RUY DIEGO CHACÓN VILLANUEVA

Desenvolvimento de reações de semi-*nested* PCR para o diagnóstico do vírus da Bronquite Infecciosa das Aves e sequenciamento de amostras brasileiras

São Paulo
2018

RUY DIEGO CHACÓN VILLANUEVA

Desenvolvimento de reações de semi-*nested* PCR para o diagnóstico do vírus da Bronquite Infecciosa das Aves e sequenciamento de amostras brasileiras

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental e Comparada da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Ciências

Departamento:

Patologia

Área de concentração:

Patologia Experimental e Comparada

Orientador:

Prof. Dr. Antonio José Piantino Ferreira

São Paulo

2018

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T. 3605
FMVZ

Chacón Villanueva, Ruy Diego
Desenvolvimento de reações de semi-nested PCR para o diagnóstico do vírus da Bronquite Infecciosa das Aves e sequenciamento de amostras brasileiras / Ruy Diego Chacón Villanueva. – 2018.
90 f. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Patologia, São Paulo, 2018.

Programa de Pós-Graduação: Patologia Experimental e Comparada.

Área de concentração: Patologia Experimental e Comparada.

Orientador: Prof. Dr. Antonio José Piantino Ferreira.

1. Bronquite Infecciosa das Aves. 2. BR-I. 3. Massachusetts. 4. Proteína da espícula. 5. Semi-Nested PCR. I. Título.

Ficha catalográfica elaborada pela bibliotecária Camila Molgara Gamba, CRB 7070-8, da FMVZ/USP.

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA E DIAGNÓSTICO MOLECULAR DO VÍRUS DA BRONQUITE INFECCIOSA ISOLADO DE AVES DE PRODUÇÃO", protocolada sob o CEUA nº 5916141217, sob a responsabilidade de **Antonio José Piantino Ferreira** *e equipe; Ruy Diego Chacón Villanueva* - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (CEUA/FMVZ) na reunião de 22/01/2018.

We certify that the proposal "GENETIC CHARACTERIZATION AND MOLECULAR DIAGNOSIS OF INFECTIOUS BRONCHITIS VIRUS ISOLATED FROM POULTRY", utilizing 600 Birds (males and females), protocol number CEUA 5916141217, under the responsibility of **Antonio José Piantino Ferreira** *and team; Ruy Diego Chacón Villanueva* - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the School of Veterinary Medicine and Animal Science (University of São Paulo) (CEUA/FMVZ) in the meeting of 01/22/2018.

Finalidade da Proposta: Pesquisa

Vigência da Proposta: de 06/2016 a 12/2017 Área: Ornitopatologia

Origem:	Amostras biológicas estocadas						
Espécie:	Aves	sexo:	Machos e Fêmeas	idade:	1 a 365 dias	N:	600
Linhagem:	Não se aplica			Peso:	50 a 3000 g		

Resumo: A indústria avícola representa um dos pilares da economia brasileira. Atualmente o Brasil ocupa o primeiro posicionamento em produção e o segundo em exportação de carne de frango a nível mundial. O aparecimento de surtos de doenças no campo representa perdas económicas muito significativas. O vírus da Bronquite Infecciosa das Galinhas (BIG ou IBV do inglês infectious bronchitis virus) é um dos agentes mais patogênicos causante de sintomas principalmente respiratórios, mas também pode gerar lesões nos sistemas urinário, digestivo e reprodutivo. A doença está associada com diferentes sinais clínicos, devido ao tropismo do vírus por diferentes tipos celulares e como resultado da replicação viral em diversos órgãos (Fan et al., 2012). O genoma do IBV apresenta altas taxas de mutação e recombinação entre estirpes pela sua característica de ser de tipo RNA de fita simples, levando a geração contínua de novas estirpes ao redor do mundo. O presente projeto visa desenvolver testes de PCR para a identificação e diferenciação das estirpes circulantes prevalentes do vírus da Bronquite Infecciosa das Galinhas no Brasil.

Local do experimento: Laboratório de Ornitopatologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia.

São Paulo, 22 de janeiro de 2018

Profa. Dra. Anneliese de Souza Traldi
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo

Roseli da Costa Gomes
Secretária Executiva
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: CHACÓN VILLANUEVA, Ruy Diego

Título: **Desenvolvimento de reações de semi-*nested* PCR para o diagnóstico do vírus da Bronquite Infecciosa das Aves e sequenciamento de amostras brasileiras**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental e Comparada da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Data: _____/_____/_____

Banca Examinadora

Prof. Dr._____

Instituição:_____ Julgamento:_____

Prof. Dr._____

Instituição:_____ Julgamento:_____

Prof. Dr._____

Instituição:_____ Julgamento:_____

DEDICATÓRIA

A **Deus**,
meu criador e maior testemunha

A meus pais, **Jorge** e **Vilma**,
imensidade e infinidade de amor

A meus irmãos, **Jorge Luis** e **Juan José**,
bons exemplos e suporte constante

A meus sobrinhos, **Mathías**, **Leonardo** e **Nicolás,**
o melhor do mundo num abraço

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais e irmãos pelo apoio material e espiritual durante estes dois anos e durante toda minha vida, sempre presentes na distância.

À minha família toda, tios, primos, cunhadas, sobrinhos, todos eles desejando sempre o sucesso na minha formação acadêmica e pessoal.

Ao Prof. Dr. Antonio José Piantino Ferreira por me permitir fazer parte do Laboratório de Ornitopatologia, pelo apoio, confiança, paciência e tolerância, em todas as minhas tentativas de fazer ciência e contribuir à avicultura.

À Dra. Claudette, pelas dicas e apoio permanente no laboratório, e pela revisão desta dissertação.

À Diana, pela companhia e projetos juntos na vida, e por acreditar muito mais em mim do que eu mesmo.

Ao Manuel, pelos conselhos e o apoio nas análises bioinformáticas feitas nesta dissertação.

Aos meus melhores amigos, espalhados no mundo todo, pelo carinho e bons desejos demonstrados apesar da distância.

Aos meus colegas e amigos do Laboratório de Ornitopatologia, David, Luis e Silvana, pela amizade, conselhos e apoio durante estes dois anos de mestrado.

Ao Maurício, e todos os funcionários da FMVZ-USP pelo respaldo no funcionamento do laboratório e da faculdade, sempre gentis.

Aos diretores e docentes da FMVZ e do VPT por me aceitar no programa de mestrado e contribuir na minha formação acadêmica e pesquisadora.

Aos membros da Banca Examinadora, por terem aceitado o convite e dispor de tempo para analisar este trabalho.

À Ceva Saúde Animal Ltda. pela parceria com o Laboratório de Ornitopatologia, nas tentativas de resolver problemas na avicultura.

À UNMSM, pela formação e os conhecimentos obtidos durante a graduação.

Ao Perú, minha terra, por contribuir no desenvolvimento do meu caráter, com virtudes e defeitos.

A todos aqueles que contribuíram na realização deste trabalho direta ou indiretamente.

Ao Governo Federal do Brasil, à FUMVET e à CAPES, pelo auxílio concedido para a realização deste mestrado.

Por la terrible estepa castellana
al destierro, con doce de los suyos
-polvo, sudor y hierro-, el Cid cabalga
Manuel Machado

RESUMO

CHACÓN VILLANUEVA, R. D. **Desenvolvimento de reações de semi-*nested* PCR para o diagnóstico do vírus da Bronquite Infecciosa das Aves e sequenciamento de amostras brasileiras.** [Development of hemi-nested PCR reactions for the diagnosis of Avian Infectious Bronchitis virus and brazilian samples sequencing]. 2018. 90 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.

A Bronquite Infecciosa das Aves (BIG) é uma das doenças respiratórias aviárias de maior impacto na avicultura mundial. No Brasil, as estirpes BR-I (GI-11) e Massachusetts (GI-1) são as mais prevalentes nos planteis avícolas. O presente estudo teve como objetivos desenvolver reações de semi-*nested* PCR para o diagnóstico das estirpes BR-I e Mass, em amostras brasileiras obtidas durante o período de 2016 e 2017. Foram desenvolvidas duas reações de semi-*nested* PCR tendo como alvo a subunidade 1 do gene S, específicas para as estirpes BR-I e Mass. O limiar de detecção foi de 10^4 cópias de DNA/µL nas duas reações (3,76fg/µL na reação exclusiva de BR-I; e 5,58fg/µL e 5,57fg/µL na reação duplex de BR-I e Mass, respectivamente). Posteriormente, foram avaliados 572 *pools* de órgãos procedentes das 5 regiões do Brasil. Dentre estas amostras, 62,24% foram positivas para Coronavírus, sendo o alvo desta reação a região 3'UTR. A reação de semi-*nested* PCR específica detectou a estirpe BR-I em 84,83% das amostras positivas para Coronavírus. A reação de semi-*nested* PCR duplex detectou 65,44% das amostras positivas para a estirpe BR-I; 7,35% positivas para a estirpe Mass e co-infecção da estirpe BR-I com Mass em 17,65% das amostras. Após a análise dos controles positivos (vacinas Mass e BR-I) no BLASTn, do resultado do sequenciamento dos produtos de PCR, da análise filogenética, da similaridade de nucleotídeos e a dedução em aminoácidos, foi confirmado o agrupamento esperado das sequências detectadas pelas reações PCR dirigidas para a estirpe BR-I ou Mass. Estes resultados confirmaram a presença predominante da estirpe BR-I, e em menor número, da estirpe Mass nos planteis avícolas do Brasil. As reações desenvolvidas no presente estudo serão valiosas no diagnóstico e na monitoria da doença.

Palavras-chave: Bronquite Infecciosa das Aves. BR-I. Massachusetts. Proteína da espícula. Semi-Nested PCR.

ABSTRACT

CHACÓN VILLANUEVA, R. D. **Development of hemi-nested PCR reactions for the diagnosis of Avian Infectious Bronchitis virus and brazilian samples sequencing**. [Desenvolvimento de reações de semi-*nested* PCR para o diagnóstico do vírus da Bronquite Infecciosa das Aves e sequenciamento de amostras brasileiras]. 2018. 90 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.

Avian Infectious Bronchitis (IB) is one of the avian respiratory diseases with the greatest impact on poultry farming worldwide. In Brazil, strains BR-I (GI-11) and Massachusetts (GI-1) are the most prevalent in poultry flocks. The present study aimed to develop semi-nested PCR reactions for the diagnosis of IBV BR-I and Mass strains, in Brazilian samples obtained during the period of 2016 and 2017. Two semi-nested PCR reactions targeting the 1 subunit of the S gene were developed, specific for BR-I and Mass strains. The detection threshold was 10^4 copies of DNA/µL in both reactions (3,76fg/µL in the exclusive BR-I reaction; and 5,58fg/µL and 5,57fg/µL in the duplex reaction of BR-I and Mass, respectively). Subsequently, 572 organ pools from the 5 regions of Brazil were evaluated. Among these samples, 62,24% were positive for Coronavirus, being the target of this reaction the 3'UTR region. The specific semi-nested PCR reaction detected the BR-I strain in 84,83% of the Coronavirus positive samples. The duplex semi-nested PCR reaction detected 65,44% of the samples positive for the BR-I strain, 7,35% positive for Mass strain, and co-infection of the BR-I and Mass strain in 17,65% of the samples. After the analysis of the positive controls (Mass and BR-I vaccines) in BLASTn, the result of the sequencing of the PCR products, phylogenetic analysis, nucleotide similarity and amino acid deduction, was confirmed the expected clustering of the sequences detected by the PCR reactions directed to BR-I and Mass strains. These results confirm the predominant presence of the BR-I strain, and to a lesser extent, the Mass strain in Brazilian poultry flocks. The reactions developed in the present study will be valuabe in the diagnosis and monitoring of the disease.

Keywords: Avian Infectious Bronchitis. BR-I. Massachusetts. Spike protein. Hemi-Nested PCR.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Taxonomia da ordem *Nidovirales* 21
Figura 2 - Estrutura do IBV 21
Figura 3 - Organização do genoma do IBV..... 22
Figura 4 - Árvore filogenética de sequências parciais do gene S1 do IBV 41
Figura 5 - Eletroforese em gel de agarose 1,5% dos produtos da reação de *semi-nested* PCR para a detecção da estirpe BR-I do IBV 42
Figura 6 - Eletroforese em gel de agarose 1,5% dos produtos da reação de *duplex semi-nested* PCR para a detecção das estirpes BR-I e Mass do IBV.....43
Figura 7 - Eletroforese em gel de agarose 1,5% para se avaliar a sensibilidade dos produtos da reação de *semi-nested* PCR para a detecção da estirpe BR-I do IBV.....46
Figura 8 - Eletroforese em gel de agarose 1,5% para se avaliar a sensibilidade dos produtos da reação de *duplex semi-nested* PCR para a detecção das estirpes BR-I e Mass do IBV.....46
Figura 9 - Eletroforese em gel de agarose 1,5% para se avaliar a especificidade dos produtos da reação de *semi-nested* PCR para a detecção da estirpe BR-I frente a outras estirpes do IBV.....47
Figura 10 - Eletroforese em gel de agarose 1,5% para se avaliar a especificidade dos produtos da reação de *duplex semi-nested* PCR para a detecção das estirpes BR-I e Mass frente a outras estirpes do IBV.....48
Figura 11 - Eletroforese em gel de agarose 1,5% para se avaliar a especificidade dos produtos da reação de *semi-nested* PCR para a detecção da estirpe BR-I do IBV frente a outros agentes infecciosos de tipo DNA 48
Figura 12 - Eletroforese em gel de agarose 1,5% para se avaliar a especificidade dos produtos da reação de *semi-nested* PCR para a detecção da estirpe BR-I do IBV frente a outros agentes infecciosos de tipo RNA 49

Figura 13 - Eletroforese em gel de agarose 1,5% para se avaliar a especificidade dos produtos da reação de *duplex semi-nested* PCR para a detecção das estirpes BR-I e Mass do IBV frente a outros agentes infecciosos de tipo DNA.....49
Figura 14 - Eletroforese em gel de agarose 1,5% para se avaliar a especificidade dos produtos da reação de *duplex semi-nested* PCR para a detecção das estirpes BR-I e Mass do IBV frente a outros agentes infecciosos de tipo RNA.....50
Figura 15 - Árvore filogenética de sequências parciais do gene S1 do IBV 62
Figura 16 - Sub-árvore das sequências dos produtos amplificados das reações de *duplex* semi-*nested* PCR, localizadas no grupo GI-1 63
Figura 17 - Sub-árvore das sequências dos produtos amplificados das reações de *duplex* semi-*nested* PCR, localizadas no grupo GI-11 64

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Classificação das estirpes do IBV no mundo 26
Tabela 2 - Análise pelo BLASTn dos produtos sequenciados das reações de PCR propostas no presente estudo 44
Tabela 3 - Parâmetros utilizados na avaliação de sensibilidade das reações 45
Tabela 4 - Frequência de Coronavírus, segundo o tipo de órgão 51
Tabela 5 - Frequência de Coronavírus, segundo a região geográfica 52
Tabela 6 - Frequência de Coronavírus, segundo o tipo de criação 52
Tabela 7 - Frequência da estirpe BR-I do IBV, segundo o tipo de órgão 53
Tabela 8 - Frequência da estirpe BR-I do IBV, segundo a região geográfica 54
Tabela 9 - Frequência da estirpe BR-I do IBV, segundo o tipo de criação 55
Tabela 10 - Frequência das estirpes BR-I e Mass do IBV, segundo o tipo de órgão 56
Tabela 11 - Frequência das estirpes BR-I e Mass do IBV, segundo a região geográfica.....58
Tabela 12 - Frequência das estirpes BR-I e Mass do IBV, segundo o tipo de criação..... 59
Tabela 13 - Matriz de similaridade de nucleotídeos entre sequências dos produtos amplificados na reação de *duplex* semi-*nested* PCR 67
Tabela 14 - Matriz de similaridade de aminoácidos entre as sequências dos produtos amplificados na reação de *duplex* semi-*nested* PCR 68

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Frequência da estirpe BR-I do IBV, segundo o tipo de órgão 53
Gráfico 2 - Frequência da estirpe BR-I do IBV, segundo a região geográfica 54
Gráfico 3 - Frequência da estirpe BR-I do IBV, segundo o tipo de criação 55
Gráfico 4 - Frequência das estirpes BR-I e Mass do IBV, segundo o tipo de órgão 57
Gráfico 5 - Frequência das estirpes BR-I e Mass do IBV, segundo a região geográfica 58
Gráfico 6 - Frequência das estirpes BR-I e Mass do IBV segundo o tipo de criação..... 59

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - *Primers* desenhados para a detecção das estirpes BR-I e Mass 33
Quadro 2 - Amostras do IBV cujos produtos amplificados foram sequenciados e analisados para a geração da árvore filogenética.....65

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 17
2 REVISÃO DE LITERATURA 19
3 OBJETIVOS 27
4 MATERIAIS E MÉTODOS 28
4.1 AMOSTRAS 28
4.2 CONTROLES 28
4.3 PREPARO DAS AMOSTRAS 29
4.4 EXTRAÇÃO DE DNA 30
4.5 EXTRAÇÃO DE RNA 30
4.6 RETROTRANSCRIÇÃO RANDÔMICA DE RNA 31
4.7 PADRONIZAÇÃO DE DUAS REAÇÕES DE PCR PARA DETECÇÃO DO VÍRUS DA BRONQUITE INFECCIOSA DAS GALINAS (BIG) 32
4.7.1 SELECÇÃO DAS SEQUÊNCIAS DE REFERÊNCIA E DESENHO DE PRIMERS 32
4.7.2 REAÇÃO SEMI-NESTED PCR PARA A DETECÇÃO DA ESTIRPE BR-I 33
4.7.3 REAÇÃO *DUPLEX* SEMI-*NESTED* PCR PARA A DETECÇÃO SIMULTÂNEA DAS ESTIRPES BR-I E MASS 35
4.7.4 SEQUÊNCIAMENTO DE DNA 37
4.7.5 SENSIBILIDADE E ESPECIFICIDADE ANALÍTICA TÉCNICA DAS REAÇÕES DE PCR 38
4.8 DETEÇÃO DAS ESTIRPES BR-I E MASS EM AMOSTRAS DE CAMPO 39
4.9 ANÁLISES FILOGENÉTICAS 39
5 RESULTADOS 40
5.1 SELECÇÃO DAS SEQUÊNCIAS DE REFERÊNCIA E DESENHO DE *PRIMERS* 40
5.2 REAÇÃO SEMI-*NESTED* PCR PARA A DETECÇÃO DA ESTIRPE BR-I 42
5.3 REAÇÃO DE *DUPLEX* SEMI-*NESTED* PCR PARA A DETECÇÃO SIMULTÂNEA DAS ESTIRPES BR-I E MASS 43
5.4 SEQUÊNCIAMENTO DE DNA 44
5.5 SENSIBILIDADE E ESPECIFICIDADE ANALÍTICA TÉCNICA DAS REAÇÕES DE PCR 45

5.6 DETECÇÃO DAS ESTIRPES BR-I E MASS EM AMOSTRAS DE CAMPO ... 50
5.6.1 TRIAGEM POR REAÇÃO DE *RT*-PCR POR SEGMENTO DA REGIÃO 3´UTR DE CORONAVÍRUS ... 50
5.6.2 REAÇÃO DE SEMI-*NESTED* PCR PARA A DETECÇÃO DA ESTIRPE BR-I ... 52
5.6.3 REAÇÃO DE *DUPLEX* SEMI-*NESTED* PCR PARA A DETECÇÃO SIMULTÂNEA DAS ESTIRPES BR-I E MASS ... 55
5.7 ANÁLISES FILOGENÉTICAS ... 60
6 DISCUSSÃO ... 69
7 CONCLUSÕES ... 77
REFERÊNCIAS ... 78
APÊNDICES ... 86
APÊNDICE A – Lista de abreviaturas e siglas ... 87

1 INTRODUÇÃO

A indústria avícola representa um dos pilares da economia brasileira devido à grande e cada vez mais precoce produção de carne, ovos e derivados. O Brasil ocupa a segunda posição em produção e a primeira em exportação de carne de frango ao nível mundial (ABPA, 2017). Os sistemas de criação com altas densidades populacionais influenciam no aparecimento de surtos de doenças no plantel avícola que acarretam perdas econômicas muito significativas. As doenças mais frequentemente presentes são aquelas que se manifestam com sinais respiratórios, entre as quais a Bronquite Infecciosa das Aves, também chamada de Bronquite Infecciosa das Galinhas (BIG), é uma das que causam maior impacto (IGNJATOVIĆ; SAPATS, 2000). Além disso, é comum se encontrar quadros respiratórios de etiologia complexa, com a participação concomitante de mais de um agente infeccioso, levando a um agravamento do quadro e complexidade na diferenciação dos agentes causadores (ROUSSAN; HADDAD; KHAWALDEH, 2008; HUTTON et al., 2017).

O agente etiológico da BIG provoca alterações patológicas no trato respiratório superior, e foi associado a outros sinais clínicos, por apresentar tropismo e replicação viral em diferentes tipos celulares (FAN et al., 2012). Desde a primeira descrição do quadro clínico nos Estados Unidos (SCHALK; HAWN, 1931) e a primeira descrição etiológica cinco anos depois (BEACH; SCHALM, 1936), inúmeros casos clínicos e de surtos da doença foram publicadas a cada ano, em todo o mundo, influenciado enormemente pelas características do genoma deste vírus RNA, de fita simples, que apresenta altas taxas de mutação e recombinação entre estirpes, levando à evolução e geração constante de novos genótipos e sorotipos (JACKWOOD; YOUSEF; HILT, 1997; DE WIT; COOK; VAN DER HEIJDEN, 2011). No Brasil, o vírus da bronquite infecciosa (IBV) foi isolado pela primeira vez em 1957 (HIPOLITO, 1957), em Belo Horizonte, Minas Gerais. No entanto, apenas em 1975 o aparecimento da doença, com o quadro clínico correspondente à BIG foi observado. E, em consequência, esta doença foi descrita em todos os Estados e regiões de produção avícola do Brasil (SILVA, 2010). Em 1979 foi licenciada a importação e a fabricação de vacinas contra o IBV da estirpe Massachusetts (Mass). Esta vacina foi eficaz durante alguns anos, mas por reação de soroneutralização se observou o

aparecimento de estirpes variantes (DI FABIO et al., 2000). Em 2011, com o sequenciamento de nucleotídeos das regiões hipervariáveis 1 e 2 do gene S1, foi descrito o predomínio da estirpe BR-I no plantel avícola brasileiro (CHACÓN et al., 2011). A partir de 2016 foi autorizada a fabricação e a distribuição da primeira vacina contra o IBV da estirpe BR-I, classificada como pertencente ao grupo I- 11 (GI-11), segundo a classificação feita por Valastro et al. (2016).

Levando em consideração a complexidade e impacto deste agente, é fundamental um monitoramento epidemiológico constante, assim como, os mais precisos, rápidos e eficazes métodos para a detecção e tipificação do IBV**,** para que as medidas mais apropriadas de prevenção e controle da doença sejam aplicadas. A genotipagem baseada nas técnicas de biologia molecular mediante a reação em cadeia pela polimerase (PCR) representa uma das ferramentas mais amplamente utilizadas para a detecção e identificação da estirpe do vírus pela sua rapidez e sensibilidade.

2 REVISÃO DE LITERATURA

A Bronquite Infecciosa das Galinhas é uma doença de relevância para a avicultura. As manifestações clínicas clássicas são: dificuldade respiratória, tosse, espirros, estertores traqueais e descargas nasais e pode se observar também lacrimejamento e cabeça inchada (CAVANAGH, 2005). As aves ficam deprimidas, indispostas e concentradas sob fontes de calor, reduzindo o consumo de ração, o ganho de peso corporal e aumentando o consumo de água, e, em consequência, ocorre o aumento da umidade na cama. Nas aves de postura há uma evidente redução na quantidade e qualidade dos ovos, tanto externa (palidez, fragilidade e deformação da casca) como interna (conteúdo mais aquoso e reduzido) (FABRICANT, 1998). Segundo a variante do vírus, outros sistemas e órgãos podem ser afetados. No sistema reprodutor pode causar quedas na fertilidade e produção de ovos (MORK et al., 2014), nos rins pode causar fibrose, cálculos renais e poliúria (MEIR et al., 2004), e comprometer a musculatura peitoral (ALMEIDA et al., 2012).

O IBV infecta diferentes espécies de aves, principalmente aquelas da avicultura comercial ou domésticas como frangos, perdizes, gansos, galinha D'Angola, patos, pavões e pombos (CAVANAGH, 2007). (CAVANAGH, 2007). A transmissão é horizontal entre as aves do mesmo lote através da dispersão e inalação de aerossóis e também pela ingestão de partículas virais. A transmissão vertical é possível (COOK, 1971; TORO; VAN SANTEN; JACKWOOD, 2012; PEREIRA et al., 2016). Durante a etapa aguda da infecção, o vírus se multiplica inicialmente nas células epiteliais do trato respiratório superior, passando para a traqueia e os pulmões por um período de 5 a 7 dias, aproximadamente. Posteriormente, na etapa crônica, o vírus é transmitido pela via sanguínea e por difusão entre células, atingindo as superfícies epiteliais como as dos rins, dos ovários, dos ovidutos, dos testículos, da bursa, do trato digestório (esôfago, proventrículo, duodeno, jejuno, tonsilas cecais, reto e cloaca), se multiplicando e lesando estes tecidos (WANG et al., 1996; DI FABIO et al., 2000; JACKWOOD; DE WIT, 2013).

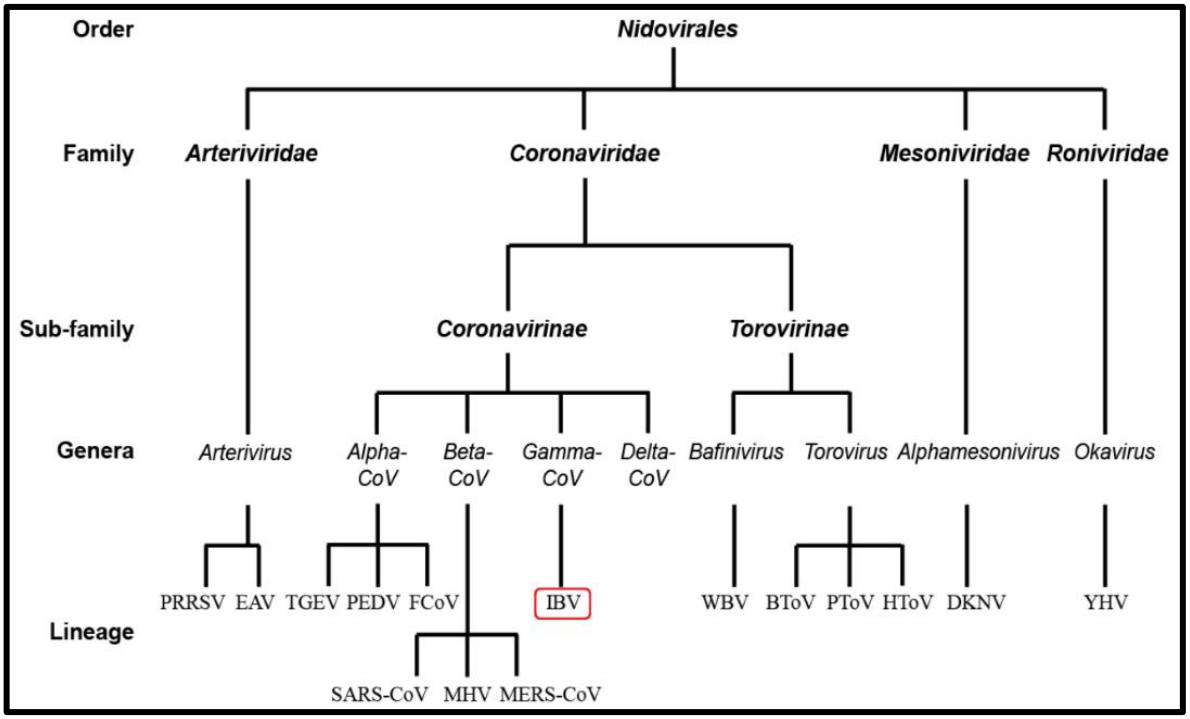
A doença é altamente contagiosa, atingindo tipicamente 100% de morbidade, enquanto a mortalidade tende a ser baixa (JACKWOOD; DE WIT, 2013).

