA E SOCIEDADE RURAL, 43, 2005, Ribeirão Preto. **Anais...** Ribeirão Preto: SOBER, 2005.

VILLARREAL, L. Y. B., P. E. BRANDA, J. L. CHACO, A. B. S. SAIDENBERG, M. S. ASSAYAG, R. C. JONES, AND A. J. P. FERREIRA. Molecular characterization of infectious bronchitis virus strains isolated from the enteric contents of Brazilian laying hens and broilers. **Avian Dis.** n. 51, p. 974–978. 2007.

VILLARREAL, L.Y.B. Diagnosis of Infectious Bronchitis: An Overview of Concepts And Tools. **Brazilian Journal of Poultry Science.** v.12, n.2, p.111-114, 2010.

VILLARREAL, L.Y.B.; SANDRI, T.L.; SOUZA, S.P.; RICHTZENHAIN, L.J. DE WIT, J.J.; BRANDAO, P.E. Molecular epidemiology of avian infectious bronchitis in Brazil from 2007 to 2008 in breeders, broilers, and layers. **Avian dis.**, v. 54, p.894–898, 2010.

WINTERFIELD, R.W., HITCHNER, S. B. Etiology of an infectious nephritis-nephrosis syndrome of chickens. **American Journal of Veterinary Research**, vol. 23, pp. 1273–1279, 1962.

WHO. Emergencies preparedness, response Severe Acute Respiratory Syndrome (SARS). Disponível em: < <http://www.who.int/csr/sars/en/>>. Acesso em 29/12/2016.

WOO P.C.Y., LAU S.K.P., LAM C.S.F., LAU C.C.Y., TSANG A.K.L., LAU J.H.N., BAI R., TENG J.L.L., TSANG C.C.C., WANG M., ZENG B.-J., CHAN K.-H. & YUEN K.-Y. Discovery of seven novel mammalian and avian coronaviruses in the genus Deltacoronavirus supports Bat coronaviruses as the gene source of Alphacoronavirus and Betacoronavirus and avian coronaviruses as the gene source of Gammacoronavirus and Deltacoronavirus. **J. Virol.**, v. 86, p. 3995–4008, 2012.

ZHAO Y., CHENG J. L., LIU X. Y., ZHAO J., HU Y. X., ZHANG G. Z. Safety and efficacy of an attenuated Chinese QX-like infectious bronchitis virus strain as a candidate vaccine. **Vet. Microbiol.** v. 180, p. 49–58, 2015.

ZIEBUHR, J. The coronavirus replicase. *Curr Top Microbiol Immunol.* V. 287, p. 57-94, 2005.