A morbidade e a taxa de mortalidade podem ser altas nos casos de infecções por variantes do IBV mais virulentas e patogênicas (IGNJATOVIC et al., 2002). Outros fatores, como a idade das aves, o estado imunológico, as concentrações de anticorpos específicos ao vírus, os fatores de estresse, a qualidade sanitária nos aviários, e a presença de infecções concomitantes ou secundárias causadas por bactérias como *Escherichia coli, Mycoplasma sp, Ornithobacterium rhinotracheale, Bordetella avium* (HOPKINS; YODER, 1984; MATTHIJS et al., 2003; JACKWOOD; DE WIT, 2013) ou outros vírus como o vírus da doença de Newcastle, o vírus da influenza aviária (TARNAGDA et al., 2011; SID; BENACHOUR; RAUTENSCHLEIN, 2015; HASSAN et al., 2016) também podem afetar significativamente a morbidade e a mortalidade.

O vírus da bronquite infecciosa das galinhas foi classificado na ordem *Nidovirales*, ordem caracterizada por apresentar genomas envelopados de RNA, de cadeia simples e positiva. Dentro dessa ordem, se localiza na família *Coronaviridae*, na subfamília *Coronavirinae* que compreende quatro gêneros: Alphacoronavírus, Betacoronavírus, Gammacoronavírus (onde se encontra o IBV) e Deltacoronavírus (Figura 1). Esta classificação se baseia na organização do genoma viral, na proximidade e similaridade entre as suas sequências nucleotídicas, nas propriedades antigênicas das proteínas virais, nas estratégias de replicação do genoma, na estrutura e nas propriedades físico-químicas dos vírions, nos hospedeiros naturais, no tropismo celular e tecidual, na patogenicidade e citopatologia, e nos mecanismos de transmissão (CONG; VERLHAC; REGGIORI, 2017).

O IBV é um vírus envelopado e pleomórfico (Figura 2). A partícula viral tem aproximadamente 120nm de diâmetro, coberto por uma camada dupla lipídica e projeções superficiais proteicas denominadas espículas (BERRY et al., 1964) apresentando um aspecto de coroa à microscopia eletrônica.

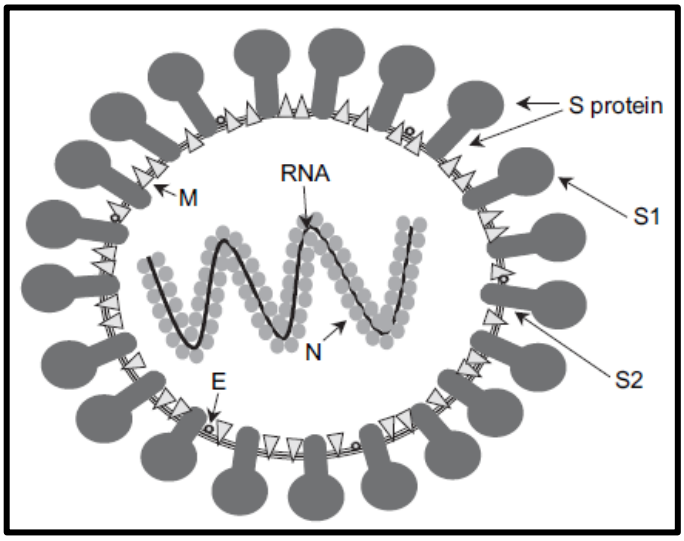
Figura 1 – Taxonomia da ordem Nidovirales.



Fonte: (CONG; VERLHAC; REGGIORI, 2017)

Legenda: BToV: bovine torovirus; DKNV: dak nong virus; EAV: equine arteritis virus; FCoV: feline coronavirus; HToV: human torovirus; IBV: infectious bronchitis virus; MERS-CoV: Middle East respiratory syndrome coronavirus; MHV: mouse hepatitis virus; PRRSV: porcine reproductive and respiratory syndrome virus; PEDV: porcine epidemic diarrhea virus; PToV: porcine torovirus; TGEV: transmissible gastroenteritis coronavirus; SARS-CoV: severe acute respiratory syndrome coronavirus; YHV: yellow head virus; WBV: white bream virus.

Figura 2 – Estrutura do IBV.

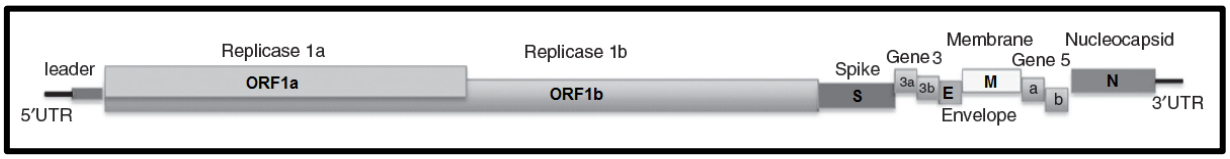


Fonte: (CAVANAGH, 2005)

Legenda: S: proteína da espícula; S1: subunidade 1 da espícula; S2: subunidade 2 da espícula; E: envelope; M: membrana; N: nucleocapsídeo; RNA: genoma de RNA.

Possui um genoma de RNA de fita simples, não segmentado, de sentido positivo, de aproximadamente 27,5 a 28Kb de extensão (JACKWOOD; DE WIT, 2013). A composição do genoma inclui duas regiões não transcritas (5´ e 3´ UTR), um grande segmento composto por duas fases de leitura aberta (*Open Reading Frame* - ORF1a e ORF1b), genes essenciais, codificadores de proteínas estruturais (S, E, M, N) e genes acessórios ORF3 e ORF5, não estruturais de função não esclarecida (3a, 3b, 5a, 5b) (Figura 3) (WEISS; NAVAS-MARTIN, 2005).

Figura 3 – Organização do genoma do IBV.



Fonte: (JACKWOOD; DE WIT, 2013)

Legenda: UTR: região não transcrita; ORF1a: replicase 1a; ORF1b: replicase 1b; S: espícula; 3a: gene 3a; 3b: gene 3b; E: envelope; M: membrana; 5a: gene 5a; 5b: gene 5b; N: nucleocapsídeo.

As regiões UTR codificam proteínas para a interação com as proteínas do hospedeiro (LI et al., 2008). As proteínas codificadas pelos ORF1a e ORF1b são clivadas em 15 proteínas não estruturais (Nsp2 até Nsp16) as quais contribuem para a formação dos complexos de replicação e transcrição do genoma viral (IMBERT et al., 2008). A proteína de envelope de 108 aminoácidos e a proteína de membrana de 225 aminoácidos, que é também embebida na dupla camada lipídica para manter a integridade, são essenciais para a montagem e ligação do vírus à célula hospedeira (VENNEMA et al., 1996; MAEDA; MAEDA; MAKINO, 1999). A proteína do nucleocapsídeo de 409 aminoácidos desempenha uma variedade de funções como a montagem do vírus, a ligação ao hospedeiro, formação do núcleo viral, transdução de sinais e modulação de processos na célula hospedeira. A proteína da espícula é clivada em duas subunidades de 535 e 627 aminoácidos, denominadas S1 e S2, respectivamente. A subunidade S1, contém os determinantes antigênicos específicos, responsáveis pela união à célula hospedeira, neutralização viral e resposta imune (KOCH et al., 1990; SCHULTZE; CAVANAGH; HERRLER, 1992; IGNJATOVIC; GALLI, 1994; JOHNSON et al., 2003) e as altas taxas de mutação e variação nesta proteína explicam às falhas na proteção cruzada entre as vacinas para diferentes estirpes virais (JACKWOOD; DE WIT, 2013). A subunidade S2, a

qual é mais conservada do que a S1, está envolvida no processo de oligomerização da proteína e na entrada às células susceptíveis do hospedeiro (TRIPET et al., 2004; SHULLA; GALLAGHER, 2009; GUO et al., 2010).

As modificações pós-transcricionais e pós-traducionais apresentam uma função importante na biologia dos vírus. A proteína da espícula como já foi mencionado, precisa de uma clivagem para a separação das suas duas subunidades, que é fundamental para o processo de infecção, sendo efetuada pelas proteases do hospedeiro (CAVANAGH et al., 1992). O processo de palmitoilação das glicoproteínas, ou seja, a adição do lipídeo palmitato às glicoproteínas virais, permite uma maior associação destas proteínas às membranas celulares do hospedeiro, contribuem para a montagem do vírus e a infecção (BOS et al., 1995; PETIT et al., 2007). As N-glicosilações favorecem as mudanças no tropismo celular e causam diferenças na virulência, pois afetam as interações com os receptores, portanto, as características antigênicas do vírus (LI et al., 2000; WISSINK et al., 2004), e podem afetar também os processos de replicação viral e a invasão celular (MEUNIER et al., 1999; SLATER-HANDSHY et al., 2004). A fosforilação de proteínas do IBV foi associada à diferenciação de RNAs, virais e não virais (SPENCER et al., 2008).

A grande variabilidade de IBV existentes no mundo inteiro é explicada por dois mecanismos biológicos, inerentes ao vírus: a) a taxa de mutações do genoma, principalmente, no gene que codifica a espícula (S), e b) a recombinação entre diferentes variantes do vírus coexistentes num mesmo hospedeiro. No primeiro caso, a taxa de mutação nos coronavírus pode atingir o valor de uma mutação a cada milhão de nucleotídeos, fato que influencia permanentemente as suas características antigênicas (ECKERLE et al., 2007). No segundo caso, o IBV possui uma alta taxa de recombinação, com valores de até 25% em infecções mistas como resultado do processo de transcrição descontínua e da coexistência de diferentes estirpes virais nas granjas (SIMON-LORIERE; HOLMES, 2011). A pressão seletiva, mecanismo pelo qual o vírus se adapta a um determinado ambiente, causa no IBV a geração de variantes de diferentes patogenicidades. Então, é importante o uso apropriado de vacinas, e os constantes estudos epidemiológicos e de caracterização das estirpes circulantes numa determinada região geográfica.

A identificação do IBV pode ser realizada por vários métodos: o clássico isolamento viral, a inibição da hemaglutinação (*HI*), o teste de ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*), o teste de imunoperoxidase (*IPA*), o teste de neutralização viral (*VNT*), o teste de imunofluorescência (*IFA*), o teste de precipitação em ágar gel (*AGPT*), técnica da transcriptase reversa da reação em cadeia pela polimerase (*RT*-PCR) e técnica da transcriptase reversa da reação em cadeia pela polimerase em tempo real (*qRT*-PCR) (DE WIT, 2000).

O IBV, segundo as características funcionais, pode ser classificado como protetotipo ou sorotipo. O protetotipo do IBV é determinado mediante o uso de testes de proteção em aves livres de patógenos específicos (*SPF*), nos quais são comparadas duas variantes do vírus. Este é definido quando uma ave infectada com uma variante consegue se proteger da infecção, no mínimo em 80%, da segunda variante, porém, resulta em um método de alto custo. Os sorotipos são diferenciados pelos testes de neutralização viral, nos quais se avalia a capacidade infectante de uma variante viral após a adição do soro de ave infectada com a outra variante do vírus (JACKWOOD; DE WIT, 2013). A classificação do IBV, segundo as características genéticas, é baseada na análise parcial ou total do genoma. A metodologia mais utilizada é o sequenciamento de nucleotídeos. Outros métodos baseados nas características genéticas são o *RFLP* (polimorfismo de comprimento de fragmentos de DNA) e as técnicas de PCR e qPCR (reação em cadeia pela polimerase em tempo real) (DE WIT, 2000). O gene mais empregado quanto a caracterização genética é o da proteína S, mais precisamente a região da subunidade S1, que inclui três regiões com alto polimorfismo, chamadas de regiões hipervariáveis 1, 2 e 3 (*HVR*1, *HVR*2 e *HVR*3), que se encontram nas posições dos aminoácidos 38-67, 91-141 e 274-387, respectivamente (CAVANAGH; DAVIS; MOCKETT, 1988; MOORE; JACKWOOD; HILT, 1997). Devido ao crescente surgimento de novas variantes em diferentes regiões, os testes de sorotipagem vêm sendo substituídos pelos métodos moleculares, sendo estes os mais realizados e recomendados. A genotipagem mediante a *RT*-PCR e o sequenciamento de nucleotídeos da região S1 que inclui as regiões *HVR*s da proteína da espícula permitiu a descrição de mais de 50 estirpes conhecidas no mundo (JACKWOOD; DE WIT, 2013).

Um desafio na caracterização de um sorotipo é determinar a existência de modificações na sequência de nucleotídeos de determinado gene, assim, na maioria dos casos, a variação de 25 a 50% na sequência de nucleotídeos indica o surgimento de novo sorotipo. No entanto, em alguns casos, apenas 2% de variação, principalmente, nas regiões *HVR*s, resulta também numa mudança de sorotipo, contribuindo para a redução da proteção cruzada (CAVANAGH, 2007).

A caracterização de cada nova estirpe é comumente feita de maneira restrita à sua região, associando o nome da estirpe segundo o país ou cidade de detecção. No entanto, pode existir uma estreita relação genética entre estirpes descritas em regiões geograficamente distantes. Uma tentativa de agrupamento mais apropriado para as estirpes descritas no mundo foi realizada por Valastro et al. (2016) nos quais foram incluídas todas aquelas com sequenciamento completo do gene S1, esta classificação propõe 32 linhagens organizadas em 6 grupos principais (Tabela 1).

Na América do Sul, os primeiros relatos do IBV foram associados ao sorotipo Massachusetts (Mass) (HIPOLITO, 1957; HIDALGO; GALLARDO; ROSENDE, 1976). Nos anos posteriores, foram identificadas outras variantes descritas previamente nos Estados Unidos, na Europa e na África (GALLARDO; TORO, 1986; CUBILLOS et al., 1991; DI FABIO et al., 2000; HIDALGO). Além da estirpe Mass (linhagem GI-1), a estirpe BR-I (linhagem G1-11) e a estirpe Q1 (linhagem GI-16) foram as mais prevalentes na América do Sul (MARANDINO et al., 2015; VALASTRO et al., 2016). No caso específico do Brasil, segundo estudos baseados em sequenciamento total ou parcial do gene S1, apenas as estirpes Mass e BR-I prevalecem no campo (VILLARREAL et al., 2007; FELIPPE et al., 2010; CHACON et al., 2011; PADILHA FRAGA et al., 2013; CARRANZA et al., 2017). Outras estirpes como D207, Arkansas, Connecticut e 4/91 foram relatados apenas em casos isolados (VILLARREAL et al., 2007; FELIPPE et al., 2010).

A tipagem genética por meio da *RT*-PCR ou *qRT*-PCR oferecem maior especificidade, mesmo quando são pesquisadas mais de uma estirpe viral numa mesma reação, como nos casos de *RT*-PCRs em *multiplex*; por exemplo, a reação desenvolvida por Cavanagh et al. (1999) que detecta as estirpes Mass H120, 793B e D274. No caso de métodos para a detecção das estirpes circulantes de maior

prevalência no Brasil foram desenvolvidos métodos para diferenciar a amostras Mass H120 de campo e vacina (OKINO et al., 2005) por semi-*nested* PCR, e também para diferenciar as estirpes Mass e BR-I mediante q*RT*-PCR utilizando 10 e 16 sequencias, correspondentes às duas estirpes, respectivamente (PADILHA DE FRAGA et al., 2016).

Tabela 1 – Classificação das estirpes do IBV no mundo.

Linhagem	Período de circulação	Estirpe protótipo			
		Nome da estirpe	País da origem	Data de coleta	Número de acessão GenBank
GI-1	1937–2013	Beaudette	USA	1937	M95169
GI-2	1954–2006	Holte	USA	1954	GU393336
GI-3	1960–2006	Gray	USA	1960	L14069
GI-4	1962–1998	Holte	USA	1962	L18988
GI-5	1962–2012	N1/62	Australia	1962	U29522
GI-6	1962–2010	VicS	Australia	1962	U29519
GI-7	1964–2012	TP/64	Taiwan	1964	AY606320
GI-8	1965–1967	L165	USA	1965	JQ964061
GI-9	1973–2011	ARK99	USA	1973	M99482
GI-10	1970s–2000s	B	New Zealand	1970s	AF151954
GI-11	1975–2009	UFMG/G	Brazil	1975	JX182775
GI-12	1978–2006	D3896	The Netherlands	1978	X52084
GI-13	1983–2013	Moroccan-G/83	Morocco	1983	EU914938
GI-14	1984–2006	B1648	Belgium	1984	X87238
GI-15	1986–2008	B4	Korea	1986	FJ807932
GI-16	1986–2011	IZO 28/86	Italy	1986	KJ941019
GI-17	1988–1999	CA/Machado/88	USA	1988	AF419315
GI-18	1993–1999	JP8127	Japan	1993	AY296744
GI-19	1993–2012	58HeN-93II	China	1993	KC577395
GI-20	1996–1999	Qu_mv	Canada	1996	AF349621
GI-21	1997–2005	Spain/97/314	Spain	1997	DQ064806
GI-22	1997–2011	40GDGZ-97I	China	1997	KC577382
GI-23	1998–2012	Variant 2	Israel	1998	AF093796
GI-24	1998–2013	V13	India	1998	KF757447
GI-25	2004–2013	CA/1737/04	USA	2004	EU925393
GI-26	2006–2007	NGA/B401/2006	Nigeria	2006	FN182243
GI-27	2008–2013	GA08	USA	2008	GU301925
GII-1	1979–1984	D1466	The Netherlands	1979	M21971
GIII-1	1988–2008	N1/88	Australia	1988	U29450
GIV-1	1992–2003	DE/072/92	USA	1992	U77298
GV-1	2002–2008	N4/02	Australia	2002	DQ059618
GVI-1	2007–2012	TC07-2	China	2007	GQ265948

Fonte: (VALASTRO et al., 2016).

Legenda: G: grupo.

3 OBJETIVOS

O presente trabalho pretende cumprir os seguintes objetivos:

- Desenhar e padronizar uma reação de semi-*nested* PCR para a detecção da estirpe BR-I do IBV.

- Desenhar e padronizar uma reação de *duplex* semi-*nested* PCR para a detecção simultânea e diferenciação das estirpes BR-I e Mass do IBV.

- Avaliar a sensibilidade e especificidade das reações de semi-*nested* PCR e *duplex* semi-*nested* PCR desenvolvidas no presente estudo.

- Avaliar a frequência de Coronavírus, detectado em amostras de campo por meio da reação semi-*nested* PCR dirigida à região 3´UTR, segundo o tipo de órgãos ou suabes, região geográfica de procedência e tipo de criação das aves.

- Determinar, pelas reações de semi-*nested* PCR e *duplex* semi-*nested* PCR desenvolvidas neste estudo, a estirpe do IBV presente em amostras de campo segundo o tipo de órgãos ou suabes, região geográfica de procedência e tipo de criação das aves.

- Estudar a diversidade genética do IBV presente em amostras de campo com base no sequenciamento de nucleotídeos dos produtos amplificados das reações de semi-*nested* PCR e *duplex* semi-*nested* PCR desenvolvidas no presente estudo.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 AMOSTRAS

Neste trabalho foram utilizadas 572 amostras estocadas na coleção do Laboratório de Ornitopatologia (LABOR), da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo. Cada amostra correspondeu a um *pool* de um órgão específico (tonsilas cecais, traqueias, intestinos, pulmões, rins, sistemas reprodutores, cornetos nasais, pâncreas, duodenos, proventrículos, pálpebras, fígados, corações e bursas) ou suabes (de cloaca ou de traqueia) coletado de 5 aves diferentes do mesmo lote. As amostras eram provenientes de granjas que não usavam a vacina BR-I (CEVAC® IBras L, Ceva Saúde Animal Ltda.).

As idades das aves oscilaram entre 1 e 92 semanas de idade, correspondentes a frangos de corte, matrizes ou poedeiras. As amostras eram de aves que apresentavam sinais clínicos que poderiam ser associados à infecção causada por IBV.

As procedências das amostras corresponderam a 19 Estados brasileiros compreendidos nas 5 regiões do Brasil (Norte, Nordeste, Centro-Oeste, Sudeste e Sul) e coletadas durante o período de 2016 e 2017.

4.2 CONTROLES

Como controles positivos para as reações de *RT*-PCR utilizaram-se vacinas comercias das estirpes Mass (CEVAC® BRON 120 L, Ceva Saúde Animal Ltda.) e BR-I (CEVAC® IBras L, Ceva Saúde Animal Ltda.). Como controles negativos, de DNA ou RNA se utilizou o tampão fosfato salino (PBS 0,1M, pH 7,4).

Para o diagnóstico molecular diferencial, utilizaram-se controles positivos das estirpes Q1, QX, D274 e 793B do IBV armazenadas em papel de filtro FTA, assim como, também os seguintes controles positivos associados a outras doenças de aves:

- Adenovírus grupo I (*FAdV*-1): amostra positiva de campo.
- Adenovírus grupo II (*FAdV*-2): amostra positiva de campo.
- Astrovírus de galinha (*CAstV*): amostra positiva de campo.
- *Lawsonia intracellularis* (LAW): vacina Enterisol® Ileitis, Boehringer Ingelheim Vetmedica, Inc.
- Metapneumovírus aviário (*PVA*): vacina BIO-SHS Viva, subtipo A, Laboratório Bio-Vet S/A; vacina NOBILIS® Rhino CV, subtipo B, MSD Saúde Animal.
- *Mycoplasma gallisepticum* (MG): vacina CEVAC® MG-F, Ceva Saúde Animal Ltda.
- *Ornithobacterium rhinotracheale* (*ORT*): amostra positiva de campo.
- Parvovírus de galinha (*ChPV*): amostra positiva de campo.
- Poxvírus (*POX*): vacina DIFTOVAX SUAVE, Merial Saúde Animal Ltda.
- Reovírus (*REO*): vacina ARTRI-VET ORAL, Laboratório Bio-Vet S/A.
- Rotavírus (RV): amostra positiva de campo, grupo A.
- Vírus da anemia infecciosa das galinhas (*CAV*): vacina CIRCOMUNE®, Ceva Saúde Animal Ltda.
- Vírus da doença de Marek (*MDV)*: vacina CEVAC® MD HVT & RISPENS, Ceva Saúde Animal Ltda.
- Vírus da doença de Newcastle (*NDV*): vacina NEW-VACIN, Laboratório Bio-Vet S/A.
- Vírus da doença infecciosa da bursa (*IBDV*): vacina CEVAC® GUMBO L, Ceva Saúde Animal Ltda.
- Vírus da encefalomielite aviária (*vEA*): vacina TREMOR-VET, Laboratório Bio-Vet S/A.
- Vírus da influenza aviária (*vIA*): amostra em cartão FTA.
- Vírus da laringotraqueíte infecciosa (*vLTI*): amostra positiva de campo.
- Vírus da leucose aviária (*ALV*): amostra positiva de campo, subgrupo E.
- Vírus da reticuloendoteliose aviária (*REV*): amostra positiva de campo.

4.3 PREPARO DAS AMOSTRAS

Foram preparadas suspensões de todas as amostras em cabine de fluxo laminar. As amostras de órgãos foram maceradas e em microtubo contendo 700µL

de PBS 0,1M, pH 7,4 se adicionou aproximadamente 700µL de amostra. As amostras de suabes foram recortadas com tesouras estéreis para separar apenas as porções com amostra (n=05) e completadas a um volume final de 1,0mL de PBS 0,1M, pH 7,4. Fragmentos de aproximadamente 2mm^2 de amostras em papéis de filtro FTA foram recortados e colocados em microtubo contendo 0,5mL com PBS 0,1M, pH 7,4.

Todas as suspensões passaram por processo de choque térmico de três fases contínuas: homogeneização em *vortex* por 30 segundos, congelamento por dez minutos a -80°C e descongelamento em banho-maria a 56°C por 1,0 minuto. Essas fases foram repetidas três vezes. Em seguida, foram centrifugadas a 12.000xg por 20 minutos para a extração de DNA e 200µL do sobrenadante foram transferidos para um microtubo de 1,5mL. No caso de extração de RNA foram centrifugadas a 12.000xg por 30 minutos e 250µL do sobrenadante foram transferidos para microtubo de 1,5mL.

4.4 EXTRAÇÃO DE DNA

A extração de DNA foi realizada nas amostras de bactérias (LAW, MG, ORT), provírus (ALV), amostras contendo vírus DNA (*CAV*, *ChPV*, *FadV*-1, *FadV*-2, *MDV*, *POX*, *vLTI*), assim como, no controle negativo de DNA (PBS 0,1M, pH 7,4).

Foi utilizado o método de lise com tiocianato de guanidina (GT) segundo a descrição de Chomkzynski (1993), com modificações. O *pellet* de DNA foi dissolvido em 30µL de tampão Tris-EDTA (TE). A concentração de DNA na amostra foi determinada em espectrofotômetro NanoDrop™ One (Thermo Fisher Scientific Inc.), e, caso necessário, diluído até uma concentração máxima de 1.500ng/µL, e armazenado a -20°C até o momento da PCR.

4.5 EXTRAÇÃO DE RNA

A extração de RNA foi realizada nas amostras contendo vírus RNA (*ANV*, *CastV*, *IBDV*, *NDV*, PVA, *REO*, *REV*, *RV*, *vEA*, *vIA*), nos controles positivos de BR-I

e Mass, nos controles diferenciais das estirpes Q1, QX, D274 e 793B do IBV, assim como, no controle negativo de RNA (PBS 0,1M, pH 7,4).

Foi utilizado o método de lise com isotiocianato de guanidina (GIT) segundo o método de Chomkzynski (1987), com modificações. O *pellet* de RNA foi dissolvido em 20µL de água DEPC. A concentração de RNA foi medida em espectrofotômetro NanoDrop™ One (Thermo Fisher Scientific Inc.), e se necessário, diluído até uma concentração máxima de 1.500ng/µL, e armazenado a -20°C até o momento da *RT*-PCR.

4.6 RETROTRANSCRIÇÃO RANDÔMICA DE RNA

A retrotranscrição foi realizada com a finalidade de transformar o RNA presente na amostra em DNA complementar (cDNA), para a realização da reação de PCR. No caso deste projeto, foi escolhida a retrotranscrição randômica que permitiu realizar diferentes reações de PCR a partir do mesmo produto da retrotranscrição. As reações foram realizadas com o *kit RevertAid First Strand* cDNA *Synthesis* (Thermo Fisher Scientific Inc.), que inclui o uso de *primers* randômicos hexâmericos (NNNNNN), e *primers* Oligo dT_{12-18} (oligonucleotídeos constituídos por 12 a 18 adeninas). O *mix* de 20µL da retrotranscrição consistiu na mistura de:

- 1,0µL do *primer* randômico 250ng/µL;
- 1,0µL do *primer* Oligo dT_{12-18} 500µg/mL;
- 4,0µL de tampão 5X *First-Strand;*
- 2,0µL de DTT 0,1M;
- 1,0µL de enzima M-MLV 200U/µL,
- 3,0µL de RNA numa concentração máxima de 1,5µg/µL (após a tratamento térmico a 95°C por 5 minutos);
- 7,0µL de água DEPC livre de RNAses.

O *mix* foi levado no termociclador com o programa que possuía 4 etapas contínuas, a 37°C por 2 minutos, 25°C por 10 minutos, 37°C por 50 minutos e 70°C

por 15 minutos. O produto da reação foi armazenado a -80°C até seu uso nas reações de PCR.

4.7 PADRONIZAÇÃO DE DUAS REAÇÕES DE PCR PARA DETECÇÃO DO VÍRUS DA BRONQUITE INFECCIOSA DAS GALINAS (BIG)

Com a finalidade de padronizar as reações em cadeia pela polimerase (PCR), desenvolveram-se protocolos para detectar as duas principais estirpes circulantes do IBV no Brasil (BR-I e Mass).

4.7.1 SELECÇÃO DAS SEQUÊNCIAS DE REFERÊNCIA E DESENHO DE PRIMERS

Foram extraídas 370 sequências nucleotídicas publicadas no *GenBank* (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/) correspondentes ao gene S1 (fragmento S1 do gene que codifica a glicoproteína da espícula do IBV) que foram submetidas a este banco de dados a partir de amostras de origem brasileira. Adicionalmente, foi extraído o subconjunto de 199 sequências proposta por Valastro et al. (2016) para a caracterização de estirpes do IBV no mundo. Todas as sequências (n=569) foram alinhadas pela versão 7.313 do programa MAFFT (KATOH; STANDLEY, 2013), com o método de refinamento iterativo e lento (FFT-NS-i). O resultado do alinhamento foi analisado e editado pela versão 6.8.3 do programa CLC *Main Workbench* (https://www.qiagenbioinformatics.com/) e pela versão 7.0.5 do programa *Bioedit* (HALL, 1999). A eleição do melhor modelo de substituição nucleotídica das sequências e a elaboração de uma árvore filogenética para se determinar a estirpe correspondente a cada sequência foram realizadas com a versão 3.0 do programa PhyML (GUINDON et al., 2010) e foram editados com a versão 7.0.26 do programa MEGA (KUMAR; STECHER; TAMURA, 2016).

Baseados na distribuição resultante das sequências na árvore filogenética foram selecionadas todas aquelas de origem brasileira correspondentes às estirpes BR-I (GI-11) e Mass (GI-1). Novos alinhamentos independentes foram realizados para cada uma das duas estirpes referidas e o desenho de *primers* foi realizado com o auxílio da versão 7.0.5 do programa *Bioedit* (HALL, 1999).

Foram desenhados *primers* específicos para a estirpe BR-I, outros específicos para a estirpe Mass e um *primer* polivalente que incluiu às duas estirpes como alvo. As localizações dos *primers* foram definidas com o genoma de referência de IBV da estirpe Beaudette (código de acesso NC_001451) e se encontram detalhados no Quadro 1.

Quadro 1 – *Primers* desenhados para a detecção das estirpes BR-I e Mass

Primer	**Sequência 5´→3´**	**Polaridade**	**Localização no genoma***
RCH/B-F3	AGCTGGYGCTATYTAYTGGA	(+) Senso	20565 – 20584
RCH/B-R1	TATAAAACARACYRCTAGGA	(–) Antisenso	20788 – 20797
RCH/B-R3	TAARTCWCCATTYARGTACACA	(–) Antisenso	20865 – 20886
RCH/M-F5	ACTGCAYACTGTAACTTTTCA	(+) Senso	20662 – 20682
RCH/M-R8	ACAAGATCACCATTTAAATATACG	(–) Antisenso	20865 – 20888
RCH/U-F1	TTTTGTKTGYACYATGTAGTGC	(+) Senso	20399 – 20420

* Localização nucleotídica no genoma de referência NC_001451.

4.7.2 REAÇÃO SEMI-NESTED PCR PARA A DETECÇÃO DA ESTIRPE BR-I

A padronização desta PCR foi realizada com o controle da vacina correspondente à estirpe BR-I (CEVAC® IBras L, Ceva Saúde Animal Ltda.) e um controle negativo (PBS 0,1M, pH 7,4). Foi realizada a extração de RNA e a retrotranscrição randômica como indicado nos itens 4.5 e 4.6. Nesta reação foram utilizados os *primers* RCH/B-F3, RCH/B-R3 e RCH/B-R1.

A primeira amplificação, de PCR, foi realizada num volume final de 25µL, utilizando o kit *Platinum Taq* DNA *Polymerase* (Thermo Fisher Scientific Inc.). Foram adicionados 2,5µL do produto da retrotranscrição randômica ao *mix* de PCR, que incluía:

- 2,5µL de *buffer* PCR 10X;
- 4,0µL de dNTPS 1,25mM;
- 1,25µL do *primer* RCH/B-F3 10µM;
- 1,25µL do *primer* RCH/B-R3 10µM;

- 0,75µL de $MgCl_2$ 50mM;
- 0,125µL da enzima *Platinum Taq DNA Polymerase* 5U;
- 12,625µL de água ultrapura.

O programa no termociclador consistiu numa etapa de desnaturação inicial a 94°C por 3 minutos, seguidos de 36 ciclos às temperaturas de 94°C por 30 segundos, 52°C por 90 segundos e 72°C por 90 segundos correspondentes às etapas de desnaturação, hibridização e extensão, respectivamente; uma etapa de extensão final a 72°C por 10 minutos e a temperatura de estocagem de 4°C por tempo indefinido.

A segunda amplificação, de Semi-*Nested* PCR, foi realizada num volume final de 25µL, utilizando também o kit *Platinum Taq DNA Polymerase* (Thermo Fisher Scientific Inc.). Foram adicionados 2,5µL do produto da primeira amplificação de PCR ao *mix* de Semi-*Nested* PCR, que incluía:

- 2,5µL de *buffer* PCR 10X;
- 4,0µL de dNTPS 1,25mM;
- 1,25µL do *primer* RCH/B-F3 10µM;
- 1,25µL do *primer* RCH/B-R1 10µM;
- 0,75µL de $MgCl_2$ 50mM;
- 0,125µL da enzima *Platinum Taq* DNA *Polymerase* 5U;
- 12,625µL de água ultrapura.

O programa no termociclador consistiu numa etapa de desnaturação inicial a 94°C por 3 minutos, seguidos de 36 ciclos às temperaturas de 94°C por 30 segundos, 52°C por 90 segundos e 72°C por 90 segundos correspondentes às etapas de desnaturação, hibridização e extensão, respectivamente; uma etapa de extensão final a 72°C por 10 minutos e a temperatura de estocagem de 4°C por tempo indefinido.

Para a visualização, foram misturados 9,0µL do produto da reação de semi-*nested* PCR e 1,0µL de tampão de carregamento, e, submetidos em gel de agarose

1,5% a 10V para cada cm de gel, contendo o corante *SYBR Safe – DNA Gel Stain* (Thermo Fisher Scientific Inc.) e o marcador de peso molecular de *100pb DNA Ladder* (Thermo Fisher Scientific Inc.). No fotodocumentador, era esperada uma banda de 343pb corresponde ao fragmento produzido na primeira amplificação de PCR e o fragmento de 254pb corresponde ao fragmento produzido na segunda amplificação de semi-*nested* PCR.

4.7.3 REAÇÃO *DUPLEX* SEMI-*NESTED* PCR PARA A DETECÇÃO SIMULTÂNEA DAS ESTIRPES BR-I E MASS

A padronização desta PCR foi realizada com os controles das vacinas correspondentes às estirpes BR-I (CEVAC® IBras L, Ceva Saúde Animal Ltda.) e Mass (CEVAC® IBras L, Ceva Saúde Animal Ltda.), assim como, um controle negativo (PBS 0,1M, pH 7,4). Foi realizada a extração de RNA e a retrotranscrição randômica como indicado nos itens 4.5 e 4.6. Nesta reação foram utilizados os *primers* RCH/B-R3, RCH/M-R8, RCH/U-F1, RCH/B-F3 e RCH/M-F5.

A primeira amplificação, de PCR, foi realizada num volume final de 25µL, utilizando o kit *Platinum Taq DNA Polymerase* (Thermo Fisher Scientific Inc.). Foram adicionados 2,5µL do produto da retrotranscrição randômica ao *mix* de PCR, que incluía:

- 2,5µL de *buffer* PCR 10X;
- 4,0µL de dNTPS 1,25mM;
- 1,5µL do *primer* RCH/B-R3 10µM;
- 1,5µL do *primer* RCH/M-R8 10µM;
- 2,0µL do *primer* RCH/U-F1 10µM;
- 2,0µL de $MgCl_2$ 50mM;
- 0,25µL da enzima *Platinum Taq DNA Polymerase* 5U;
- 8,75µL de água ultrapura.

O programa no termociclador consistiu numa etapa de desnaturação inicial a 94°C por 3 minutos, seguidos de 38 ciclos às temperaturas de 94°C por 30

segundos, 51°C por 90 segundos e 72°C por 90 segundos correspondentes às etapas de desnaturação, hibridização e extensão, respectivamente; uma etapa de extensão final a 72°C por 10 minutos e a temperatura de estocagem de 4°C por tempo indefinido.

A segunda amplificação, de Semi-*Nested* PCR, foi realizada num volume final de 25µL, utilizando também o kit *Platinum Taq DNA Polymerase* (Thermo Fisher Scientific Inc.). Foram adicionados 2,5µL do produto da primeira amplificação de PCR ao *mix* de Semi-*Nested* PCR, que incluía:

- 2,5µL de *buffer* PCR 10X;
- 4,0µL de dNTPS 1,25mM;
- 2,5µL do *primer* RCH/B-F3 10µM;
- 2,5µL do *primer* RCH/B-R3 10µM;
- 2,5µL do *primer* RCH/M-F5 10µM;
- 2,5µL do *primer* RCH/M-R8 10µM;
- 2,0µL de $MgCl_2$ 50mM;
- 0,25µL da enzima *Platinum Taq DNA Polymerase* 5U;
- 4,75µL de água ultrapura.

O programa no termociclador consistiu numa etapa de desnaturação inicial a 94°C por 3 minutos, seguidos de 38 ciclos às temperaturas de 94°C por 30 segundos, 51°C por 90 segundos e 72°C por 90 segundos correspondentes às etapas de desnaturação, hibridização e extensão, respectivamente; uma etapa de extensão final a 72°C por 10 minutos e a temperatura de estocagem de 4°C por tempo indefinido.

Para a visualização, foram misturados 9,0µL do produto da reação de semi-*nested* PCR e 1,0µL de tampão de carregamento, e, submetido a gel de agarose 1,5% a 10V para cada cm de gel, contendo o corante *SYBR Safe – DNA Gel Stain* (Thermo Fisher Scientific Inc.) e o marcador de peso molecular de *100pb DNA Ladder* (Thermo Fisher Scientific Inc.). No fotodocumentador, eram esperadas as bandas de 509 e 343pb correspondem aos fragmentos produzidos na primeira e

segunda amplificação de PCR e semi-*nested* PCR da estirpe BR-I, respectivamente. No caso da estirpe Mass, eram esperadas as bandas de 490 e 227pb correspondentes aos fragmentos produzidos na primeira e segunda amplificação de PCR e semi-*nested* PCR.

4.7.4 SEQUÊNCIAMENTO DE DNA

Para se confirmar que os produtos das reações de semi-*nested* PCR e *duplex* semi-*nested* PCR eram correspondentes aos fragmentos esperados do gene S1, os produtos amplificados foram cortados, com uma lâmina de bisturi estéril, do gel de agarose 1,5% em um transiluminador de luz UV. A purificação dos produtos foi realizada com o *Illustra*^{TM} *GFX*^{TM} PCR *DNA and Gel Band Purification Kit* (GE Healthcare UK Ltd), de acordo às condições do fabricante. O produto purificado foi quantificado no NanoDrop^{TM} One (Thermo Fisher Scientific Inc.) para se verificar a concentração e a qualidade do mesmo. Adicionalmente, foi realizada uma eletroforese em gel de agarose 1,5% com o *Low DNA Mass Ladder* (Thermo Fisher Scientific Inc.) para se confirmar os tamanhos e a quantificação aproximada dos produtos.

Para o sequenciamento, as amostras com os *primers* senso ou antisenso foram encaminhadas ao Centro de Pesquisa sobre o Genoma Humano e Células-Tronco no Instituto de Biociências da USP, de acordo às instruções do mesmo. As sequências recebidas foram analisadas utilizando a versão 6.8.3 do programa CLC *Main Workbench* (https://www.qiagenbioinformatics.com/). A confirmação da identidade das sequências foi realizada submetendo as sequências ao *BLASTn* (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi) e comparando-as também às sequências de referência proposta por Valastro et al. (2016).

4.7.5 SENSIBILIDADE E ESPECIFICIDADE ANALÍTICA TÉCNICA DAS REAÇÕES DE PCR

Para se avaliar a sensibilidade das reações foram utilizados os produtos dos controles positivos de BR-I e Mass das primeiras amplificações de PCR conforme indicado nos itens 4.7.2 e 4.7.3 e purificados a partir do gel de agarose 1,5% como descrito no item 4.7.4. A concentração dos produtos purificados foi determinada no NanoDrop™ One (Thermo Fisher Scientific Inc.), em triplicata, para se estabelecer a média das leituras.

Para se estabelecer o número de cópias de DNA na amostra foi utilizada a seguinte fórmula:

$$Y = \frac{[\mathrm{DNA}] \times \mathrm{NA}}{\mathrm{LT} \times 660}$$

- [DNA] - corresponde à concentração de DNA expressa em ng/µL;
- NA - corresponde ao número de Avogadro (6,022 x 10^{23} moléculas/mol);
- LT - corresponde ao tamanho do produto amplificado expresso em número de nucleotídeos;
- 660 - é o peso molecular de dois nucleotídeos (2 pb em cadeia dupla) expresso em g/mol x pb.

A partir do estabelecimento do número de cópias de DNA (Y), foram realizadas diluições seriadas, usando o fator 10^{-1}, desde $1x10^{10}$ até $1x10^{0}$ cópias de DNA/µL, em volumes de 100µL. Posteriormente, foram realizadas as reações de semi-*nested* PCR (para a estirpe BR-I) e *duplex* semi-*nested* PCR (para as estirpes BR-I e Mass, misturadas na proporção 1:1 de cada uma) conforme as descrições nos itens 4.7.2 e 4.7.3.

Para se avaliar a especificidade das reações foram utilizadas as amostras correspondentes a outras estirpes do IBV (Q1, QX, D274, 793B) e também a outros vírus, bactérias que acometem as aves, todos especificados no item 4.2.

4.8 DETEÇÃO DAS ESTIRPES BR-I E MASS EM AMOSTRAS DE CAMPO

Para avaliar o desempenho das reações propostas no presente estudo, foram utilizadas as 582 amostras de campo. Foi realizada uma primeira triagem da parte terminal da região 3´ *untranslated* (UTR) do genoma dos coronavírus, fracção comum a todos os tipos de IBV, com uso dos *primers* UTR41+, UTR11- e UTR11- e as condições propostas por Cavanagh (CAVANAGH et al., 2002). As amostras positivas da referida reação foram submetidas às reações de *semi-nested* PCR e *duplex semi-nested* PCR, para detectar a presença das estirpes BR-I e Mass. A apresentação de tabelas e gráficos foi auxiliada com a versão 17.0.1 do programa Minitab® (“Minitab 17 Statistical Software”, 2010).

4.9 ANÁLISES FILOGENÉTICAS

A partir das amostras positivas foram escolhidas aquelas com melhor concentração para o sequenciamento dos fragmentos produzidos pela PCR, representativos das 5 regiões do Brasil.

O alinhamento foi realizado pela versão 7.313 do programa MAFFT (KATOH; STANDLEY, 2013), com o método de refinamento iterativo e lento. O resultado do alinhamento foi analisado e editado pela versão 6.8.3 do programa CLC *Main Workbench* (https://www.qiagenbioinformatics.com/) e pela versão 7.0.5 do programa *Bioedit* (HALL, 1999). A eleição do melhor modelo de substituição nucleotídica das sequências e a elaboração de uma árvore filogenética foi realizada com a versão 7.0.26 do programa MEGA (KUMAR; STECHER; TAMURA, 2016). Finalmente, foram realizadas matrizes de similaridade de nucleotídeos e de aminoácidos pela versão 6.8.3 do programa CLC *Main Workbench* (https://www.qiagenbioinformatics.com/), utilizando o genoma de referência NC_001451 para os fragmentos produzidos pela reação *duplex* semi-*nested* PCR.

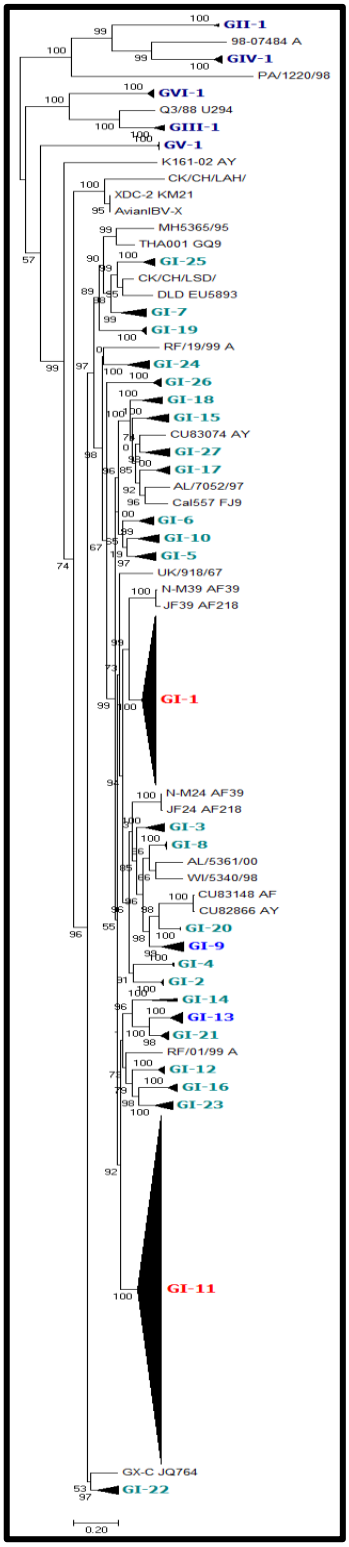
5 . RESULTADOS

5.1 SELECÇÃO DAS SEQUÊNCIAS DE REFERÊNCIA E DESENHO DE *PRIMERS*

O modelo de substituição nucleotídica escolhido pelo programa PhyML (GUINDON et al., 2010) foi o Tempo Geral Reversível (GTR), distribuição Gama (+G) e 4 categorias de taxa de substituição. O valor do Critério de Informação de Akaike (AIC) foi 190754,12892 e o Critério de Informação Bayesiano (BIC) foi 197871,50083.

A elaboração da árvore filogenética foi baseada na metodologia de *maximum-likelihood* utilizando o teste aproximado de taxa de verossimilhança (aLRT) dependente de procedimento semelhante a Shimodaira-Hasegawa (SH-like) para o suporte dos nodos e ramos internos, ferramentas disponíveis no programa PhyML (GUINDON et al., 2010). A distribuição das estirpes foi de acordo à Valastro (2016), e no caso das sequências de origem brasileira, 118 foram inclusas no grupo GI-1, aquela que inclui a estirpe Massachusetts (Mass), 249 das sequências foram inclusas no grupo GI-11, aquela associada à estirpe Brasileira (BR-I), enquanto que duas sequencias foram inclusas no grupo GI-13 e uma sequência no grupo GI-9 (Figura 4).

Figura 4 – Árvore filogenética de sequências parciais do gene S1 do IBV.



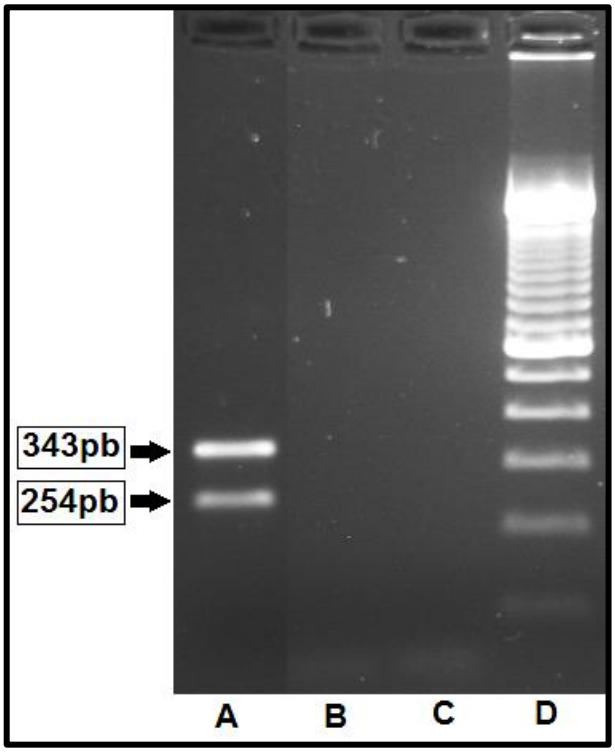
Fonte: (CHACÓN, R.D., 2017)

Legenda: A filogenia contém as 370 sequências de origem brasileira e as 199 propostas por Valastro et al (2016). Filogenia baseada no método de *maximum-likelihood*, utilizando teste de aLRT SH-like para o suporte dos ramos internos com os valores mostrados nos nodos. A barra de escala representa o número de substituições nucleotídicas por sítio. As sub-árvores representando as estirpes de IBV foram comprimidas. As variantes únicas (VU) são apresentadas em letras negras. Os grupos principais GI-1 e GI-11 são apresentados com letras vermelhas.

5.2 REAÇÃO SEMI-*NESTED* PCR PARA A DETECÇÃO DA ESTIRPE BR-I

A técnica de semi-*nested* PCR desenvolvida neste trabalho foi capaz de detectar o cDNA transcrito a partir do genoma viral de RNA da estirpe BR-I do vírus da bronquite infecciosa das galinhas. O par de *primers* RCH/B-F3 e RCH/B-R3 na primeira reação de PCR produziram um fragmento de 343pb que é específico da estirpe BR-I, enquanto o par de *primers* RCH/B-F3 e RCH/B-R1 na segunda reação de semi-*nested* PCR produziram um fragmento de 254pb que também é específico desta estirpe (Figura 5). Os dois fragmentos são indicativos da presença da estirpe BR-I, ou fragmentos de diagnóstico.

Figura 5 – Eletroforese em gel de agarose 1,5% dos produtos da reação de semi-*nested* PCR para a detecção da estirpe BR-I do IBV.



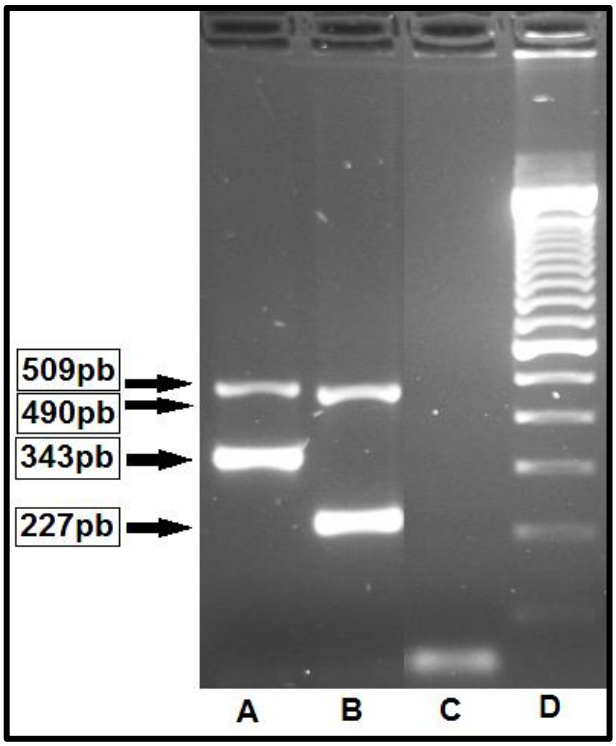
Fonte: (CHACÓN, R.D., 2017)

Legenda: Coluna A: controle positivo (vacina BR-I); Coluna B: controle diferencial (vacina Mass); Coluna C: controle negativo (PBS); Coluna D: Peso molecular (100 *bp DNA Ladder*).

5.3 REAÇÃO DE *DUPLEX* SEMI-*NESTED* PCR PARA A DETECÇÃO SIMULTÂNEA DAS ESTIRPES BR-I E MASS

A técnica de *duplex* semi-*nested* PCR desenvolvida neste trabalho foi capaz de detectar os cDNA transcritos a partir dos genomas virais de RNA das estirpes BR-I e Mass do vírus da bronquite infecciosa das galinhas. Na detecção da estirpe BR-I, o par de *primers* RCH/U-F1 e RCH/B-R3 na primeira reação de PCR produziram um fragmento de 509pb, enquanto o par de *primers* RCH/B-F3 e RCH/B-R3 na segunda reação de semi-*nested* PCR produziram um fragmento de 343pb que é específico da estirpe BR-I (Figura 6).

Figura 6 – Eletroforese em gel de agarose 1,5% dos produtos da reação de *duplex* semi-*nested* PCR para a detecção das estirpes BR-I e Mass do IBV.



Fonte: (CHACÓN, R.D., 2017)

Legenda: Coluna A: controle positivo (vacina BR-I); Coluna B: controle positivo (vacina Mass); Coluna C: controle negativo (PBS); Coluna D: Peso molecular (100 *bp DNA Ladder*).

Na detecção da estirpe Mass, o par de *primers* RCH/U-F1 e RCH/M-R8 na primeira reação de PCR produziram um fragmento de 490pb, enquanto o par de

primers RCH/M-F5 e RCH/M-R8 na segunda reação de semi-*nested* PCR produziram um fragmento de 227pb que é específico da estirpe Mass (Figura 6). Como o *primer* senso é polivalente, comum às duas estirpes, apenas os fragmentos da segunda reação de semi-*nested* PCR são os fragmentos de diagnóstico diferencial.

5.4 SEQUÊNCIAMENTO DE DNA

Após o sequenciamento, a montagem e a edição de todos os fragmentos purificados das reações de semi-*nested* PCR e *duplex* semi-*nested* PCR para as duas estirpes em estudo, estas foram submetidas individualmente ao *BLASTn*. Na tabela 2 são mostradas as comparações entre as sequências submetidas e as sequências de maior semelhança obtida pelo *BLASTn*, assim como, os valores de comparação (Tabela 2).

Tabela 2 – Análise pelo *BLASTn* dos produtos sequenciados das reações de PCR propostas no presente estudo.

Fragmento de PCR	Tamanho	Valor E	% Identidade	Estirpe Referida	Código de Acesso
B1	343pb	5e-178	100%	BR-I	KY626044
B2	254pb	1e-128	100%	BR-I	KY626044
B3	509pb	0.0	100%	BR-I	KY626044
B4	343pb	5e-178	100%	BR-I	KY626044
M1	490pb	0.0	99%	Mass	KX529712
M2	227pb	4e-112	99%	Mass	KX529712

Fonte: (CHACÓN, R.D., 2017)

Legenda: B1: Fragmento de PCR do controle positivo da reação exclusiva de BR-I; B2: Fragmento de semi-*nested* PCR do controle positivo da reação exclusiva de BR-I; B3: Fragmento de PCR do controle positivo BR-I da reação *duplex*; B4: Fragmento de *duplex* semi-*nested* PCR do controle positivo BR-I; M1: Fragmento de PCR do controle positivo Mass da reação *duplex*; M2: Fragmento de *duplex* semi-*nested* PCR do controle positivo Mass. Valor E: valor esperado.

A sequência B2 se encontrou incluída nas sequências B1 e B4, e estas foram idênticas entre elas por utilizar o mesmo controle e os mesmos *primers*, ademais, ambos se encontraram incluídas na sequência B3. Da mesma maneira, a sequência M2 se encontrou incluída na sequência M1.

5.5 SENSIBILIDADE E ESPECIFICIDADE ANALÍTICA TÉCNICA DAS REAÇÕES DE PCR

Antes de avaliar a sensibilidade das reações foram feitos os cálculos para se realizar as diluições dos controles positivos de BR-I e Mass das primeiras amplificações de PCR conforme indicado nos itens 4.7.2 e 4.7.3. Na tabela 3 estão indicados os valores dos parâmetros utilizados.

Tabela 3 – Parâmetros utilizados na avaliação da sensibilidade das reações.

Fragmento de PCR	LT (pb)	[DNA] (ng/µL)	Y (cópias/ µL)	1°-V amostra (µL)	1°-V água ultra pura (µL)	1°-[DNA] (ng/µL)
B1	343	85,24	$2,27 \times 10^{11}$	4,41	95.59	3,76
B3	509	70,29	$1,26 \times 10^{11}$	7,94	92,06	5,58
M1	490	67,25	$1,25 \times 10^{11}$	7,99	92,01	5,37

Fonte: (CHACÓN, R.D., 2017)

Legenda: B1: Fragmento de PCR do controle positivo da reação exclusiva de BR-I; B3: Fragmento de PCR do controle positivo BR-I da reação *duplex*; M1: Fragmento de PCR do controle positivo Mass da reação *duplex*. LT: tamanho do produto amplificado; [DNA]: concentração de DNA; Y: número de cópias de DNA/µL; 1°-V: volume na primeira diluição. 1°-[DNA]: concentração de DNA na primeira diluição.

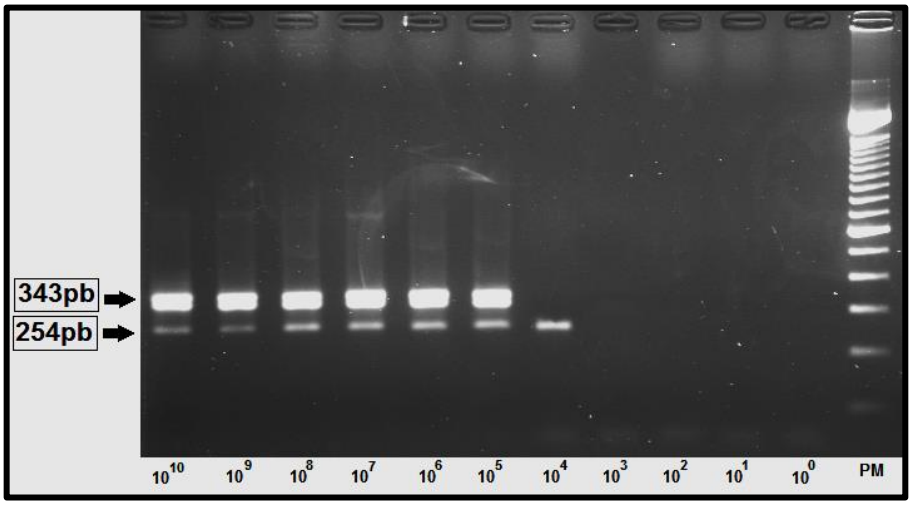
Na reação de semi-*nested* PCR específica para a estirpe BR-I foi possível se observar os dois produtos de diagnóstico até a diluição de 10^5 cópias de DNA/µL, enquanto que na diluição de 10^4 foi observado apenas o produto da segunda amplificação (semi-*nested*) (Figura 7).

Na reação de *duplex* semi-*nested* PCR de ambas estirpes foi possível se observar os dois produtos amplificados da reação para cada estirpe até as diluições de 10^5 cópias de DNA/µL, enquanto que nas diluições de 10^4 foram observados apenas o produto de diagnóstico, da segunda amplificação (*duplex* semi-*nested*) (Figura 8).

Por conseguinte, ambas as reações propostas no presente estudo foram capazes de detectar o IBV a partir de 10.000 cópias de DNA/µL. Considerando as concentrações no começo das diluições e as suas respectivas concentrações nas diluições de 10^4 cópias de DNA/µL, as concentrações mínimas de cDNA detectáveis seriam de 3,76fg/µL para a reação de semi-*nested* PCR exclusiva para a estirpe

BR-I; 5,58fg/µL para a estirpe BR-I na reação de *duplex* semi-*nested* PCR e 5,57fg/µL para a estirpe Mass na reação de *duplex* semi-*nested* PCR.

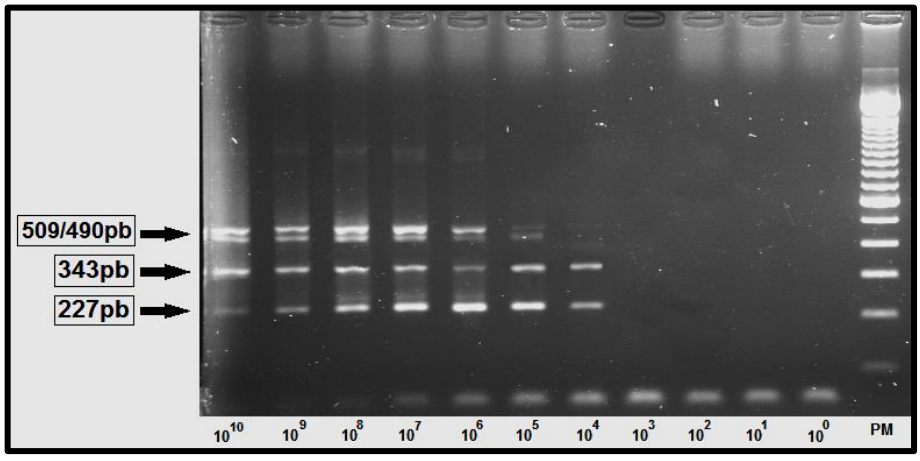
Figura 7 – Eletroforese em gel de agarose 1,5% para se avaliar a sensibilidade dos produtos da reação de semi-*nested* PCR para a detecção da estirpe BR-I do IBV.



Fonte: (CHACÓN, R.D., 2017)

Legenda: Cada coluna representa uma diluição de maior concentração para menor concentração, no sentido de esquerda à direita do controle positivo da estirpe BR-I. Coluna PM: Peso molecular (100 *bp DNA Ladder*).

Figura 8 – Eletroforese em gel de agarose 1,5% para se avaliar a sensibilidade dos produtos da reação de *duplex* semi-*nested* PCR para a detecção das estirpes BR-I e Mass do IBV.



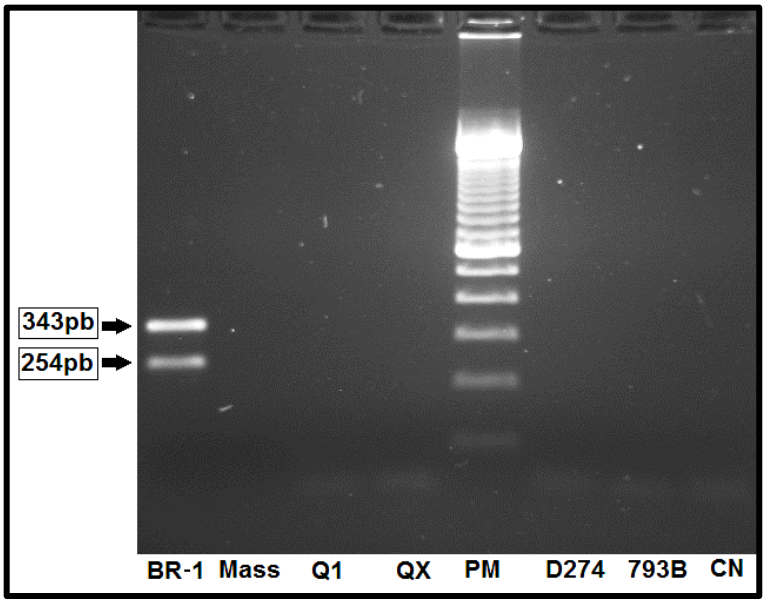
Fonte: (CHACÓN, R.D., 2017)

Legenda: Cada coluna representa uma diluição de maior concentração para menor concentração, no sentido de esquerda à direita dos controles positivos das estirpes BR-I e Mass. Coluna PM: Peso molecular (100 *bp DNA Ladder*).

Para se avaliar a especificidade, foi realizado o diagnóstico diferencial em ambas reações, com os controles correspondentes a outras estirpes do IBV (Q1, QX, D274, 793B), de bactérias ou vírus (ou provírus) DNA, e também de outros vírus RNA que infectam as aves. As reações mostraram ótima especificidade, pois não ocorreu amplificação de fragmentos de diagnóstico. A figura 9 e 10 mostram a amplificação de outras estirpes do IBV, assim como, de outros agentes infecciosos (Figuras 11, 12, 13 e 14) nas reações de semi-*nested* PCR e *duplex* semi-*nested* PCR, específicas para as estirpes BR-I e BR-I em simultâneo a Mass.

Na reação de *duplex* semi-*nested* PCR, nas colunas correspondentes às estirpes D274 e 793B foi possível se observar apenas as bandas da primeira reação, por causa do uso do *primer* polivalente RCH/U-F1, porém, não ocorreu amplificação do produto de diagnóstico, na segunda reação.

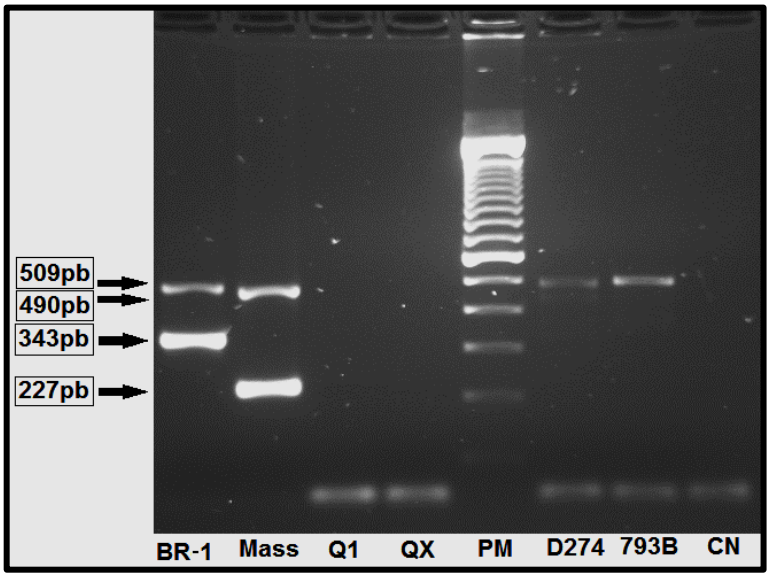
Figura 9 – Eletroforese em gel de agarose 1,5% para se avaliar a especificidade dos produtos da reação de semi-*nested* PCR para a detecção da estirpe BR-I frente a outras estirpes do IBV.



Fonte: (CHACÓN, R.D., 2017)

Legenda: BR-I: estirpe BR-I do IBV; Mass: estirpe Mass do IBV; Q1: estirpe Q1 do IBV; QX: estirpe QX do IBV; D274: estirpe D274 do IBV; 793B: estirpe 793B do IBV; CN: controle negativo. PM: Marcador de peso molecular (100 *bp DNA Ladder*).

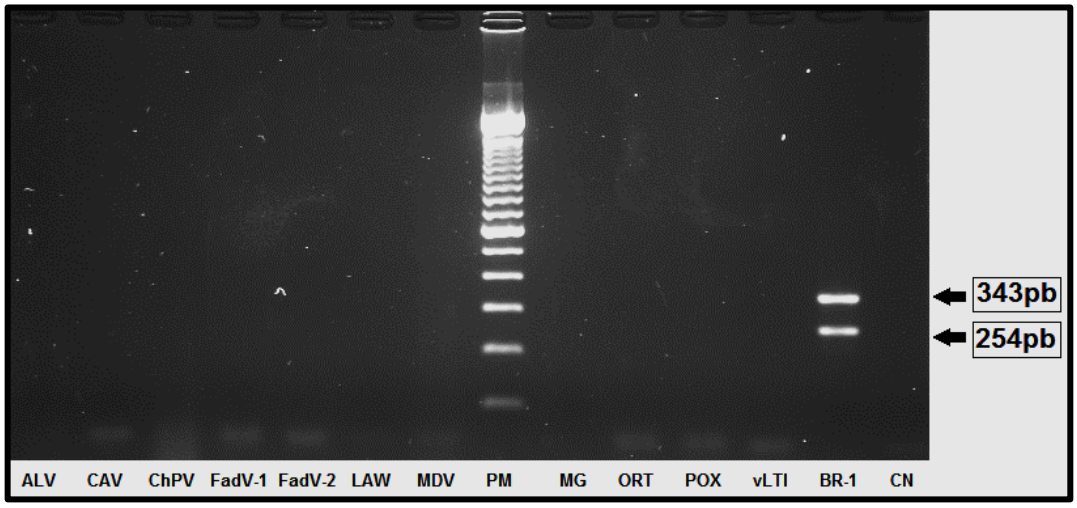
Figura 10 – Eletroforese em gel de agarose 1,5% para se avaliar a especificidade dos produtos da reação de *duplex* semi-*nested* PCR para a detecção das estirpes BR-I e Mass frente a outras estirpes do IBV.



Fonte: (CHACÓN, R.D., 2017)

Legenda: BR-I: estirpe BR-I do IBV; Mass: estirpe Mass do IBV; Q1: estirpe Q1 do IBV; QX: estirpe QX do IBV; D274: estirpe D274 do IBV; 793B: estirpe 793B do IBV; CN: controle negativo. PM: Marcador de peso molecular (100 *bp DNA Ladder*).

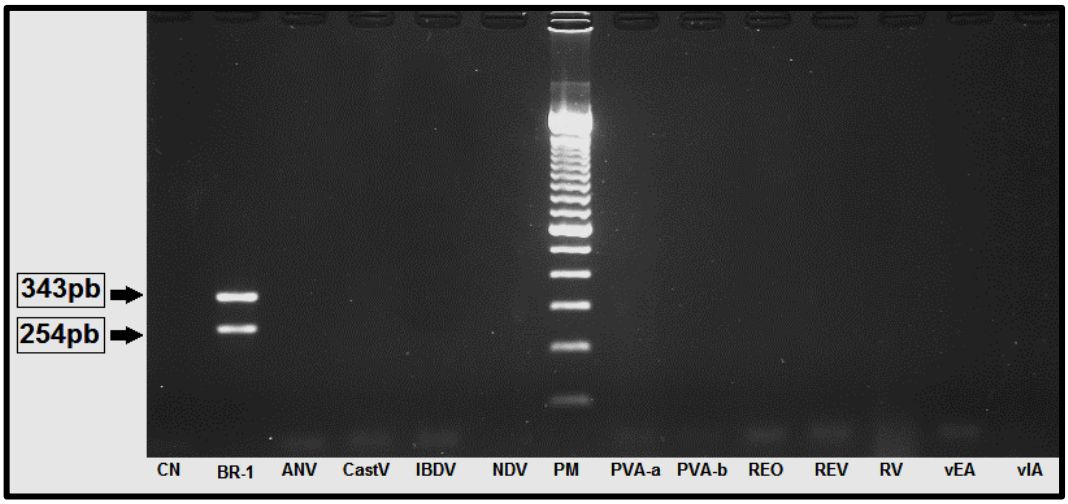
Figura 11 – Eletroforese em gel de agarose 1,5% para se avaliar a especificidade dos produtos da reação de semi-*nested* PCR para a detecção da estirpe BR-I do IBV frente a outros agentes infecciosos DNA.



Fonte: (CHACÓN, R.D., 2017)

Legenda: ALV: provírus da leucose aviária; CAV: vírus da anemia infecciosa das galinhas; ChPV: parvovírus de galinha; FadV-1: adenovírus grupo I; Fadv-2: adenovírus grupo II; LAW: *Lawsonia intracellularis*; MDV: vírus da doença de Marek; MG: *Mycoplasma gallisepticum*; ORT: *Ornithobacterium rhinotracheale*; POX: poxvírus; vLTI: vírus da laringotraqueíte infecciosa; BR-I: controle positivo da estirpe BR-I do IBV; CN: controle negativo. PM: peso molecular (100 *bp DNA Ladder*).

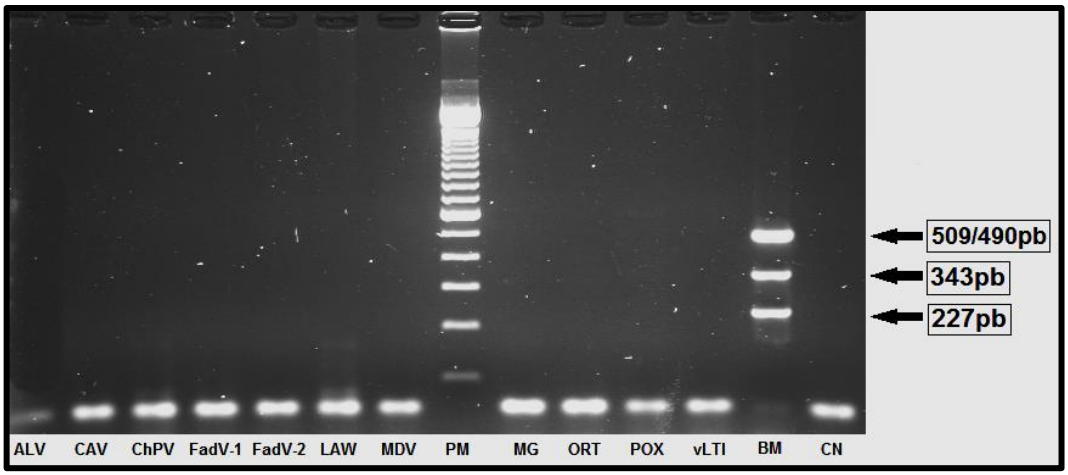
Figura 12 – Eletroforese em gel de agarose 1,5% para se avaliar a especificidade dos produtos da reação de semi-*nested* PCR para a detecção da estirpe BR-I do IBV frente a outros agentes infecciosos de tipo ARN.



Fonte: (CHACÓN, R.D., 2017)

Legenda: ANV: vírus da nefrite aviária; CAstV: astrovírus de galinha; IBDV: vírus da doença infecciosa da Bursa; NDV: vírus da doença de Newcastle; PVA-a: metapneumovírus aviário subtipo A; PVA-b: metapneumovírus aviário subtipo B; REO: reovírus; REV: vírus da reticuloendoteliose aviária; RV: rotavírus; vEA: vírus da encefalomielite aviária; vIA: vírus da influenza aviária; BR-I: controle positivo da estirpe BR-I de IBV; CN: controle negativo. PM: Peso molecular (100 *bp DNA Ladder*).

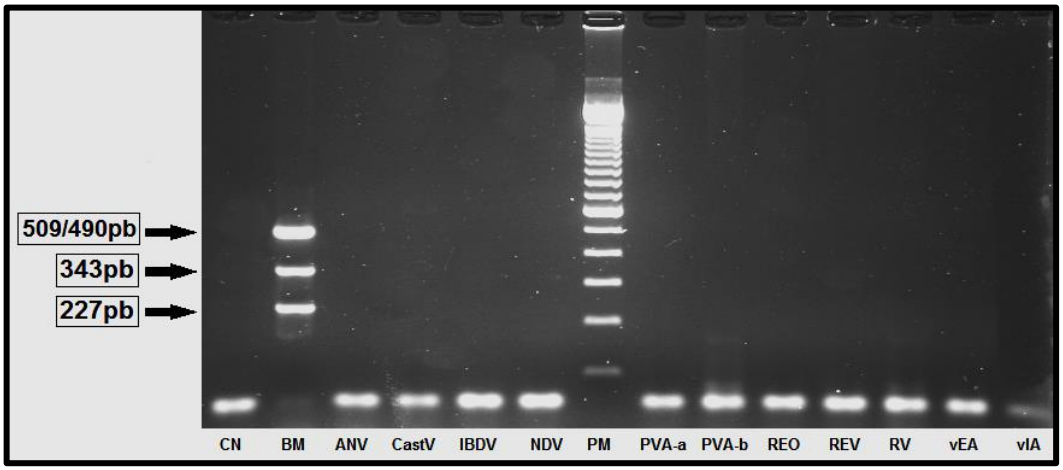
Figura 13 – Eletroforese em gel de agarose 1,5% para se avaliar a especificidade dos produtos da reação de *duplex* semi-*nested* PCR para a detecção das estirpes BR-I e Mass do IBV frente a outros agentes infecciosos DNA.



Fonte: (CHACÓN, R.D., 2017)

Legenda: ALV: provírus da leucose aviária; CAV: vírus da anemia infecciosa das galinhas; ChPV: parvovírus de galinha; FadV-1: adenovírus grupo I; Fadv-2: adenovírus grupo II; LAW: *Lawsonia intracellularis*; MDV: vírus da doença de Marek; MG: *Mycoplasma gallisepticum*; ORT: *Ornithobacterium rhinotracheale*; POX: poxvírus; vLTI: vírus da laringotraqueíte infecciosa; BR-I: controle positivo da estirpe BR-I do IBV; CN: controle negativo. PM: peso molecular (100 *bp DNA Ladder*).

Figura 14 – Eletroforese em gel de agarose 1,5% para se avaliar a especificidade dos produtos da reação de *duplex* semi-*nested* PCR para a detecção das estirpes BR-I e Mass do IBV frente a outros agentes infecciosos de tipo RNA.



Fonte: (CHACÓN, R.D., 2017)

Legenda: ANV: vírus da nefrite aviária; CAstV: astrovírus de galinha; IBDV: vírus da doença infecciosa da Bursa; NDV: vírus da doença de Newcastle; PVA-a: metapneumovírus aviário subtipo A; PVA-b: metapneumovírus aviário subtipo B; REO: reovírus; REV: vírus da reticuloendoteliose aviária; RV: rotavírus; vEA: vírus da encefalomielite aviária; vIA: vírus da influenza aviária; BR-I: controle positivo da estirpe BR-I de IBV; CN: controle negativo. PM: Peso molecular (100 *bp DNA Ladder*).

5.6 DETECÇÃO DAS ESTIRPES BR-I E MASS EM AMOSTRAS DE CAMPO

5.6.1 TRIAGEM POR REAÇÃO DE *RT*-PCR POR SEGMENTO DA REGIÃO 3´UTR DE CORONAVÍRUS

A triagem de 572 amostras de campo, com reação para Coronavírus, sendo o alvo o segmento do gene *3'*UTR, detectou 62,24% (356/572) amostras positivas para este gênero.

Segundo o tipo de pool de órgão (Tabela 4), Coronavírus foi detectado em três amostras de cornetos nasais (100%), n=03; em duas amostras de duodeno (66,67%), n=03; em 14 amostras de intestinos (82,35%), n=17; em duas amostras de pâncreas (66,67%), n=03; em três amostras de proventrículo (60,00%), n=05; em 13 amostras de pulmões (56,52%), n=23; em cinco amostras de sistemas reprodutores (83,33%), n=06; em 10 amostras de rins (43,48%), n=23; em 212 amostras de suabes de cloaca (70,07%), n=304; em três amostras de suabes de

traqueia (75,00%), n=04; em 52 amostras de tonsilas cecais (50,98%), n=102 e em 36 amostras de traqueias (47,37%), n=76. Não houve a detecção deste vírus nos pools de coração (0/1), fígado (0/1) e pálpebras (0/1).

Tabela 4 – Frequência de Coronavírus, segundo o tipo de órgão.

Órgãos	**Positivo**		**Negativo**		**Total**
	n	**%**	**n**	**%**	**n**
Coração	0	0,00	1	100,00	**1**
Cornetos nasais	3	100,00	0	0,00	**3**
Duodenos	2	66,67	1	33,33	**3**
Fígados	0	0,00	1	100,00	**1**
Intestinos	14	82,35	3	17,65	**17**
Pálpebras	0	0,00	1	100,00	**1**
Pâncreas	2	66,67	1	33,33	**3**
Proventrículos	3	60,00	2	40,00	**5**
Pulmões	13	56,52	10	43,48	**23**
Sistemas reprodutores	5	83,33	1	16,67	**6**
Rins	10	43,48	13	56,52	**23**
Suabes de cloaca	213	70,07	91	29,93	**304**
Suabes de traqueia	3	75,00	1	25,00	**4**
Tonsilas cecais	52	50,98	50	49,02	**102**
Traqueias	36	47,37	40	52,63	**76**
Total	**356**		**216**		**572**

Fonte: (CHACÓN, R.D., 2017)

Considerando a origem geográfica das amostras (Tabela 5), Coronavírus foi detectado na frequência de 60,00% na região Centro-oeste (33/55), 54,55% na região Norte (6/11), 49,32% na região Nordeste (73/148), 64,29% na região Sul (9/14), e 67,53% na região Sudeste (208/308). Em 36 amostras a origem não foi informada e ocorreu a presença de Coronavírus em 75,00% (27/36) delas.

Tabela 5 – Frequência de Coronavírus, segundo a região geográfica.

Região	**Positivo**		**Negativo**		**Total**
	n	**%**	**N**	**%**	**n**
Centro-oeste	33	60,00	22	40,00	**55**
Norte	6	54,55	5	45,45	**11**
Nordeste	73	49,32	75	50,68	**148**
Sul	9	64,29	5	35,71	**14**
Sudeste	208	67,53	100	32,47	**308**
Não informada	27	75,00	9	25,00	**36**
Total	**356**		**216**		**572**

Fonte: (CHACÓN, R.D., 2017)

Segundo o tipo de criação (Tabela 6), Coronavírus foi detectado na frequência de 66,57% das amostras proveniente de frangos de corte (219/329), em 57,07% das amostras de poedeiras comerciais (109/191), e em 53,85% das amostras de matrizes (7/13). Nas amostras sem a informação do tipo de criação ocorreu 53,85% (21/39) amostras positivas para este gênero.

Tabela 6 – Frequência de Coronavírus, segundo o tipo de criação.

Criação	**Positivo**		**Negativo**		**Total**
	N	**%**	**n**	**%**	**N**
Frangos de corte	219	66,57	110	33,43	**329**
Poedeiras comerciais	109	57,07	82	42,93	**191**
Matrizes	7	53,85	6	46,15	**13**
Não informada	21	53,85	18	46,15	**39**
Total	**356**		**216**		**572**

Fonte: (CHACÓN, R.D., 2017)

5.6.2 REAÇÃO DE SEMI-*NESTED* PCR PARA A DETECÇÃO DA ESTIRPE BR-I

Todas as amostras positivas para o gene *3'*UTR foram analisadas nesta reação, e 84,83% (302/356) amostras foram positivas para a estirpe BR-I.

Segundo o tipo de *pool* de órgão (Tabela 7, Gráfico 1), a estirpe BR-I do IBV foi detectada em três amostras de cornetos nasais (100%), n=03; em duas amostras de duodeno (100,00%), n=02; em nove amostras de intestinos (64,29%), n=14; em duas amostras de pâncreas (100,00%), n=02; em três amostras de proventrículos

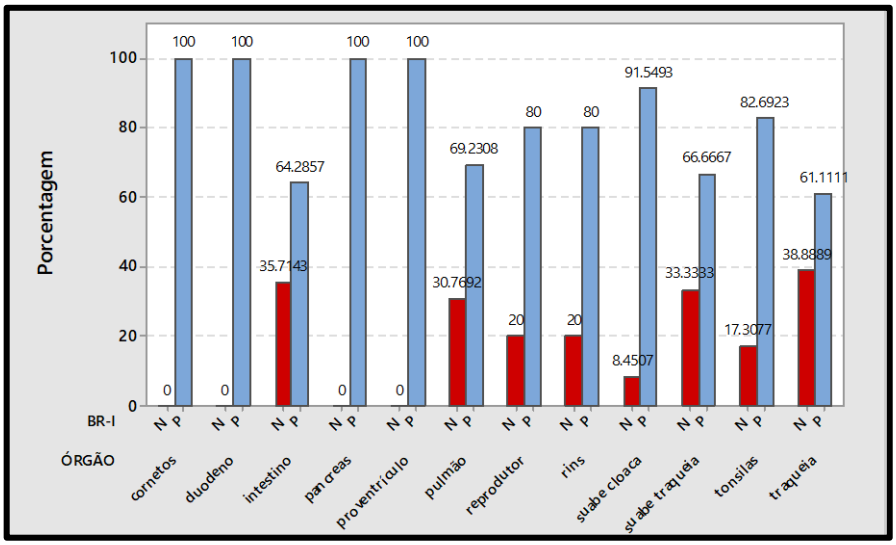
(100,00%), n=03; em nove amostras de pulmões (69,23%), n=13; em quatro amostras de sistemas reprodutores (80,00), n=05; em oito amostras de rins (80,00%), n=10; em 195 amostras de suabes de cloaca (91,55%), n=213; em duas amostras de suabes de traqueia (66,67%), n=03; em 43 amostras de tonsilas cecais (82,69%), n=52 e em 22 amostras de traqueias (61,11%), n=36.

Tabela 7 – Frequência da estirpe BR-I do IBV, segundo o tipo de órgão.

Órgãos	**Positivo**		**Negativo**		**Total**
	n	**%**	**n**	**%**	**n**
Cornetos nasais	3	100,00	0	0,00	**3**
Duodenos	2	100,00	0	0,00	**2**
Intestinos	9	64,29	5	35,71	**14**
Pâncreas	2	100,00	0	0,00	**2**
Proventrículos	3	100,00	0	0,00	**3**
Pulmões	9	69,23	4	30,77	**13**
Sistemas reprodutores	4	80,00	1	20,00	**5**
Rins	8	80,00	2	20,00	**10**
Suabes de cloaca	195	91,55	18	8,45	**213**
Suabes de traqueia	2	66,67	1	33,33	**3**
Tonsilas cecais	43	82,69	9	17,31	**52**
Traqueias	22	61,11	14	38,89	**36**
Total	**302**		**54**		**356**

Fonte: (CHACÓN, R.D., 2017)

Gráfico 1 – Frequência da estirpe BR-I do IBV, segundo o tipo de órgão.



Fonte: (CHACÓN, R.D., 2017)

Legenda: N: negativo; P: positivo; BR-I: estirpe BR do IBV.

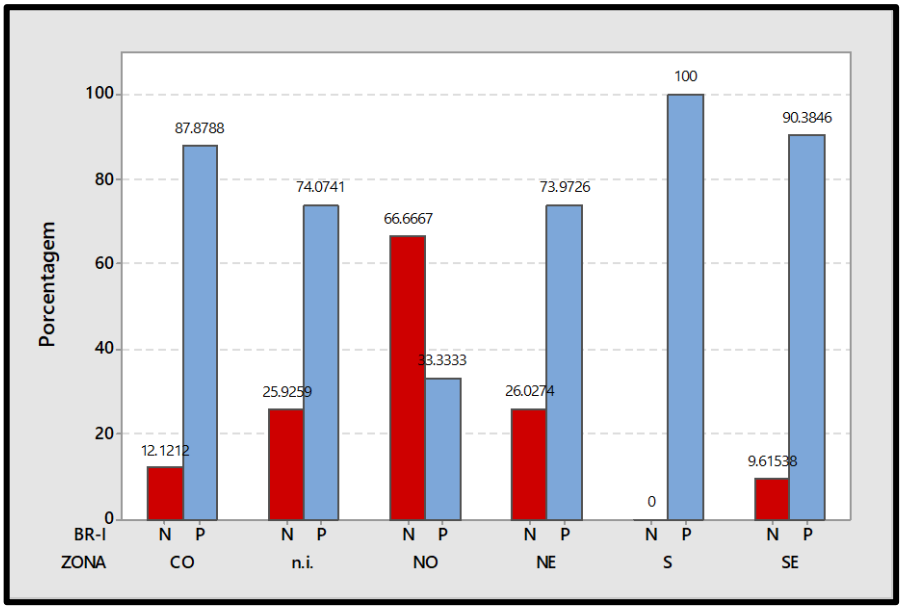
Segundo a região geográfica de origem das amostras (Tabela 8, Gráfico 2), a estirpe BR-I do IBV foi detectada na frequência de 87,88% das amostras provenientes da região Centro-Oeste (29/33), em 33,33% das amostras da região Norte (2/6), em 73,97% das amostras da região Nordeste (54/73), em 100,00% das amostras da região Sul (9/9), e em 90,38% das amostras da região Sudeste (188/208). Nas amostras com origem não foi informada ocorreu a presença da estirpe BR-I em 74,07% (20/27) delas.

Tabela 8 – Frequência da estirpe BR-I do IBV, segundo a região geográfica.

Região	**Positivo**		**Negativo**		**Total**
	n	**%**	**n**	**%**	**n**
Centro-oeste	29	87,88	4	12,12	**33**
Norte	2	33,33	4	66,67	**6**
Nordeste	54	73,97	19	26,03	**73**
Sul	9	100,00	0	0,00	**9**
Sudeste	188	90,38	20	9,62	**208**
Não informada	20	74,07	7	25,93	**27**
Total	**302**		**54**		**356**

Fonte: (CHACÓN, R.D., 2017)

Gráfico 2 – Frequência da estirpe BR-I do IBV, segundo a região geográfica.



Fonte: (CHACÓN, R.D., 2017)

Legenda: BR-I: estirpe BR-I do IBV; N: negativo; P: positivo; CO: centro-oeste; n.i: não informado; NO: norte; NE: nordeste; S: sul; SE: sudeste.

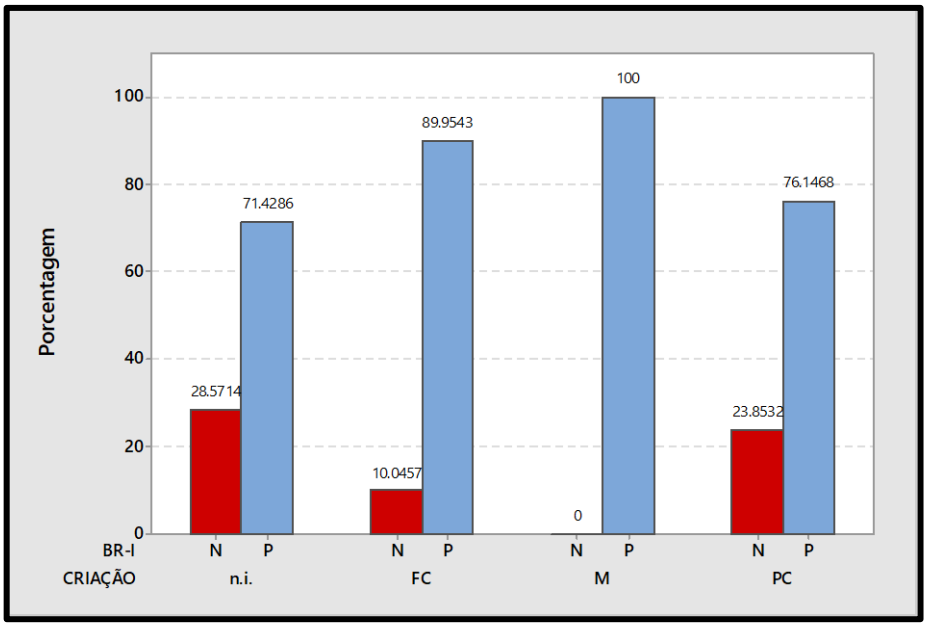
Segundo o tipo de criação (Tabela 9, Gráfico 3), a estirpe BR-I do IBV foi detectada na frequência de 89,95% das amostras provenientes de frangos de corte (197/219), em 76,15% das amostras de poedeiras comerciais (83/109), e em 100,00% das amostras de matrizes (7/7). Nas amostras sem a informação do tipo de criação ocorreu a presença da estirpe BR-I em 71,43% (15/21) das amostras.

Tabela 9 – Frequência da estirpe BR-I do IBV, segundo o tipo de criação.

Criação	**Positivo**		**Negativo**		**Total**
	N	**%**	**n**	**%**	**n**
Frangos de corte	197	89,95	22	10,05	**219**
Poedeiras comerciais	83	76,15	26	23,85	**109**
Matrizes	7	100,00	0	0.00	**7**
Não informada	15	71,43	6	28,57	**21**
Total	**302**		**54**		**356**

Fonte: (CHACÓN, R.D., 2017)

Gráfico 3 – Frequência da estirpe BR-I do IBV, segundo o tipo de criação.



Fonte: (CHACÓN, R.D., 2017)

Legenda: BR-I: estirpe BR-I do IBV; N: negativo; P: positivo; n.i: não informado; FC: frango de corte; M: matriz; PC: postura comercial.

5.6.3 REAÇÃO DE *DUPLEX* SEMI-*NESTED* PCR PARA A DETECÇÃO SIMULTÂNEA DAS ESTIRPES BR-I E MASS

Nesta reação foram testadas 136 amostras, positivas na detecção do gene 3´UTR, das quais 90,44% (123/136) foram positivas para pelo menos uma das estirpes estudadas (BR-I e/ou Mass). Dentre as 136 amostras estudadas, em 89 amostras foi detectada a presença da estirpe BR-I (65,44%), em 10 amostras a presença da estirpe Mass (7,35%), em 24 amostras ocorreu a detecção das duas estirpes virais (17,65%) e 13 amostras se apresentaram negativas (9,56%).

Segundo o tipo de *pool* de órgão (Tabela 10, Gráfico 4), em três amostras de intestinos estudadas, uma apresentou o genótipo BR-I, uma o genótipo Mass e a outra apresentava as duas estirpes virais. Em duas amostras de pulmões, apenas uma amostra apresentava os dois genótipos estudados. Nas amostras de suabes de cloaca, 76,25% (61/80) apresentaram o genótipo BR-I, 3,75% (3/80) apresentaram o genótipo Mass, 17,50% (14/80) apresentaram os dois genótipos e 2,50% (2/80) amostras foram negativas. Em uma amostra de suabes de traqueia foi detectada a estirpe Mass. Nas amostras de tonsilas cecais, 63,64% (21/33) apresentaram a estirpe BR-I, 6,06% (2/33) apresentaram o genótipo Mass, 12,12% (4/33) apresentavam os dois genótipos e 18,18% (6/33) amostras foram negativas. Nas amostras de traqueias, 35,26% (6/17) apresentaram a estirpe BR-I, 17,65% (3/17) apresentavam o genótipo Mass, em 23,53% (4/17) ocorreu a presença das duas estirpes virais e 23,53% (4/17) amostras foram negativas nesta reação.

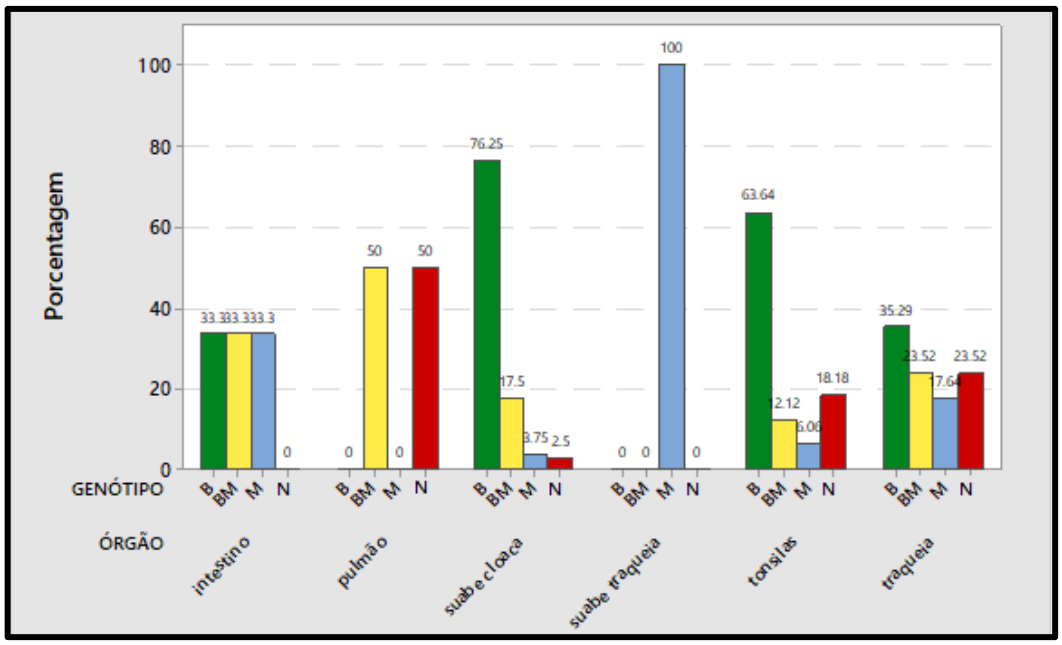
Tabela 10 – Frequência das estirpes BR-I e Mass do IBV, segundo o tipo de órgão.

Órgãos	B		M		BM		N		Total
	n	**%**	**n**	**%**	**n**	**%**	**n**	**%**	**n**
Intestinos	1	33,33	1	33,33	1	33,33	0	0,00	**3**
Pulmões	0	0,00	0	0,00	1	50,00	1	50,00	**2**
Suabes de cloaca	61	76,25	3	3,75	14	17,50	2	2,50	**80**
Suabes de traqueia	0	0,00	1	100,00	0	0,00	0	0,00	**1**
Tonsilas cecais	21	63,64	2	6,06	4	12,12	6	18,18	**33**
Traqueias	6	35,26	3	17,65	4	23,53	4	23,53	**17**
Total	**89**	**65,44**	**10**	**7,35**	**24**	**17,65**	**13**	**9,56**	**136**

Fonte: (CHACÓN, R.D., 2017)

Legenda: B: estirpe BR-I do IBV; M: estirpe Mass do IBV; BM: estirpes BR-I e Mass do IBV em simultâneo; N: amostra negativa.

Gráfico 4 – Frequência das estirpes BR-I e Mass do IBV, segundo o tipo de órgão.



Fonte: (CHACÓN, R.D., 2017)

Legenda: B: estirpe BR-I do IBV; M: estirpe Mass do IBV; BM: estirpes BR-I e Mass do IBV em simultâneo; N: amostra negativa.

Segundo a região geográfica de origem das amostras (Tabela 11, Gráfico 5), de quatro amostras provenientes da região Norte, apenas uma (25,00%) apresentou o genótipo Mass, enquanto três amostras foram negativas nesta reação. Nas amostras da região Nordeste, 46,88% (15/32) apresentaram a estirpe BR-I, 15,63% (5/32) apresentaram a estirpe Mass, 25,00% (8/32) apresentavam as duas estirpes virais e 12,50% (4/32) amostras foram negativas nesta reação. Entre as amostras da região Sudeste, 69,62% (55/79) apresentaram o genótipo BR-I, 3,80% (3/79) apresentaram o genótipo Mass, 18,99% (15/79) apresentavam os dois genótipos e 9,56% (6/79) amostras apresentavam reação negativa. Nas amostras com origem não foi informada, 90,48% (19/21) apresentaram o genótipo BR-I, 4,76% (1/21) apresentaram o genótipo Mass e 4,76% (1/21) apresentaram as duas estirpes virais.

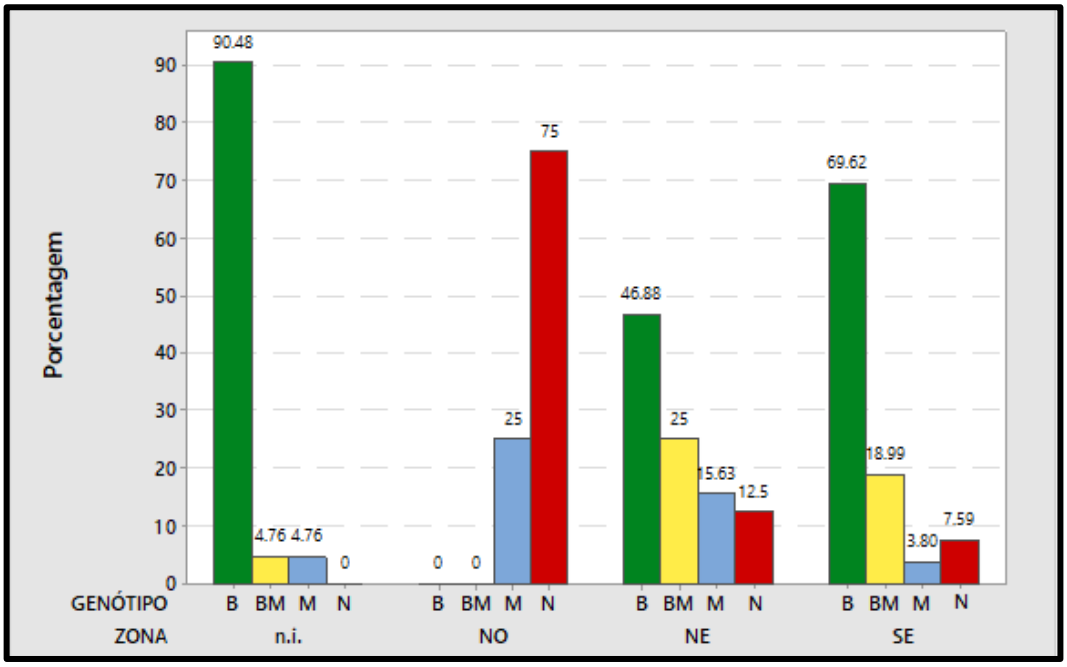
Tabela 11 – Frequência das estirpes BR-I e Mass do IBV, segundo a região geográfica.

Região	B		M		BM		N		Total
	n	**%**	**n**	**%**	**n**	**%**	**n**	**%**	**n**
Norte	0	0,00	1	25,00	0	0,00	3	75,00	**4**
Nordeste	15	46,88	5	15,63	8	25,00	4	12,50	**32**
Sudeste	55	69,62	3	3,80	15	18,99	6	7,59	**79**
Não informada	19	90,48	1	4,76	1	4,76	0	0,00	**21**
Total	**89**	**65,44**	**10**	**7,35**	**24**	**17,65**	**13**	**9,56**	**136**

Fonte: (CHACÓN, R.D., 2017)

Legenda: B: estirpe BR-I do IBV; M: estirpe Mass do IBV; BM: estirpes BR-I e Mass do IBV em simultâneo; N: reação negativa.

Gráfico 5 – Frequência das estirpes BR-I e Mass do IBV, segundo a região geográfica.



Fonte: (CHACÓN, R.D., 2017)

Legenda: B: estirpe BR-I do IBV; M: estirpe Mass do IBV; BM: estirpes BR-I e Mass do IBV em simultâneo; N: amostra negativa; n.i: não informado; NO: norte; NE: nordeste; SE: sudeste.

Segundo o tipo de criação (Tabela 12, Gráfico 6), nas amostras provenientes de criações de frangos de corte, em 68,54% (61/89) existia a estirpe BR-I, em 8,99% (8/89) a presença da estirpe Mass, em 16,85% (15/89) apresentavam as duas estirpes e 5,56% (5/89) amostras foram negativas nesta reação Nas amostras de poedeiras comerciais, 58,33% (21/36) apresentaram o genótipo BR-I, 5,56% (2/36) apresentaram o genótipo Mass, 19,44% (7/36) apresentaram os dois genótipos e 16,67% (6/36) amostras foram negativas nesta reação. Nas amostras de matrizes

50,00% (2/4) apresentaram o genótipo BR-I e 50,00% (2/4) apresentaram os dois genótipos. Nas amostras sem a informação do tipo de criação ocorreu 71,43% (5/7) amostras positivas para o genótipo BR-I e 28,57% (2/7) amostras foram negativas nesta reação.

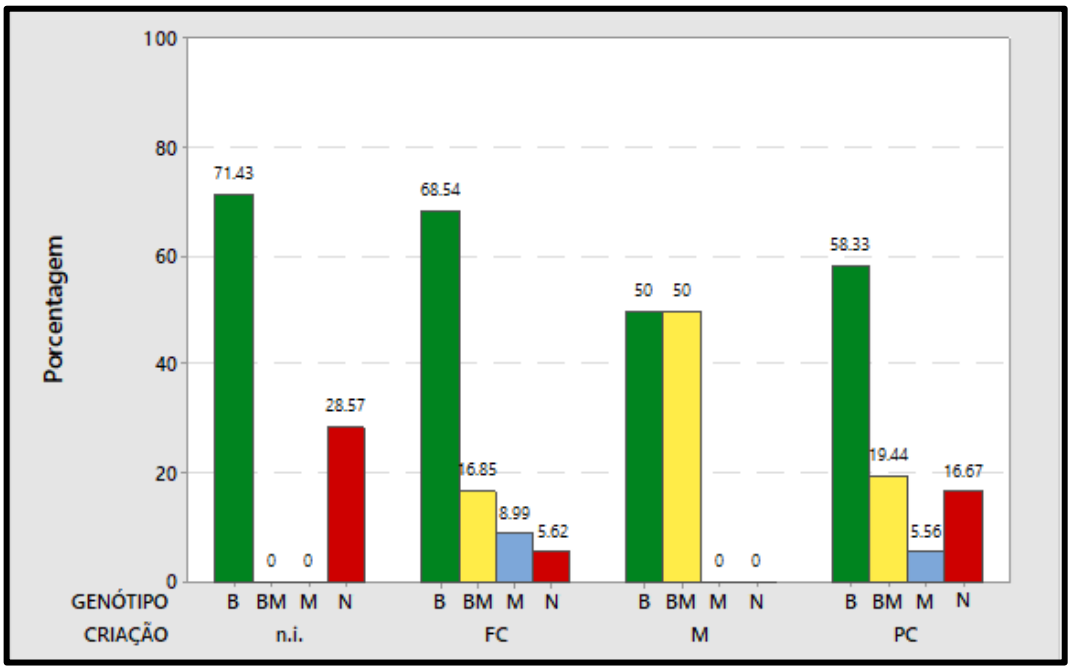
Tabela 12 – Frequência das estirpes BR-I e Mass do IBV, segundo o tipo de criação.

Criação	B		M		BM		N		Total
	n	**%**	**n**	**%**	**N**	**%**	**n**	**%**	**n**
Frangos de corte	61	68,54	8	8,99	15	16,85	5	5,62	**89**
Poedeiras comerciais	21	58,33	2	5.56	7	19,44	6	16,67	**36**
Matrizes	2	50,00	0	0,00	2	50,00	0	0,00	**4**
Não informada	5	71,43	0	0,00	0	0,00	2	28,57	**7**
Total	**89**	**65,44**	**10**	**7,35**	**24**	**17,65**	**13**	**9,56**	**136**

Fonte: (CHACÓN, R.D., 2017)

Legenda: B: estirpe BR-I do IBV; M: estirpe Mass do IBV; BM: estirpes BR-I e Mass do IBV em simultâneo; N: amostra negativa.

Gráfico 6 – Frequência das estirpes BR-I e Mass do IBV, segundo o tipo de criação.



Fonte: (CHACÓN, R.D., 2017)

Legenda: B: estirpe BR do IBV; M: estirpe Mass do IBV; BM: estirpes BR e Mass do IBV em simultâneo; N: amostra negativa; n.i: não informado; FC: frango de corte; M: matriz; PC: postura comercial.

5.7 ANÁLISES FILOGENÉTICAS

Na análise filogenética foram escolhidas 39 sequências, correspondendo aos dois controles das vacinas (BR-I e Mass) e 37 amostras de campo detectadas pelos métodos de semi-*nested* PCR propostos no presente trabalho. Adicionalmente, foi utilizado o subconjunto de 199 sequências proposta por Valastro et al. (2016) para a caracterização das estirpes do IBV no mundo.

Todas as sequências (238) foram alinhadas pela versão 7.313 do programa MAFFT (KATOH; STANDLEY, 2013), com o método de refinamento iterativo e lento (FFT-NS-i). O resultado do alinhamento foi analisado e editado pela versão 6.8.3 do programa CLC *Main Workbench* e pela versão 7.0.5 do programa *Bioedit* (HALL, 1999). A eleição do melhor modelo de substituição nucleotídica das sequências e a elaboração de uma árvore filogenética para determinar a estirpe correspondente a cada sequência foram realizadas com a versão 3.0 do programa PhyML (GUINDON et al., 2010) e foram editados com a versão 7.0.26 do programa MEGA (KUMAR; STECHER; TAMURA, 2016).

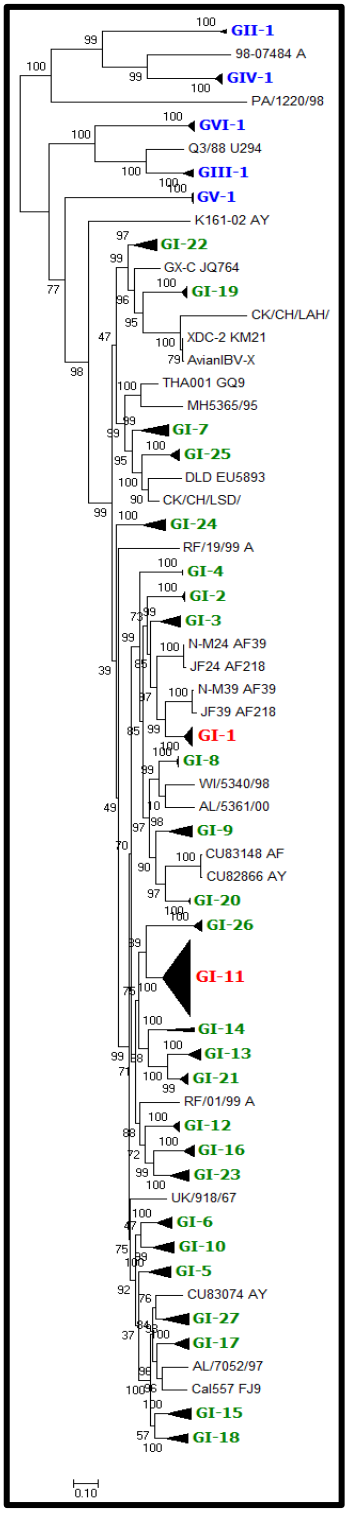
O modelo de substituição nucleotídica escolhido pelo programa PhyML (GUINDON et al., 2010) foi o Tempo Geral Reversível (GTR), distribuição Gama (+G) e 4 categorias de taxa de substituição. O valor do Critério de Informação de Akaike (AIC) foi 162430,72806 e o Critério de Informação Bayesiano (BIC) foi 165124,54406. A elaboração da árvore filogenética foi baseada na metodologia de *maximum-likelihood* utilizando o teste aproximado de taxa de verossimilhança (aLRT) dependente de procedimento semelhante a Shimodaira-Hasegawa (SH-like) para o suporte dos nodos e ramos internos, ferramentas disponíveis no programa PhyML (GUINDON et al., 2010).

A distribuição das estirpes ocorreu de acordo à classificação de Valastro et al. (2016). Verificou-se que, das sequências de nucleotídeos analisadas neste estudo, 4 sequências se localizaram no grupo GI-1 (3 amostras de campo e o controle positivo da vacina Mass) e 35 sequências foram localizadas no grupo GI-11 (34 amostras de campo e o controle positivo da vacina BR-I) (Figura 15).

As sub-árvores dos grupos GI-1 e GI-11 são apresentados em detalhe nas figuras 16 e 17, respectivamente. A descrição de cada amostra analisada é apresentada no Quadro 3. As amostras de campo USP-735, USP-774 e USP-781 e o controle da vacina USP-vMass se agruparam no braço da estirpe Massachusetts (H120) que deu origem à vacina mundialmente dispersa (Figura 16).

Nas amostras de campo que se agruparam na estirpe Brasileira (GI-11) houve uma segregação quando comparadas às amostras referência dos anos de 1975 até 1983 (UFMG/297, UFMG/283, UFMG/G e IBV/Brasil). Dentro do grupo, foram vistos 3 subgrupos (Figura 17): O primeiro (A) agrupado com a referência UFMG/1141 (2009), onde se localizaram as amostras de campo USP-761, USP-765, USP-804, USP-742, USP-742a1, USP-742a2, USP-803, USP-742a4, USP-760, USP-731a3, USP-731a1, USP-731a2, USP-731, USP-770, USP-908, USP-857, USP-907, USP-782, USP-783, das regiões Centro-Oeste, Nordeste, Sudeste e Sul. O segundo subgrupo (B) foi agrupado com a referência UFMG/12.2 (2008), onde se localizaram as amostras de campo USP-736, USP-880, USP-858, USP-745, USP-732a1 e o controle da vacina USP-vBR-I, pertencendo todas essas amostras à região Sudeste. O terceiro subgrupo (C) incluiu as amostras de campo USP-768a9, USP-768a11, USP-740a8, USP-740a10, USP-740, USP-839, USP-767, USP-861 e USP-829, pertencendo todas essas amostras à região Nordeste. Adicionalmente, a amostra de campo USP-810 com origem na região Norte foi segregada independentemente, embora esteja mais próxima ao subgrupo C, com as amostras do Nordeste.

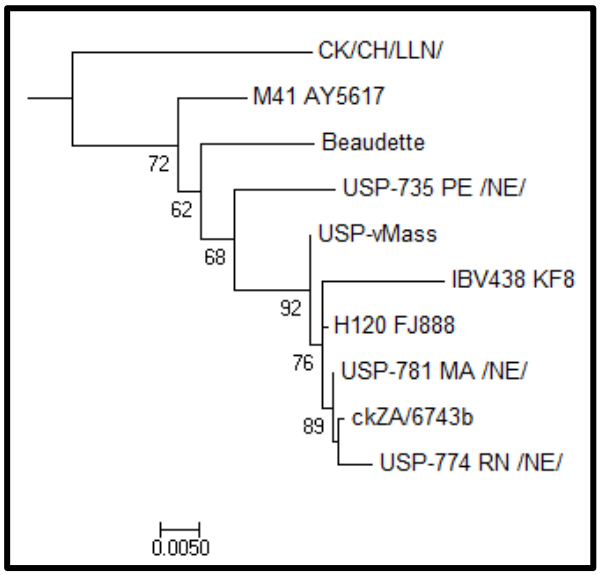
Figura 15 – Árvore filogenética de sequências parciais do gene S1 do IBV.



Fonte: (CHACÓN, R.D., 2017)

Legenda: A filogenia contém as 39 sequências de nucleotídeos dos produtos das reações de semi-*nested* PCR para o IBV obtidas de amostras de origem brasileira e as 199 sequências propostas por Valastro et al (2016). Filogenia baseada no método de *maximum-likelihood*, utilizando teste de aLRT SH-like para o suporte dos ramos internos com os valores mostrados nos nodos. A barra de escala representa o número de substituições nucleotídicas por sítio. As sub-árvores representando as estirpes de IBV foram comprimidas. As variantes únicas (VU) são apresentadas em letras negras. Os grupos principais GI-1 e GI-11 são apresentados com letras vermelhas.

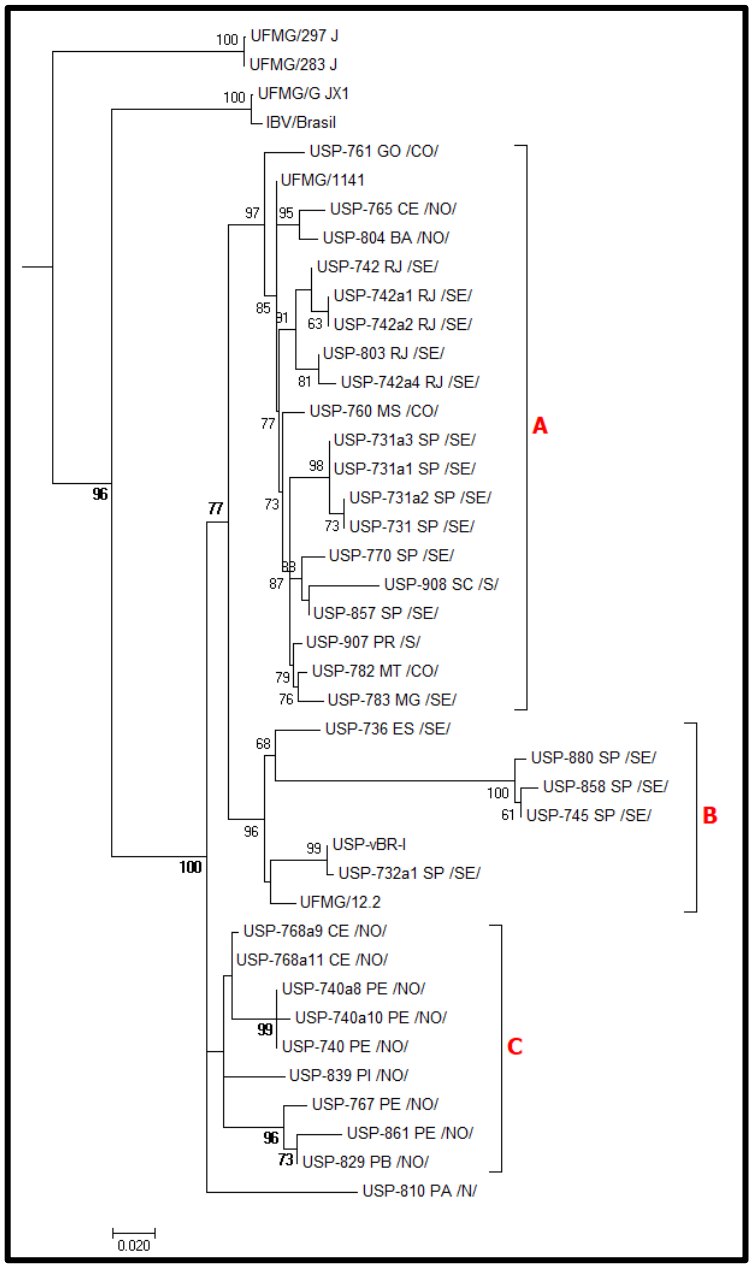
Figura 16 – Sub-árvore filogenética das sequências dos produtos amplificados das reações de *duplex* semi-*nested* PCR, localizadas no grupo GI-1.



Fonte: (CHACÓN, R.D., 2017)

Legenda: A filogenia contém 4 sequências de origem brasileira (3 amostras de campo e o controle positivo da vacina Mass) e as 5 sequências propostas por Valastro et al (2016) para representar o grupo GI-1. Filogenia baseada no método de *maximum-likelihood*, utilizando teste de aLRT SH-like para o suporte dos ramos internos com os valores mostrados nos nodos. A barra de escala representa o número de substituições nucleotídicas por sítio.

Figura 17 – Sub-árvore das sequências dos produtos amplificados das reações de *duplex* semi-*nested* PCR, localizadas no grupo GI-11.



Fonte: (CHACÓN, R.D., 2017)

Legenda: A filogenia contém as 35 sequências de origem brasileira (34 amostras de campo e o controle positivo da vacina BR-I) e as 5 sequências propostas por Valastro et al (2016) para representar o grupo GI-11. Filogenia baseada no método de *maximum-likelihood*, utilizando teste de aLRT SH-like para o suporte dos ramos internos com os valores mostrados nos nodos. A barra de escala representa o número de substituições nucleotídicas por sítio.

Quadro 2 – Amostras do IBV cujos produtos amplificados foram sequenciados e analisados para a geração da árvore filogenética.

Tipo de amostra	Código	Órgãos	Estado	Região	Criação	Idade	Estirpe
vacina	USP-vBR-I	n.a	n.a	n.a	n.a	n.a	BR-I
vacina	USP-vMass	n.a	n.a	n.a	n.a	n.a	Mass
campo	USP-731a1	intestinos	SP	SE	matrizes	46 semanas	BR-I
campo	USP-731a2	pulmões	SP	SE	matrizes	46 semanas	BR-I
campo	USP-731a3	traqueias	SP	SE	matrizes	46 semanas	BR-I
campo	USP-731	pulmões	SP	SE	matrizes	46 semanas	BR-I
campo	USP-732	s. de cloaca	SP	SE	frangos de corte	42 dias	BR-I
campo	USP-735	tonsilas cecais	PE	NE	frangos de corte	39 dias	Mass
campo	USP-736	tonsilas cecais	ES	SE	poedeiras c.	80 dias	BR-I
campo	USP-740a8	tonsilas cecais	PE	NE	poedeiras c.	17 semanas	BR-I
campo	USP-740a10	tonsilas cecais	PE	NE	poedeiras c.	21 semanas	BR-I
campo	USP-740	tonsilas cecais	PE	NE	poedeiras c.	17 semanas	BR-I
campo	USP-742a1	tonsilas cecais	RJ	SE	frangos de corte	35 dias	BR-I
campo	USP-742a2	tonsilas cecais	RJ	SE	frangos de corte	35 dias	BR-I
campo	USP-742a4	s. de cloaca	MG	SE	frangos de corte	37 dias	BR-I
campo	USP-742	s. de cloaca	RJ	SE	frangos de corte	30 dias	BR-I
campo	USP-745	s. de cloaca	SP	SE	poedeiras c.	n.i.	BR-I
campo	USP-760	s. de cloaca	MS	CO	frangos de corte	40 dias	BR-I
campo	USP-761	s. de cloaca	GO	CO	frangos de corte	41 dias	BR-I
campo	USP-765	tonsilas cecais	CE	NE	poedeiras c.	39 semanas	BR-I
campo	USP-767	tonsilas cecais	PE	NE	poedeiras c.	31 semanas	BR-I
campo	USP-768a9	rins	CE	NE	frangos de corte	45 dias	BR-I
campo	USP-768a11	pulmões	CE	NE	frangos de corte	45 dias	BR-I
campo	USP-770	s. de cloaca	SP	SE	frangos de corte	39 dias	BR-I
campo	USP-774	traqueias	RN	NE	poedeiras c.	27 semanas	Mass
campo	USP-781	intestinos	MA	NE	frangos de corte	7 dias	Mass
campo	USP-782	s. de cloaca	MT	CO	poedeiras c.	3 semanas	BR-I
campo	USP-783	pulmões	MG	SE	frangos de corte	n.i.	BR-I
campo	USP-803	s. de cloaca	RJ	SE	frangos de corte	52 dias	BR-I
campo	USP-804	s. de cloaca	RJ	SE	n.i.	n.i.	BR-I
campo	USP-810	tonsilas cecais	PA	N	poedeiras c.	35 semanas	BR-I
campo	USP-829	tonsilas cecais	PB	NE	poedeiras c.	25 semanas	BR-I
campo	USP-839	tonsilas cecais	PI	NE	frangos de corte	n.i.	BR-I
campo	USP-857	s. de cloaca	SP	SE	frangos de corte	43 dias	BR-I
campo	USP-858	s. de cloaca	SP	SE	poedeiras c.	n.i.	BR-I

campo	USP-861	tonsilas cecais	PB	NE	frangos de corte	42 dias	BR-I
campo	USP-880	s. de cloaca	SP	SE	poedeiras c.	6 semanas	BR-I
campo	USP-907	traqueias	PR	S	frangos de corte	41 dias	BR-I
campo	USP-908	s. de cloaca	SC	S	frangos de corte	n.i.	BR-I

Fonte: (CHACÓN, R.D., 2017)

Legenda: SP: São Paulo; PE: Pernambuco; ES: Espirito Santo; RJ: Rio de Janeiro; MG: Minas Gerais; MS: Mato Grosso do Sul; GO: Goiás; CE: Ceará; RN: Rio Grande do Norte; MA: Maranhão; MT: Mato Grosso; PA: Pará; PB: Paraíba; PI: Piauí; PR: Paraná; SC: Santa Catarina; BR: estirpe BR-I do IBV; Mass: estirpe Mass do IBV; CO: centro-oeste; N: norte; NE: nordeste; S: sul; SE: sudeste; n.a. não aplica; n.i: não informado; s. de cloaca: suabes de cloaca; poedeiras c.: poedeiras comerciais.

Na matriz de similaridade de nucleotídeos (Tabela 13) foi visto que as amostras de campo junto ao controle da vacina de BR-I, agrupadas na estirpe brasileira, variavam entre 90,48% até 99,13% e 89,61% até 96,97% quando comparadas às sequências de referência UFMG/1141 e UFMG/12.2, respectivamente; e na comparação com outras estirpes do IBV (Q1, D274, Mass, QX e 793B) os valores de similaridade oscilaram entre 65,81% até 76,62%.

As amostras agrupadas na estirpe Mass, como esperado, o controle da vacina de Mass, apresentaram identidade de 100% com a referência H120, e as amostras USP-781 e USP-774 mostraram identidade de 100% e 99,57% respectivamente; e na comparação com outras estirpes do IBV (BR-I, Q1, D274, QX e 793B) os valores de similaridade oscilaram entre 58,23% até 75,32%.

Na matriz de similaridade de aminoácidos (Tabela 14) foi visto que as amostras de campo junto ao controle da vacina de BR-I, agrupadas na estirpe brasileira, variavam entre 88,31% até 98,70% e 85,71% até 92,12% quando comparadas às sequências de referência UFMG/1141 e UFMG/12.2, respectivamente; e na comparação com outras estirpes do IBV (Q1, D274, Mass, QX e 793B) os valores de similaridade oscilaram entre 58,97% até 75,32%.

As amostras agrupadas na estirpe Mass, como esperado, o controle da vacina de Mass, apresentou identidade de 100% com a referência H120, e as amostras USP-781 e USP-774 mostraram identidade de 100% e 98,70% respectivamente; e na comparação com outras estirpes do IBV (BR-I, Q1, D274, QX e 793B) os valores de similaridade oscilaram entre 58,23% até 75,32%.

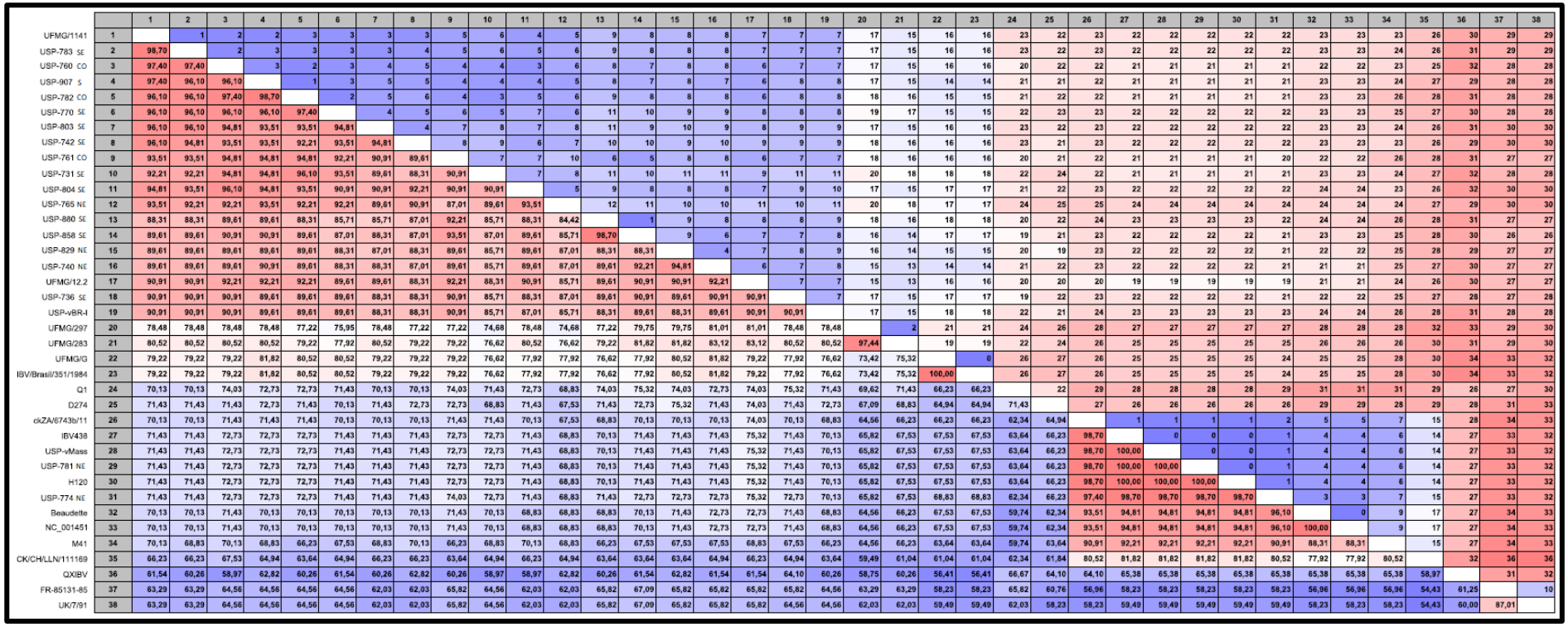
Tabela 13 – Matriz de similaridade de nucleotídeos entre sequências dos produtos amplificados na reação de *duplex* semi-*nested* PCR.

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38
UFMG/1141	1		2	4	6	3	5	6	4	9	7	10	11	15	15	22	17	22	22	21	50	44	53	53	63	62	62	62	62	63	62	62	59	72	63	62	69	66	78
USP-760 CO	2	99,13		4	6	5	5	8	6	9	7	10	9	15	15	22	19	23	22	22	51	45	53	53	63	62	62	62	62	63	62	62	59	71	64	60	69	66	80
USP-770 SE	3	98,27	98,27		5	5	6	10	8	11	11	12	11	17	17	24	21	23	25	25	54	48	53	53	62	61	61	61	61	62	61	61	60	72	63	61	68	65	78
USP-782 CO	4	97,40	97,40	97,84		3	5	10	10	11	11	14	11	15	17	24	21	23	23	23	54	48	54	54	62	61	61	61	61	62	63	63	62	74	61	59	69	66	80
USP-907 S	5	98,70	97,84	97,84	98,70		6	7	7	9	8	11	10	13	16	22	17	22	20	19	50	44	51	51	60	59	59	59	59	60	61	61	58	71	61	58	67	64	76
USP-783 SE	6	97,84	97,84	97,40	97,84	97,40		8	9	12	12	15	14	16	16	23	19	23	23	23	52	46	53	53	62	61	61	61	61	62	61	61	60	71	62	61	68	65	79
USP-803 SE	7	97,40	96,54	95,67	95,67	96,97	96,54		5	15	13	16	16	14	16	23	18	25	23	22	50	44	54	54	63	62	62	62	62	63	61	61	60	71	65	61	70	67	78
USP-742 SE	8	98,27	97,40	96,54	95,67	96,97	96,10	97,84		13	10	13	14	15	16	22	20	25	23	23	52	46	55	55	63	62	62	62	62	63	62	62	60	73	66	62	69	66	76
USP-761 CO	9	96,10	96,10	95,24	95,24	96,10	94,81	93,51	94,37		14	19	16	15	17	22	19	23	19	19	54	48	54	54	63	62	62	62	62	61	62	62	63	74	63	59	68	65	80
USP-804 SE	10	96,97	96,97	95,24	95,24	96,54	94,81	94,37	95,67	93,94		8	12	18	21	25	21	24	25	22	53	47	58	58	63	62	62	62	62	63	65	65	60	72	63	57	69	66	76
USP-765 NE	11	95,67	95,67	94,81	93,94	95,24	93,51	93,07	94,37	91,77	96,54		13	24	24	28	25	29	30	27	58	52	57	57	66	65	65	65	65	66	65	65	60	73	66	58	70	66	77
USP-731 SE	12	95,24	96,10	95,24	95,24	95,67	93,94	93,07	93,94	93,07	94,81	94,37		20	22	29	26	27	27	27	57	51	58	58	61	60	60	60	60	61	62	62	59	70	67	58	66	65	81
UFMG/12.2	13	93,51	93,51	92,64	93,51	94,37	93,07	93,94	93,51	93,51	92,21	89,61	91,34		7	13	14	16	16	16	47	41	50	50	58	57	57	57	57	56	53	53	58	69	60	54	65	62	74
USP-vBR-I	14	93,51	93,51	92,64	92,64	93,07	93,07	93,07	93,07	92,64	90,91	89,61	90,48	96,97		13	15	16	18	18	48	42	51	51	62	61	61	61	61	60	57	57	60	71	61	57	66	63	76
USP-736 SE	15	90,48	90,48	89,61	89,61	90,48	90,04	90,04	90,48	90,48	89,18	87,88	87,45	94,37	94,37		20	20	22	20	50	44	52	52	63	62	62	62	62	61	58	58	61	71	66	54	66	64	73
USP-740 NE	16	92,64	91,77	90,91	90,91	92,64	91,77	92,21	91,34	91,77	90,91	89,18	88,74	93,94	93,51	91,34		14	19	18	44	38	45	45	59	58	58	58	58	57	54	54	55	66	58	57	68	66	75
USP-829 NE	17	90,48	90,04	90,04	90,04	90,48	90,04	89,18	89,18	90,04	89,61	87,45	88,31	93,07	93,07	91,34	93,94		22	22	54	48	51	51	61	60	60	60	60	59	59	59	59	70	60	60	68	66	79
USP-880 SE	18	90,48	90,48	89,18	90,04	91,34	90,04	90,04	90,04	91,77	89,18	87,01	88,31	93,07	92,21	90,48	91,77	90,48		2	51	45	53	53	61	60	60	60	60	59	60	60	61	71	61	57	66	64	79
USP-858 SE	19	90,91	90,48	89,18	90,04	91,77	90,04	90,48	90,04	91,77	90,48	88,31	88,31	93,07	92,21	91,34	92,21	90,48	99,13		50	44	53	53	61	60	60	60	60	60	60	60	60	70	61	55	65	63	76
UFMG/297	20	78,90	78,48	77,22	77,22	78,90	78,06	78,90	78,06	77,22	77,64	75,53	75,95	80,17	79,75	78,90	81,43	77,22	78,48	78,90		6	60	60	70	69	69	69	69	70	70	70	67	79	68	72	75	77	84
UFMG/283	21	80,95	80,52	79,22	79,22	80,95	80,09	80,95	80,09	79,22	79,65	77,49	77,92	82,25	81,82	80,95	83,55	79,22	80,52	80,95	97,44		54	54	64	63	63	63	63	64	64	64	61	73	62	66	69	71	78
UFMG/G	22	77,06	77,06	77,06	76,62	77,92	77,06	76,62	76,19	76,62	74,89	75,32	74,89	78,35	77,92	77,49	80,52	77,92	77,06	77,06	74,68	76,62		0	64	63	63	63	63	62	61	61	63	69	59	59	65	61	79
IBV/Brasil/351/1984	23	77,06	77,06	77,06	76,62	77,92	77,06	76,62	76,19	76,62	74,89	75,32	74,89	78,35	77,92	77,49	80,52	77,92	77,06	77,06	74,68	76,62	100,00		64	63	63	63	63	62	61	61	63	69	59	59	65	61	79
ckZA/6743b/11	24	72,73	72,73	73,16	73,16	74,03	73,16	72,73	72,73	72,73	72,73	71,43	73,59	74,89	73,16	72,73	74,46	73,59	73,59	73,59	70,46	72,29	72,29	72,29		1	1	1	1	2	12	12	13	31	53	67	61	61	69
H120	25	73,16	73,16	73,59	73,59	74,46	73,59	73,16	73,16	73,16	73,16	71,86	74,03	75,32	73,59	73,16	74,89	74,03	74,03	74,03	70,89	72,73	72,73	72,73	99,57		0	0	0	1	11	11	12	30	52	66	60	60	68
IBV438	26	73,16	73,16	73,59	73,59	74,46	73,59	73,16	73,16	73,16	73,16	71,86	74,03	75,32	73,59	73,16	74,89	74,03	74,03	74,03	70,89	72,73	72,73	72,73	99,57	100,00		0	0	1	11	11	12	30	52	66	60	60	68
USP-vMass	27	73,16	73,16	73,59	73,59	74,46	73,59	73,16	73,16	73,16	73,16	71,86	74,03	75,32	73,59	73,16	74,89	74,03	74,03	74,03	70,89	72,73	72,73	72,73	99,57	100,00	100,00		0	1	11	11	12	30	52	66	60	60	68
USP-781 NE	28	73,16	73,16	73,59	73,59	74,46	73,59	73,16	73,16	73,16	73,16	71,86	74,03	75,32	73,59	73,16	74,89	74,03	74,03	74,03	70,89	72,73	72,73	72,73	99,57	100,00	100,00	100,00		1	11	11	12	30	52	66	60	60	68
USP-774 NE	29	72,73	72,73	73,16	73,16	74,03	73,16	72,73	72,73	73,59	72,73	71,43	73,59	75,76	74,03	73,59	75,32	74,46	74,46	74,46	70,46	72,29	73,16	73,16	99,13	99,57	99,57	99,57	99,57		10	10	13	31	52	67	59	59	68
Beaudette	30	73,16	73,16	73,59	72,73	73,59	73,59	73,59	73,16	73,16	71,86	71,86	73,16	77,06	75,32	74,89	76,62	74,46	74,03	74,03	70,46	72,29	73,59	73,59	94,81	95,24	95,24	95,24	95,24	95,67		0	12	30	56	66	60	61	69
NC_001451	31	73,16	73,16	73,59	72,73	73,59	73,59	73,59	73,16	73,16	71,86	71,86	73,16	77,06	75,32	74,89	76,62	74,46	74,03	74,03	70,46	72,29	73,59	73,59	94,81	95,24	95,24	95,24	95,24	95,67	100,00		12	30	56	66	60	61	69
M41	32	74,46	74,46	74,03	73,16	74,89	74,03	74,03	74,03	72,73	74,03	74,03	74,46	74,89	74,03	73,59	76,19	74,46	73,59	74,03	71,73	73,59	72,73	72,73	94,37	94,81	94,81	94,81	94,81	94,37	94,81	94,81		26	54	65	59	59	69
CK/CH/LLN/111169	33	68,83	69,26	68,83	67,97	69,26	69,26	69,26	68,40	67,97	68,83	68,40	69,70	70,13	69,26	69,26	71,43	69,70	69,26	69,70	66,67	68,40	70,13	70,13	86,58	87,01	87,01	87,01	87,01	86,58	87,01	87,01	88,74		60	68	70	70	76
D274	34	72,73	72,29	72,73	73,59	73,59	73,16	71,86	71,43	72,73	72,73	71,43	71,00	74,03	73,59	71,43	74,89	74,03	73,59	73,59	71,31	73,16	74,46	74,46	77,06	77,49	77,49	77,49	77,49	77,49	75,76	75,76	76,62	73,68		46	70	67	68
Q1	35	73,16	74,03	73,59	74,46	74,89	73,59	73,59	73,16	74,46	75,32	74,89	74,89	76,62	75,32	76,62	75,32	74,03	75,32	76,19	69,62	71,43	74,46	74,46	71,00	71,43	71,43	71,43	71,43	71,00	71,43	71,43	71,86	70,56	80,09		67	63	66
FR-85131-85	36	70,13	70,13	70,56	70,13	71,00	70,56	69,70	70,13	70,56	70,13	69,70	71,43	71,86	71,43	71,43	70,56	70,56	71,43	71,86	68,35	70,13	71,86	71,86	73,59	74,03	74,03	74,03	74,03	74,46	74,03	74,03	74,46	69,70	69,70	71,00		16	74
UK/7/91	37	71,43	71,43	71,86	71,43	72,29	71,86	71,00	71,43	71,86	71,43	71,43	71,86	73,16	72,73	72,29	71,43	71,43	72,29	72,73	67,51	69,26	73,59	73,59	73,59	74,03	74,03	74,03	74,03	74,46	73,59	73,59	74,46	69,70	71,00	72,73	93,07		73
QXIBV	38	66,67	65,81	66,67	65,81	67,52	66,24	66,67	67,52	65,81	67,52	67,09	65,38	68,38	67,52	68,80	67,95	66,24	66,24	67,52	65,00	66,67	66,24	66,24	70,51	70,94	70,94	70,94	70,94	70,94	70,51	70,51	70,51	67,52	70,94	71,79	68,38	68,80	

Fonte: (CHACÓN, R.D., 2017)

Legenda: Abaixo da diagonal: porcentagem (%) de similaridade (a coloração mais intensa em vermelho indica maior similaridade; a coloração mais intensa em azul indica maior diferença). Acima da diagonal: número de diferenças entre nucleotídeos (a coloração mais intensa em vermelho indica maior número de diferenças entre nucleotídeos; a coloração mais intensa em azul indica menor diferença entre nucleotídeos).

Tabela 14 – Matriz de similaridade de aminoácidos entre as sequências dos produtos amplificados na reação de *duplex* semi-*nested* PCR.



		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38
UFMG/1141	1		1	2	2	3	3	3	3	5	6	4	5	9	8	8	8	7	7	7	17	15	16	16	23	22	23	22	22	22	22	22	23	23	23	26	30	29	29
USP-783 SE	2	98,70		2	3	3	3	3	4	5	6	5	6	9	8	8	8	7	7	7	17	15	16	16	23	22	23	22	22	22	22	22	23	23	24	26	31	29	29
USP-760 CO	3	97,40	97,40		3	2	3	4	5	4	4	3	6	8	7	8	8	6	7	7	17	15	16	16	20	22	22	21	21	21	21	21	22	22	23	25	32	28	28
USP-907 S	4	97,40	96,10	96,10		1	3	5	5	4	4	4	5	8	7	8	7	6	8	8	17	15	14	14	21	21	22	21	21	21	21	21	23	23	24	27	29	28	28
USP-782 CO	5	96,10	96,10	97,40	98,70		2	5	6	4	3	5	6	9	8	8	8	6	8	8	18	16	15	15	21	22	22	21	21	21	21	21	23	23	26	28	31	28	28
USP-770 SE	6	96,10	96,10	96,10	96,10	97,40		4	5	6	5	7	6	11	10	9	9	8	8	8	19	17	15	15	22	23	23	22	22	22	22	22	23	23	25	27	30	28	28
USP-803 SE	7	96,10	96,10	94,81	93,51	93,51	94,81		4	7	8	7	8	11	9	10	9	8	9	9	17	15	16	16	23	22	23	22	22	22	22	22	23	23	24	26	31	30	30
USP-742 SE	8	96,10	94,81	93,51	93,51	92,21	93,51	94,81		8	9	6	7	10	10	9	10	9	9	9	18	16	16	16	23	21	23	22	22	22	22	22	23	23	23	26	29	30	30
USP-761 CO	9	93,51	93,51	94,81	94,81	94,81	92,21	90,91	89,61		7	7	10	6	5	8	8	6	7	7	18	16	16	16	20	21	22	21	21	21	21	20	22	22	26	28	31	27	27
USP-731 SE	10	92,21	92,21	94,81	94,81	96,10	93,51	89,61	88,31	90,91		7	8	11	10	11	11	9	11	11	20	18	18	18	22	24	22	21	21	21	21	21	23	23	24	27	32	28	28
USP-804 SE	11	94,81	93,51	96,10	94,81	93,51	90,91	90,91	92,21	90,91	90,91		5	9	8	8	8	7	9	10	17	15	17	17	21	22	23	22	22	22	22	22	24	24	23	26	32	30	30
USP-765 NE	12	93,51	92,21	92,21	93,51	92,21	92,21	89,61	90,91	87,01	89,61	93,51		12	11	10	10	11	10	11	20	18	17	17	24	25	25	24	24	24	24	24	24	24	24	27	29	30	30
USP-880 SE	13	88,31	88,31	89,61	89,61	88,31	85,71	85,71	87,01	92,21	85,71	88,31	84,42		1	9	8	8	8	9	18	16	18	18	20	22	24	23	23	23	23	22	24	24	26	28	31	27	27
USP-858 SE	14	89,61	89,61	90,91	90,91	89,61	87,01	88,31	87,01	93,51	87,01	89,61	85,71	98,70		9	6	7	7	8	16	14	17	17	19	21	23	22	22	22	22	21	23	23	25	28	30	26	26
USP-829 NE	15	89,61	89,61	89,61	89,61	89,61	88,31	87,01	88,31	89,61	85,71	89,61	87,01	88,31	88,31		4	7	8	9	16	14	15	15	20	19	23	22	22	22	22	21	22	22	25	28	29	27	27
USP-740 NE	16	89,61	89,61	89,61	90,91	89,61	88,31	88,31	87,01	89,61	85,71	89,61	87,01	89,61	92,21	94,81		6	7	8	15	13	14	14	21	22	23	22	22	22	22	21	21	21	25	27	30	27	27
UFMG/12.2	17	90,91	90,91	92,21	92,21	92,21	89,61	89,61	88,31	92,21	88,31	90,91	85,71	89,61	90,91	90,91	92,21		7	7	15	13	16	16	20	20	20	19	19	19	19	19	21	21	24	26	30	27	27
USP-736 SE	18	90,91	90,91	90,91	89,61	89,61	89,61	88,31	88,31	90,91	85,71	88,31	87,01	89,61	90,91	89,61	90,91	90,91		7	17	15	17	17	19	22	23	22	22	22	22	21	22	22	25	27	28	27	28
USP-vBR-I	19	90,91	90,91	90,91	89,61	89,61	89,61	88,31	88,31	90,91	85,71	87,01	85,71	88,31	89,61	88,31	89,61	90,91	90,91		17	15	18	18	22	21	24	23	23	23	23	23	24	24	26	28	31	28	28
UFMG/297	20	78,48	78,48	78,48	78,48	77,22	75,95	78,48	77,22	77,22	74,68	78,48	74,68	77,22	79,75	79,75	81,01	81,01	78,48	78,48		2	21	21	24	26	28	27	27	27	27	27	28	28	28	32	33	29	30
UFMG/283	21	80,52	80,52	80,52	80,52	79,22	77,92	80,52	79,22	79,22	76,62	80,52	76,62	79,22	81,82	81,82	83,12	83,12	80,52	80,52	97,44		19	19	22	24	26	25	25	25	25	25	26	26	26	30	31	29	30
UFMG/G	22	79,22	79,22	79,22	81,82	80,52	80,52	79,22	79,22	79,22	76,62	77,92	77,92	76,62	77,92	80,52	81,82	79,22	77,92	76,62	73,42	75,32		0	26	27	26	25	25	25	25	24	25	25	28	30	34	33	32
IBV/Brasil/351/1984	23	79,22	79,22	79,22	81,82	80,52	80,52	79,22	79,22	79,22	76,62	77,92	77,92	76,62	77,92	80,52	81,82	79,22	77,92	76,62	73,42	75,32	100,00		26	27	26	25	25	25	25	24	25	25	28	30	34	33	32
Q1	24	70,13	70,13	74,03	72,73	72,73	71,43	70,13	70,13	74,03	71,43	72,73	68,83	74,03	75,32	74,03	72,73	74,03	75,32	71,43	69,62	71,43	66,23	66,23		22	29	28	28	28	28	29	31	31	31	29	26	27	30
D274	25	71,43	71,43	71,43	72,73	71,43	70,13	71,43	72,73	72,73	68,83	71,43	67,53	71,43	72,73	75,32	71,43	74,03	71,43	72,73	67,09	68,83	64,94	64,94	71,43		27	26	26	26	26	26	29	29	28	29	28	31	33
ckZA/6743b/11	26	70,13	70,13	71,43	71,43	71,43	70,13	70,13	70,13	71,43	71,43	70,13	67,53	68,83	70,13	70,13	70,13	74,03	70,13	68,83	64,56	66,23	66,23	66,23	62,34	64,94		1	1	1	1	2	5	5	7	15	28	34	33
IBV438	27	71,43	71,43	72,73	72,73	72,73	71,43	71,43	71,43	72,73	72,73	71,43	68,83	70,13	71,43	71,43	71,43	75,32	71,43	70,13	65,82	67,53	67,53	67,53	63,64	66,23	98,70		0	0	0	1	4	4	6	14	27	33	32
USP-vMass	28	71,43	71,43	72,73	72,73	72,73	71,43	71,43	71,43	72,73	72,73	71,43	68,83	70,13	71,43	71,43	71,43	75,32	71,43	70,13	65,82	67,53	67,53	67,53	63,64	66,23	98,70	100,00		0	0	1	4	4	6	14	27	33	32
USP-781 NE	29	71,43	71,43	72,73	72,73	72,73	71,43	71,43	71,43	72,73	72,73	71,43	68,83	70,13	71,43	71,43	71,43	75,32	71,43	70,13	65,82	67,53	67,53	67,53	63,64	66,23	98,70	100,00	100,00		0	1	4	4	6	14	27	33	32
H120	30	71,43	71,43	72,73	72,73	72,73	71,43	71,43	71,43	72,73	72,73	71,43	68,83	70,13	71,43	71,43	71,43	75,32	71,43	70,13	65,82	67,53	67,53	67,53	63,64	66,23	98,70	100,00	100,00	100,00		1	4	4	6	14	27	33	32
USP-774 NE	31	71,43	71,43	72,73	72,73	72,73	71,43	71,43	71,43	74,03	72,73	71,43	68,83	71,43	72,73	72,73	72,73	75,32	72,73	70,13	65,82	67,53	68,83	68,83	62,34	66,23	97,40	98,70	98,70	98,70	98,70		3	3	7	15	27	33	32
Beaudette	32	70,13	70,13	71,43	70,13	70,13	70,13	70,13	70,13	71,43	70,13	68,83	68,83	68,83	70,13	71,43	72,73	72,73	71,43	68,83	64,56	66,23	67,53	67,53	59,74	62,34	93,51	94,81	94,81	94,81	94,81	96,10		0	9	17	27	34	33
NC_001451	33	70,13	70,13	71,43	70,13	70,13	70,13	70,13	70,13	71,43	70,13	68,83	68,83	68,83	70,13	71,43	72,73	72,73	71,43	68,83	64,56	66,23	67,53	67,53	59,74	62,34	93,51	94,81	94,81	94,81	94,81	96,10	100,00		9	17	27	34	33
M41	34	70,13	68,83	70,13	68,83	66,23	67,53	68,83	70,13	66,23	68,83	70,13	68,83	66,23	67,53	67,53	67,53	68,83	67,53	66,23	64,56	66,23	63,64	63,64	59,74	63,64	90,91	92,21	92,21	92,21	92,21	90,91	88,31	88,31		15	27	34	33
CK/CH/LLN/111169	35	66,23	66,23	67,53	64,94	63,64	64,94	66,23	66,23	63,64	64,94	66,23	64,94	63,64	63,64	63,64	64,94	66,23	64,94	63,64	59,49	61,04	61,04	61,04	62,34	61,84	80,52	81,82	81,82	81,82	81,82	80,52	77,92	77,92	80,52		32	36	36
QXIBV	36	61,54	60,26	58,97	62,82	60,26	61,54	60,26	62,82	60,26	58,97	58,97	62,82	60,26	61,54	62,82	61,54	61,54	64,10	60,26	58,75	60,26	56,41	56,41	66,67	64,10	64,10	65,38	65,38	65,38	65,38	65,38	65,38	65,38	65,38	58,97		31	32
FR-85131-85	37	63,29	63,29	64,56	64,56	64,56	64,56	62,03	62,03	65,82	64,56	62,03	62,03	65,82	67,09	65,82	65,82	65,82	65,82	64,56	63,29	63,29	58,23	58,23	65,82	60,76	56,96	58,23	58,23	58,23	58,23	58,23	56,96	56,96	56,96	54,43	61,25		10
UK/7/91	38	63,29	63,29	64,56	64,56	64,56	64,56	62,03	62,03	65,82	64,56	62,03	62,03	65,82	67,09	65,82	65,82	65,82	64,56	64,56	62,03	62,03	59,49	59,49	62,03	58,23	58,23	59,49	59,49	59,49	59,49	59,49	58,23	58,23	58,23	54,43	60,00	87,01	

Fonte: (CHACÓN, R.D., 2017)

Legenda: Abaixo da diagonal: porcentagem (%) de similaridade (a coloração mais intensa em vermelho indica maior similaridade; a coloração mais intensa em azul indica maior diferença). Acima da diagonal: número de diferenças entre aminoácidos (a coloração mais intensa em vermelho indica maior número de diferenças entre aminoácidos; a coloração mais intensa em azul indica menor diferença entre aminoácidos).

6 . DISCUSSÃO

É incomum que a influência de um vírus seja tão persistente ao longo dos anos na indústria avícola, causando grandes perdas econômicas no mundo inteiro. Desde a descoberta da BIG em 1931 (SCHALK; HAWN, 1931), e depois de quase 90 anos, os problemas causados por este vírus permanecem desafiadores, pois no processo de infecção e adaptação ainda existem aspectos que precisam ser esclarecidos, apesar de existirem inúmeras abordagens para tentar controlá-lo. Entre os desafios: no diagnóstico clínico do IBV não existem sinais patognomônicos, ou seja, exclusivos, o que dificulta o diagnóstico diferencial; o tropismo variável e a capacidade de gerar lesões em alguns tecidos em particular; a rapidez nos processos de replicação, mutação e recombinação do vírus que requer um constante estudo e caracterização dos genótipos circulantes e prevalentes; o debate sobre os métodos de controle mediante vacinação; a ausência de sistemas universais de classificação do IBV; a deficiência na divulgação dos estudos que correlacionassem os aspectos genéticos e antigênicos na América do Sul, assim como, metodologias rápidas, baratas e precisas para a detecção e identificação das estirpes prevalentes no Brasil. A intenção de contribuir e ajudar no controle do IBV foi a motivação deste estudo.

Frente à evidência de uma estirpe prevalente no território brasileiro (CHACÓN et al., 2011), o primeiro desafio foi desenhar uma metodologia de diagnóstico que fosse a mais abrangente possível. Considerando que o gene alvo para este tipo de abordagem é o codificador da proteína da espícula (S), mais precisamente a subunidade S1, e conscientes das frequentes mudanças e variações nesta sequência, o estudo foi iniciado agrupando e classificando todas as sequências do IBV disponíveis na base de dados de nucleotídeos do *GenBank*, com relato de origem no Brasil. Os resultados confirmaram de maneira indireta, a prevalência da estirpe brasileira (BR-I, GI-11) em primeiro lugar, com 67,30% (249/370) das sequências incluídas na análise e da estirpe Massachusetts (Mass, GI-1) em segundo lugar, com 31,89% (118/370) das sequências. A estirpe Massachusetts foi acrescentada à análise como a representativa do grupo GI-1 no Brasil, devido as diferentes publicações da doença a partir da autorização da vacina e o seu uso no país desde o ano de 1979 (SILVA, 2010). Duas sequências que foram inseridas no

grupo GI-13 já tinham sido designadas como 4/91 ou 793B (VILLARREAL et al., 2010). Uma sequência foi agrupada no grupo GI-9 (referente à estirpe Arkansas, Ark) como já tinha sido relatada no Brasil (FELIPPE et al., 2010). Nesse mesmo estudo, 10 sequências tinham sido classificadas como D207 (agora dentro do grupo GI-12), mas na presente análise foram incluídas dentro do grupo da estirpe brasileira (GI-11). Esta diferença na classificação é decorrente das diferenças nas sequências de referência utilizadas. No presente estudo foram utilizadas um maior número de sequências brasileiras, assim como, as sequências propostas no estudo de Valastro et al. (2016).

As reações desenvolvidas neste trabalho são as primeiras para o diagnóstico e detecção mediante *RT*-PCR em ponto final para a estirpe brasileira (BR-I), e foi estabelecido após o estudo de um número abrangente de sequências de nucleotídeos, incluindo a maior quantidade de sequências brasileiras do IBV disponíveis. Por outro lado, o diagnóstico da estirpe Mass foi desenvolvido após o estudo de todas as sequências de nucleotídeos que foram evoluindo a partir do ingresso da vacina Mass no Brasil. O desenho dos *primers* foi realizado com a sequência de nucleotídeos da primeira porção do gene S1, incluindo as regiões hipervariáveis 1 e 2 (*HVR1* e *HVR2*), regiões que são as mais polimórficas e informativas quanto a diversidade e é possível também se fazer inferências das propriedades antigênicas (MOORE; JACKWOOD; HILT, 1997; WANG; HUANG, 2000). Adicionalmente, a metodologia de PCR em ponto final oferece a possibilidade de ser realizada em laboratórios com menor infraestrutura quando comparado aos métodos de qPCR. Como foi visto nas figuras 5 e 6, os fragmentos de diagnóstico são fáceis de se determinar numa eletroforese de agarose convencional, pela simplicidade na interpretação. Tanto os tamanhos dos fragmentos amplificados como a semelhança com sequências de referência conhecidas (Tabela 2), indicaram que a reação foi altamente específica.

Para aprofundar o valor técnico das reações, foram realizados os respectivos testes de sensibilidade e especificidade. Para se avaliar a sensibilidade das reações, foram realizadas curvas de diluições para se conhecer a quantidade aproximada do número de cópias do genoma viral, sendo que o número de cópias foi determinado matematicamente, e a concentração no início das diluições foi determinada em

espectrofotômetro. Os resultados mostraram que em ambas as reações, o limiar mínimo de detecção foi de 10^4 cópias de cDNA/µL para os fragmentos de diagnóstico (Figuras 7 e 8), e concentrações virais na ordem de fentograma/µL (3,76fg/µL para a reação de semi-*nested* PCR exclusiva para a estirpe BR-I; 5,58fg/µL para a estirpe BR-I na reação de *duplex* semi-*nested* PCR e 5,57fg/µL para a estirpe Mass na reação de *duplex* semi-*nested* PCR) (Tabela 3). Em termos práticos, os *kits* de transcrição reversa geralmente oferecem bons resultados quando a concentração de RNA é maior de 1pg (quantidade aproximadamente 3.000 a 5.000 vezes maiores em comparação ao detectado pelas reações propostas neste estudo). Na literatura, os limiares de detecção das reações de *RT*-PCR em ponto final são calculados se fazendo diluições seriadas de fator 10, mas a concentração inicial nem sempre é determinada (CAVANAGH et al., 1999; OKINO et al., 2005; JONES et al., 2011).

Com respeito a avaliação da especificidade na reação de semi-*nested* PCR específica para se detectar a estirpe BR-I, tanto na avaliação com outras estirpes do IBV (Figura 9), como nos outros agentes infecciosos que infectam as aves com genoma do tipo DNA ou RNA (Figuras 11 e 12) não ocorreu nenhuma amplificação; isto é consequência da ação dos 3 *primers* utilizados na reação, por serem altamente específicos para a estirpe BR-I. Quanto a avaliação da especificidade na reação de *duplex* semi-*nested* PCR para a detecção e diferenciação das estirpes BR-I e Mass foi necessário se utilizar um *primer* genérico (RCH/U-F1) na primeira amplificação, comum, às duas estirpes e indiretamente, também, comum a outras estirpes do IBV (Figura 10). Dessa forma, os fragmentos produzidos na primeira amplificação (PCR) não podem ser utilizados para o diagnóstico, mas os fragmentos de 343pb e 227pb produzidos na segunda amplificação (semi-*nested* PCR) são altamente específicos para as estirpes BR-I e Mass, respectivamente. Na avaliação com outros agentes que infectam as aves com genoma do tipo DNA ou RNA (Figuras 13 e 14), não houve nenhuma amplificação com esta reação. Este tipo de reação para a detecção e diferenciação de estirpes, sem precisar de sequenciamento na rotina, já foi amplamente utilizado por outros pesquisadores, com estirpes europeias e norte-americanas (CAPUA et al., 1999; CAVANAGH et al., 1999; HANDBERG et al., 1999; MEULEMANS et al., 2001; ZANELLA et al., 2003), o

que confere uma maior praticidade quando é necessário se processar várias amostras simultaneamente.

Uma reação universal para o diagnóstico de triagem do IBV é a amplificação mediante *RT nested*-PCR da região não traduzida 3´UTR, que é uma região muito conservada nos Coronavírus, e, particularmente, em todas as estirpes conhecidas do IBV (CAVANAGH et al., 2002; DI FABIO; VILLAREAL, 2009). Os resultados da triagem nas 572 amostras de campo mostraram que 62,24% delas apresentavam o IBV, este resultado concorda com outros trabalhos semelhantes, quando se estabelece a média entre eles (CHACON et al., 2011; PADILHA FRAGA et al., 2013; BALESTRIN et al., 2014). Considerando o tipo de *pool* de órgãos na amostra, em *pool* de coração, fígado e pálpebras o vírus não foi detectado. No entanto, foi detectado em cornetos nasais, duodenos, intestinos, pâncreas, proventrículos, pulmões, sistemas reprodutores, rins, tonsilas cecais, traqueias, assim como, também em suabes de cloaca e suabes de traqueia. A detecção do IBV nos órgãos mencionados já foi relatada há vários anos (ALEXANDER; GOUGH, 1977; AMBALI; JONES, 1990; OWEN et al., 1991; SAIF, 1993; RAJ; JONES, 1997; JACKWOOD; DE WIT, 2013). Estes resultados confirmaram como é amplo o tropismo do IBV pelos tecidos epiteliais do trato respiratório, do trato digestório, do sistema urogenital (JACKWOOD; DE WIT, 2013; PEREIRA et al., 2016). No caso particular de suabes de cloaca, esta é uma amostra não recomendado na literatura (JACKWOOD; DE WIT, 2013), porém, representa um dos tipos de amostragem mais fácil e menos invasivo, pois não requer a eutanásia da ave, sendo muito recomendável nos programas de vigilância e monitoramento, e os resultados de positividade no presente trabalho (70,07%) demostraram que representam uma eficiente alternativa para a amostragem. Isto se justifica pela evidencia de que o reto é um dos órgãos onde os títulos do IBV podem ser maiores, mais duradores, e atuar como via de excreção dos vírus que pode ter infectado outros órgãos, como os rins (CAVANAGH, 2007). Este tipo de amostra foi a mais analisada no presente estudo, e representou 52,15% do total de amostras (304/572). É importante ressaltar que em diferentes ocasiões foi necessário se analisar mais de um *pool* de suabes (n=5) para se conseguir a positividade na amostra, especialmente nos casos de suabes com pouco material fecal. Assim, esta pode ser uma amostra para diagnóstico, mas pode ser necessário se analisar mais de um *pool* de suabes de cinco aves. No caso de

órgãos reprodutores, o resultado positivo num *pool* de ovários numa amostra procedente de poedeiras comerciais (ovários foram considerados na especificação de sistema reprodutor na tabela 4) destaca a importância de controlar a doença, pois já é conhecido o risco de causar esterilidade e falsas poedeiras (RAJ; JONES, 1997).

As porcentagens de presença de Coronavírus segundo a região de origem, variaram entre 49,32% até 67,53% nas amostras de origem conhecida (Tabela 5). Aspectos sanitários, climáticos, econômicos, entre outros, podem explicar as diferenças de positividade entre cada região. A presença de Coronavírus em todo o Brasil confirma os resultados de trabalhos anteriores (FELIPPE et al., 2010; CHACON et al., 2011; PADILHA FRAGA et al., 2013; BALESTRIN et al., 2014; CARRANZA et al., 2017). As porcentagens, segundo o tipo de criação, oscilaram entre 53,85% até 66,57% (Tabela 6), fato que indica a importância de existir monitoramento da doença de todos os tipos de criações. Os dados apresentados de acordo com a região geográfica e tipo de criação mostraram que o IBV se encontra amplamente distribuído nos sistemas brasileiros de cada região.

A prevalência da estirpe brasileira do IBV (BR-I) foi de 84,83%, quando as amostras foram testadas com a reação de semi-*nested* PCR específica, porcentagem semelhante ou maior em comparação aos trabalhos anteriormente realizados no Brasil (VILLARREAL et al., 2010; CHACÓN et al., 2011; PADILHA FRAGA et al., 2013; BALESTRIN et al., 2014; CARRANZA et al., 2017). Quando analisadas de acordo com o tipo de órgão e a partir das amostras positivas na triagem pela reação para a região 3´UTR, a estirpe brasileira foi detectada entre 61,11% (traqueias) até 100% (cornetos nasais, duodenos, pâncreas e proventrículos) das amostras processadas. Nas amostras de suabes, existiram 66,67% amostras positivas nos de traqueia e 91,55% nos de cloaca, confirmando a importância e validade desse tipo de amostra. Segundo a região geográfica de origem, a prevalência da estirpe BR-I foi encontrada no Sul em 100%, no Sudeste em 90,38%, no Centro-oeste em 87,88%, no Nordeste em 73,97% e no Norte em 33,33%, porém, a diferença no número de amostras de cada região influenciou nestes resultados, além das dificuldades técnicas para garantir a qualidade das amostras destes locais mais afastados. Comparando-se os tipos de criação, foi

observada a prevalência da estirpe BR-I em todos os sistemas, com porcentagens de 76,15% até 100%. É importante ressaltar que o número de amostras provenientes de matrizes foi baixo, no entanto, como são aves de vida longa, é uma evidência da permanência da estirpe BR-I nas granjas e a sua importância com respeito à disseminação desta estirpe.

Com o uso da reação de *duplex* semi-*nested* PCR para a detecção simultânea das estirpes BR-I e Mass, que são as mais prevalentes no Brasil, ocorreram 90,44% amostras positivas considerando as duas estirpes, porém, e importante mencionar que a detecção da estirpe Massachusetts representa tanto vírus de campo como de vacinas Mass que estavam sendo usadas no campo. Nas avaliações pelo tipo de órgão, mais uma vez foi evidenciada a maior prevalência da estirpe BR-I (83,09%) em comparação com a estirpe Mass (25,00%) nas amostras. A detecção simultânea também foi analisada e representou 17,65% das amostras enquanto que 9,56% foram amostras negativas nesta reação. No caso das reações negativas, poderia ser consequência da baixa carga viral na amostra. A distribuição de porcentagens comparando os tipos de órgãos avaliados foi heterogênea, devido às diferenças entre os números de amostras de cada órgão. Na análise de acordo com a região geográfica também ocorreu heterogeneidade, em consequência da diferença de número de amostras, embora confirmem a prevalência da estirpe BR-I no Sudeste e Nordeste. Segundo o tipo de criação, outra vez, a estirpe BR-I foi prevalente variando entre 85,39% até 100% de presença considerando individualmente cada tipo de criação.

O valor técnico das reações propostas foi evidenciado de maneira clara, pelas porcentagens de detecção das estirpes de interesse levando em consideração o número total de amostras positivas para Coronavírus, com valores de 84,83% e 90,44%, respectivamente, na reação específica e *duplex*. Os resultados de sequenciamento de nucleotídeos garantiram a alta especificidade das reações para a detecção e diferenciação das duas estirpes.

A árvore filogenética (Figura 15) comprovou que 100% das amostras sequenciadas pertenciam ao grupo esperado no diagnóstico da amostra. As três (03) amostras de campo diagnosticadas como estirpe Mass e o controle da vacina

Mass foram incluídos no grupo GI-1, enquanto que as 34 amostras de campo diagnosticadas como estirpe BR-I e o controle da vacina BR-I foram incluídos no grupo GI-11. Na análise destes resultados, se verificou que as amostras diagnosticadas como Mass (Figura 16) estavam localizadas muito próximas à sequência relacionada à vacina mundialmente distribuída da estirpe Massachusetts (BIJLENGA et al., 2004).

Na análise da sub-árvore do grupo GI-11 (Figura 17), foram vistos três (03) subgrupos principais (A, B, C), com uma aparente associação com a origem geográfica. O primeiro subgrupo (A) incluía amostras de quatro (04) regiões com maior produção de aves no Brasil, o que sugere uma dispersão generalizada deste subgrupo no país. O segundo subgrupo (B), que incluiu o controle da vacina BR-I, mostrou exclusivamente amostras do Sudeste brasileiro. O terceiro grupo (C) incluiu exclusivamente amostras do Nordeste brasileiro, enquanto que a única amostra sequenciada do Norte foi localizada num braço independente, porém, próximo ao subgrupo C, que mantém também, certa relação à proximidade geográfica real. As amostras de referência mais antigas do Brasil (UFMG/297, UFMG/283, UFMG/G e IBV/Brasil) foram localizadas também em braços separados, o que indicaria uma provável redução na prevalência atual dessas variantes, influenciada também pelo processo evolutivo do vírus nas últimas décadas no país sem ter sido apropriadamente controlada. É interessante ressaltar que o subgrupo B que inclui a vacina BR-I se encontrou localizado entre os outros dois subgrupos, com a consequente proximidade mais ou menos uniforme a todas as variantes circulantes da estirpe brasileira.

As análises de similaridade de nucleotídeos e aminoácidos comprovaram mais uma vez a relação entre as amostras diagnosticadas como BR-I e Mass, e a proximidade com os grupos nos quais eram esperadas de se localizar. Conforme o esperado também, as outras estirpes consideradas na análise (Q1, QX, D274 e 793B) em nenhum dos casos ultrapassou o valor de 77% de similaridade com as estirpes BR-I ou Mass. Estes achados de similaridade tem uma importância significativa, não apenas pela confirmação da validade das reações propostas, mas também que estas reações poderem auxiliar na otimização dos programas de vacinação.

Já foi demonstrado que a proteção cruzada entre estirpes está diretamente relacionada à similaridade entre as estirpes virais, se esperando que aquelas vacinas com maior similaridade na sequência de S1, tanto na sequência dos nucleotídeos como de aminoácidos tenham maiores probabilidades de proteção cruzada (CAVANAGH; ELUS; COOK, 1997). Esse fato revela e explica as falhas nos programas de vacinação contra o IBV apenas com vacinas da estirpe Massachusetts e seus semelhantes (B48, Ma5, M41, M52) no território brasileiro, frente à maior prevalência de BR-I em comparação ao Mass. Infere-se também, que outras vacinas de baixa similaridade com as variantes brasileiras terão falha na proteção cruzada e pior ainda, aumentarão o risco de gerar novas variantes, produto das mutações e recombinações pela inserção de uma vacina/estirpe “não natural” ao território brasileiro. A vacina contra BR-I, até o momento, é aquela que pela maior similaridade e relação ancestral comum às demais variantes brasileiras, deveria garantir um maior sucesso na proteção contra esta estirpe.

Contudo, é necessário avaliar e comparar as sequências do gene S1 completo das amostras sequenciadas no presente estudo, assim como, sequenciar um número maior de amostras da região Sul e Norte. Assim como, realizar testes de proteção cruzada entre as amostras brasileiras.

Os resultados deste estudo mostraram que a estirpe BR-I continua sendo prevalente no Brasil, no entanto observou-se pequenas diferenças entre algumas amostras. As amostras analisadas eram de granjas onde as aves ainda não haviam recebido a vacina contra BR-I. Dessa forma, se a vacina contra BR-I for amplamente usada poderá iniciar um processo de pressão seletiva, assim estudos de epidemiologia molecular devem ser realizados permanentemente para se detectar alterações genéticas neste vírus.

Como as reações propostas no presente estudo se constituem em ferramentas altamente sensíveis e específicas para se detectar as duas estirpes do IBV prevalentes no Brasil, elas podem ser úteis para esclarecer casos clínicos de campo, assim como, no monitoramento da doença.

7. CONCLUSÕES

Baseado nos resultados e discussões, podemos concluir o seguinte:

- A reação de semi-*nested* PCR para a detecção da estirpe brasileira do IBV (BR-I) foi validada e mostrou alto desempenho, comprovado pelas análises de sensibilidade, especificidade, filogenética e de similaridade de sequências de nucleotídeos.

- A reação de *duplex* semi-*nested* PCR para a detecção simultânea das estirpes brasileira (BR-I) e Massachusetts (Mass) do IBV demonstrou a sua validade e alto desempenho, comprovado pelas análises de sensibilidade, especificidade, filogenética e de similaridade de sequências de nucleotídeos.

- O método de diagnóstico da região 3´UTR para a detecção de Coronavírus mostrou a sua utilidade nos estudos de triagem do IBV.

- O IBV é altamente prevalente, persistente, e disperso em todas as regiões e sistemas de criação no Brasil.

- No Brasil, existe um predomínio da estirpe BR-I do IBV em comparação a estirpe Massachusetts.

- A implementação de análises filogenéticas incluindo apropriadamente todas as estirpes representativas do IBV no mundo, demonstrou um agrupamento muito prático e efetivo para o desenho de *primers* para diagnóstico.

- A análise das sequências de nucleotídeos, dos produtos amplificados das reações de semi-*nested* PCR de amostras do Brasil, mostraram 3 subgrupos com associação geográfica.

- A maior similaridade da vacina da estirpe BR-I em comparação a outras estirpes e vacinas comerciais sugere uma maior probabilidade de sucesso na proteção na avicultura brasileira.

REFERÊNCIAS

ABPA. Relatório Anual da ABPA 2017. **Associação Brasileira de Proteina Animal**, p. 68, 2017.

ALEXANDER, D. J.; GOUGH, R. E. Isolation of avian infectious bronchitis virus from experimentally infected chickens. **Research in Veterinary Science**, v. 23, n. 3, p. 344–347, 1977.

ALMEIDA, D. O. et al. Avian infectious bronchitis and deep pectoral myopathy-A case control study. **Poultry Science**, v. 91, n. 12, p. 3052–3056, 2012.

AMBALI, A. G.; JONES, R. C. Early pathogenesis in chicks of infection with an enterotropic strain of infectious bronchitis virus. **Avian Diseases**, v. 34, n. 4, p. 809–817, 1990.

BALESTRIN, E. et al. Infectious bronchitis virus in different avian physiological systems - A field study in Brazilian poultry flocks. **Poultry Science**, v. 93, n. 8, p. 1922–1929, 2014.

BEACH, J. R.; SCHALM, O. W. A Filterable Virus, Distinct from that of Laryngotracheitis, the Cause of a Respiratory Disease of Chicks. **Poultry Science**, v. 15, n. 3, p. 199–206, 1936.

BERRY, D. M. et al. The structure of infectious bronchitis virus. **Virology**, v. 23, p. 403–407, 1964.

BIJLENGA, G. et al. Development and use of the H strain of avian infectious bronchitis virus from the Netherlands as a vaccine: A review. **Avian Pathology**, v. 33, n. 6, p. 550–557, 2004.

BOS, E. C. W. et al. Mutational analysis of the murine coronavirus spike protein: Effect on cell-to-cell fusion. **Virology**, v. 214, n. 2, p. 453–463, 1995.

CAPUA, I. 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.

CARRANZA, C. et al. Genetic characterisation and analysis of infectious bronchitis virus isolated from Brazilian flocks between 2010 and 2015. **British Poultry Science**, v. 58, n. 6, p. 610–623, 2017.

CAVANAGH, D. et al. Location of the amino acid differences in the SI spike glycoprotein subunit of closely related serotypes of infectious bronchitis virus. **Avian Pathology**, v. 21, n. 1, p. 33–43, 1992.

CAVANAGH, D. et al. Longitudinal field studies of infectious bronchitis virus and avian pneumovirus in broilers using type-specific polymerase chain reactions. **Avian Pathology**, v. 28, n. 6, p. 593–605, 1999.

CAVANAGH, D. et al. Coronaviruses from pheasants (Phasianus colchicus) are genetically closely related to coronaviruses of domestic fowl (infectious bronchitis virus) and turkeys. **Avian Pathology**, v. 31, n. 1, p. 81–93, 2002.

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

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

CAVANAGH, D.; DAVIS, P. J.; MOCKETT, A. P. A. Amino acids within hypervariable region 1 of avian coronavirus IBV (Massachusetts serotype) spike glycoprotein are associated with neutralization epitopes. **Virus Research**, v. 11, n. 2, p. 141–150, 1988.

CAVANAGH, D.; ELUS, M. M.; COOK, J. K. Relationship between sequence variation in the S1 spike protein of infectious bronchitis virus and the extent of cross-protection in vivo. **Avian Pathology**, v. 26, n. 1, p. 63–74, 1997.

CHACÓN, J. L. et al. Epidemiological survey and molecular characterization of avian infectious bronchitis virus in Brazil between 2003 and 2009. **Avian Pathology**, v. 40, n. 2, p. 153–162, 2011.

CHOMCZYNSKI, P. Single-Step Method of RNA Isolation by Acid Guanidinium Extraction. **Analytical Biochemistry**, v. 162, n. 1, p. 156–159, 1987.

CHOMCZYNSKI, P. A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cell and tissue samples. **BioTechniques**, v. 15, n. 3, p. 532–534, 536–537, 1993.

CONG, Y.; VERLHAC, P.; REGGIORI, F. The interaction between nidovirales and autophagy components. **Viruses**, v. 9, n. 7, p. 14, 2017.

COOK, J. K. Recovery of infectious bronchitis virus from eggs and chicks produced by experimentally inoculated hens. **Journal of Comparative Pathology**, v. 81, n. 2, p. 203–211, 1971.

CUBILLOS, A. et al. Characterisation of strains of infectious bronchitis virus isolated in Chile. **Avian Pathology**, v. 20, n. 1, p. 85–99, 1991.

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

DE WIT, J. J.; COOK, J. K. A.; VAN DER HEIJDEN, H. M. J. F. Infectious bronchitis virus variants: a review of the history, current situation and control measures. **Avian Pathology**, v. 40, n. 3, p. 223–235, 2011.

DI FABIO, J. et al. 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 FABIO, J.; VILLAREAL, L. Bronquite infecciosa das galinhas. In: BERCHIERI, A. et al. (Eds.). . **Doenças das Aves**. 2ª Edição ed. São Paulo: Fundação APINCO de Ciência e Tecnologia, 2009. p. 631–650.

ECKERLE, L. D. et al. High fidelity of murine hepatitis virus replication is decreased in nsp14 exoribonuclease mutants. **Journal of Virology**, v. 81, n. 22, p. 12135–12144, 2007.

FABRICANT, J. The early history of infectious bronchitis. **Avian Diseases**, v. 42, n. 4, p. 648–650, 1998.

FAN, W. et al. Comparative dynamic distribution of avian infectious bronchitis virus M41, H120, and SAIBK strains by quantitative real-time RT-PCR in SPF chickens. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 76, n. 12, p. 2255–2260, 2012.

FELIPPE, P. A N. et al. Genetic diversity of avian infectious bronchitis virus isolated from domestic chicken flocks and coronaviruses from feral pigeons in Brazil between 2003 and 2009. **Avian Diseases Digest**, v. 5, n. 4, p. e11–e12, 2010.

GUINDON, S. et al. New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: Assessing the performance of PhyML 3.0. **Systematic Biology**, v. 59, n. 3, p. 307–321, 2010.

GUO, Y. et al. Identification of a new region of SARS-CoV S protein critical for viral entry. **Journal of Molecular Biology**, v. 394, n. 4, p. 600–605, 2010.

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

HANDBERG, K. et al. Detection and strain differentiation of infectious bronchitis virus in tracheal tissues from experimentally infected chickens by reverse transcription-polymerase chain reaction. Comparison with an immunohistochemical technique. **Avian Pathology**, v. 28, n. 4, p. 327–335, 1999.

HASSAN, K. E. et al. Prevalence of avian respiratory viruses in broiler flocks in Egypt. **Poultry Science**, v. 95, n. 6, p. 1271–1280, 2016.

HIDALGO, H.; GALLARDO, R.; ROSENDE, S. Isolation of infectious bronchitis virus from broiler chickens in Chile. **Avian Diseases**, v. 20, n. 3, p. 601–603, 1976.

HIDALGO, H.; GALLARDO, R.; TORO, H. Antigenic and pathogenic properties of 3 isolates of infectious bronchitis virus recovered from inoculated birds. **Zentralblatt fur Veterinarmedizin. Reihe B. Journal of Veterinary Medicine. Series B**, v. 33, n. 1, p. 26–35, 1986.

HIPOLITO, O. Isolamento e identificacao do virus da bronquite infecciosa das galinhas no Brasil. **Arquivo Escola Veterinária Universidade de Minas Gerais**, v. 10, p. 131–151, 1957.

HOPKINS, S. R.; YODER, H. W. Increased incidence of airsacculitis in broilers infected with Mycoplasma synoviae and chicken-passaged infectious bronchitis vaccine virus. **Avian Diseases**, v. 28, n. 2, p. 386–396, 1984.

HUTTON, S. et al. Detection of infectious bronchitis virus 793B, avian metapneumovirus, Mycoplasma gallisepticum and Mycoplasma synoviae in poultry in Ethiopia. **Tropical Animal Health and Production**, v. 49, n. 2, p. 317–322, 2017.

IGNJATOVIC, J. et al. Pathogenicity of Australian strains of avian infectious bronchitis virus. **Journal of Comparative Pathology**, v. 126, n. 2–3, p. 115–123, 2002.

IGNJATOVIC, J.; GALLI, L. The S1 glycoprotein but not the N or M proteins of avian infectious bronchitis virus induces protection in vaccinated chickens. **Archives of Virology**, v. 138, n. 1–2, p. 117–134, 1994.

IGNJATOVIĆ, J.; SAPATS, S. Avian infectious bronchitis virus. **Revue Scientifique et Technique (International Office of Epizootics)**, v. 19, n. 2, p. 493–508, 2000.

IMBERT, I. et al. The SARS-Coronavirus PLnc domain of nsp3 as a replication/transcription scaffolding protein. **Virus Research**, v. 133, n. 2, p. 136–148, 2008.

JACKWOOD, M. W.; DE WIT, S. J. Infectious bronchitis. In: SWAYNE, DE; GLISSON, JR; MCDOUGALD, LR; NOLAN, LK; SUAREZ, DL; NAIR, V. (Ed.). **Diseases of Poultry**. 13 ed. ed. Iowa: John Wiley & Sons, Inc., 2013. p. 139–159.

JACKWOOD, M. W.; YOUSEF, N. M.; HILT, D. A. Further development and use of a molecular serotype identification test for infectious bronchitis virus. **Avian Diseases**, v. 41, n. 1, p. 105–110, 1997.

JOHNSON, M. A. et al. A recombinant fowl adenovirus expressing the S1 gene of infectious bronchitis virus protects against challenge with infectious bronchitis virus. **Vaccine**, v. 21, n. 21–22, p. 2730–2736, 2003.

JONES, R. M. et al. Development and validation of RT-PCR tests for the detection and S1 genotyping of infectious bronchitis virus and other closely related Gammacoronaviruses within clinical samples. **Transboundary and Emerging Diseases**, v. 58, n. 5, p. 411–420, 2011.

KATOH, K.; STANDLEY, D. M. MAFFT multiple sequence alignment software version 7: Improvements in performance and usability. **Molecular Biology and Evolution**, v. 30, n. 4, p. 772–780, 2013.

KOCH, G. et al. Antigenic domains on the peplomer protein of avian infectious bronchitis virus: Correlation with biological functions. **Journal of General Virology**, v. 71, n. 9, p. 1929–1935, 1990.

KUMAR, S.; STECHER, G.; TAMURA, K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. **Molecular Biology and Evolution**, v. 33,

n. 7, p. 1870–1874, 2016.

LI, K. et al. Isolation of lactate dehydrogenase-elevating viruses from wild house mice and their biological and molecular characterization. **Virus Research**, v. 67, n. 2, p. 153–162, 2000.

LI, L. et al. Structural lability in stem-loop 1 drives a 5' UTR-3' UTR interaction in coronavirus replication. **Journal of Molecular Biology**, v. 377, n. 3, p. 790–803, 2008.

MAEDA, J.; MAEDA, A.; MAKINO, S. Release of coronavirus E protein in membrane vesicles from virus- infected cells and E protein-expressing cells. **Virology**, v. 263, n. 2, p. 265–272, 1999.

MARANDINO, A. et al. Phylodynamic analysis of avian infectious bronchitis virus in South America. **Journal of General Virology**, v. 96, n. 2015, p. 1340–1346, 2015.

MATTHIJS, M. G. R. et al. Ability of Massachusetts-type infectious bronchitis virus to increase colibacillosis susceptibility in commercial broilers: a comparison between vaccine and virulent field virus. **Avian Pathology**, v. 32, n. 5, p. 473–481, 2003.

MEIR, R. et al. Identification of a novel nephropathogenic infectious bronchitis virus in Israel. **Avian Diseases**, v. 48, n. 3, p. 635–641, 2004.

MEULEMANS, G. et al. Epidemiology of infectious bronchitis virus in Belgian broilers: A retrospective study, 1986 to 1995. **Avian Pathology**, v. 30, n. 4, p. 411–421, 2001.

MEUNIER, J. C. et al. Analysis of the glycosylation sites of hepatitis C virus (HCV) glycoprotein E1 and the influence of E1 glycans on the formation of the HCV glycoprotein complex. **Journal of General Virology**, v. 80, n. 4, p. 887–896, 1999.

Minitab 17 Statistical Software. State College, PA: Minitab, Inc., , 2010. Disponível em: <www.minitab.com>

MOORE, K. M.; JACKWOOD, M. W.; HILT, D. A. Identification of amino acids involved in a serotype and neutralization specific epitope within the s1 subunit of avian infectious bronchitis virus. **Archives of Virology**, v. 142, n. 11, p. 2249–2256, 1997.

MORK, A. K. et al. Differences in the tissue tropism to chicken oviduct epithelial cells between avian coronavirus IBV strains QX and B1648 are not related to the sialic acid binding properties of their spike proteins. **Veterinary Research**, v. 45, n. 1, p. 1–10, 2014.

OKINO, C. H. et al. Infectious Bronchitis Virus : Detection and Vaccine Strain Differentiation by Semi-nested. **Brazilian Journal of Poultry Science**, v. 7, n. 1, p. 59–66, 2005.

OWEN, R. L. et al. Detection of viral antigen following exposure of one-day-old chickens to the Holland 52 strain of infectious bronchitis virus. **Avian Pathology**,

v. 20, n. 4, p. 663–673, 1991.

PADILHA DE FRAGA, A. et al. 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, n. 1, p. 16–21, 2016.

PADILHA FRAGA, A. et al. Emergence of a New Genotype of Avian Infectious Bronchitis Virus in Brazil. **Avian Diseases**, v. 57, n. 2, p. 225–232, 2013.

PEREIRA, C. G. et al. Distribution of infectious bronchitis virus strains in different organs and evidence of vertical transmission in natural infection. **Archives of Virology**, v. 161, n. 12, p. 3355–3363, 2016.

PETIT, C. M. et al. Palmitoylation of the cysteine-rich endodomain of the SARS-coronavirus spike glycoprotein is important for spike-mediated cell fusion. **Virology**, v. 360, n. 2, p. 264–274, 2007.

RAJ, G. D.; JONES, R. C. Infectious bronchitis virus: Immunopathogenesis of infection in the chicken. **Avian Pathology**, v. 26, n. 4, p. 677–706, 1997.

ROUSSAN, D. A.; HADDAD, R.; KHAWALDEH, G. Molecular survey of avian respiratory pathogens in commercial broiler chicken flocks with respiratory diseases in Jordan. **Poultry Science**, v. 87, n. 3, p. 444–448, 2008.

SAIF, L. J. Coronavirus immunogens. **Veterinary Microbiology**, v. 37, n. 3–4, p. 285–297, 1993.

SCHALK, A. F.; HAWN, M. C. An Apparently New Respiratory Disease of Baby Chicks. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 78, p. 413–423, 1931.

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

SHULLA, A.; GALLAGHER, T. Role of spike protein endodomains in regulating coronavirus entry. **Journal of Biological Chemistry**, v. 284, n. 47, p. 32725–32734, 2009.

SID, H.; BENACHOUR, K.; RAUTENSCHLEIN, S. Co-infection with multiple respiratory pathogens contributes to increased mortality rates in algerian poultry flocks. **Avian Diseases**, v. 59, n. 3, p. 440–446, 2015.

SILVA, E. Infectious bronchitis in Brazilian chickens: current data and observations of field service personnel. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, v. 12, n. 3, p. 197–203, 2010.

SIMON-LORIERE, E.; HOLMES, E. C. Why do RNA viruses recombine? **Nature Reviews Microbiology**, v. 9, n. 8, p. 617–626, 2011.

SLATER-HANDSHY, T. et al. HCV E2 glycoprotein: Mutagenesis of N-linked glycosylation sites and its effects on E2 expression and processing. **Virology**, v. 319, n. 1, p. 36–48, 2004.

SPENCER, K. A. et al. Role of phosphorylation clusters in the biology of the coronavirus infectious bronchitis virus nucleocapsid protein. **Virology**, v. 370, n. 2, p. 373–381, 2008.

TARNAGDA, Z. et al. Prevalence of infectious bronchitis and newcastle disease virus among domestic and wild birds in H5N1 outbreaks areas. **Journal of Infection in Developing Countries**, v. 5, n. 8, p. 565–570, 2011.

TORO, H.; VAN SANTEN, V. L.; JACKWOOD, M. W. Invited Review: Genetic Diversity and Selection Regulates Evolution of Infectious Bronchitis Virus. **Avian Diseases Digest**, v. 7, n. 3, p. e1–e2, 2012.

TRIPET, B. et al. Structural characterization of the SARS-coronavirus spike S fusion protein core. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 20, p. 20836–20849, 2004.

VALASTRO, V. et al. S1 gene-based phylogeny of infectious bronchitis virus: An attempt to harmonize virus classification. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 39, p. 349–364, 2016.

VENNEMA, H. et al. Nucleocapsid-independent assembly of coronavirus-like particles by co-expression of viral envelope protein genes. **The EMBO Journal**, v. 15, n. 8, p. 2020–2028, 1996.

VILLARREAL, L. Y. B. et al. Molecular characterization of infectious bronchitis virus strains isolated from the enteric contents of brazilian laying hens and broilers. **Avian Diseases**, v. 51, n. 4, p. 974–978, 2007.

VILLARREAL, L. Y. B. et al. Molecular Epidemiology of Avian Infectious Bronchitis in Brazil from 2007 to 2008 in Breeders, Broilers, and Layers. **Avian Diseases**, v. 54, n. 2, p. 894–898, 2010.

WANG, A. C. et al. Isolation, pathogenicity, and H120 protection efficacy of infectious bronchitis viruses isolated in Taiwan. **Avian Diseases**, v. 40, n. 3, p. 620–625, 1996.

WANG, C. H.; HUANG, Y. C. Relationship between serotypes and genotypes based on the hypervariable region of the S1 gene of infectious bronchitis virus. **Archives of Virology**, v. 145, n. 2, p. 291–300, 2000.

WEISS, S. R.; NAVAS-MARTIN, S. Coronavirus pathogenesis and the emerging pathogen severe acute respiratory syndrome. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 69, n. 4, p. 635–664, 2005.

WISSINK, E. H. J. et al. Significance of the oligosaccharides of the porcine reproductive and respiratory syndrome virus glycoproteins GP2a and GP5 for infectious virus production. **Journal of General Virology**, v. 85, n. 12, p. 3715–3723,

2004.

ZANELLA, A. et al. Avian infectious bronchitis: Characterization of new isolates from Italy. **Avian Diseases**, v. 47, n. 1, p. 180–185, 2003.

APÊNDICES

APÊNDICE A – LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AGPT	=	Teste de precipitação em ágar gel
AIC	=	Critério de Informação de Akaike
aLRT	=	*Approximate likelihood-ratio test*
ALV	=	Vírus da leucose aviária
ANV	=	Vírus da nefrite aviária
BIC	=	Critério de Informação Bayesiano
BIG	=	Bronquite infecciosa das galinhas
BLASTn	=	*Nucleotide Basic Local Alignment Search Tool*
BR-I	=	Estirpe brasileira do IBV
BToV	=	*Bovine torovirus*
°C	=	Graus Celsius
CAstV	=	Astrovírus de galinha
CAV	=	Vírus da anemia infecciosa das galinhas
cm	=	Centímetro
cDNA	=	DNA complementar
ChPV	=	Parvovírus de galinha
D274	=	Estirpe D274 do IBV
DEPC	=	Dietil pirocarbonato
DNA	=	Ácido desoxirribonucleico
DKNV	=	*Dak nong virus*
dNTPS	=	Base nitrogenada (A, T, C ou G)
DTT	=	Ditiotreitol
EAV	=	Equine arteritis virus
EDTA	=	Ácido etilenodiaminotetracético
ELISA	=	*Enzyme-linked immunosorbent assay*
FadV-1	=	Adenovírus do grupo 1
FadV-2	=	Adenovírus do grupo 2
FCoV	=	*Feline coronavirus*
FFT-NS-i	=	Método de refinamento iterativo e lento
fg	=	Fentograma
+G	=	Distribuição Gama
g	=	Aceleração da gravidade terrestre (9,8m/s^2)

g	=	Grama
GIT	=	Isotiocianato de guanidina
GT	=	Tiocianato de guanidina
GTR	=	Tempo Geral Reversível
HI	=	Inibição da hemaglutinação
HToV	=	*Human torovirus*
HVR	=	Região hipervariável
IBDV	=	Vírus da doença infecciosa da bursa
IBV	=	*Infectious bronchitis virus*
IFA	=	Teste de imunofluorescência
IPA	=	Teste de imunoperoxidase
Kb	=	Kilobase
LAW	=	*Lawsonia intracellularis*
LT	=	Longitude do amplicon
M	=	Molar
Mass	=	Estirpe Massachusetts do BIG
MDV	=	Vírus da doença de Marek
MERS-CoV	=	*Middle East respiratory syndrome coronavirus*
MG	=	*Mycoplasma gallisepticum*
MHV	=	*Mouse hepatitis virus*
mL	=	Mililitro
mM	=	Milimolar
M-MLV	=	Transcriptase reversa do vírus da Leucemia Murina de Moloney
MS	=	*Mycoplasma synoviae*
NA	=	Número de Avogadro (6,022 x 10^{23} moléculas/mol)
NDV	=	Vírus da doença de Newcastle
ng	=	Nanograma
nm	=	Nanômetro
NNNNNN	=	Iniciador randômico hexamêrico
Nsp	=	Proteína não estrutural
Oligo dT_{12-18}	=	Iniciador oligonucleotídico de 12 até 18 adeninas
ORF	=	*Open Reading Frame*
ORT	=	O*rnithobacterium rhinotracheale*
pb	=	Pares de bases

PBS	=	Tampão fosfato salino
PCR	=	Reação em cadeia pela polimerase
pH	=	Potencial hidrogeniônico
PM	=	Peso molecular
POX	=	Poxvírus
PEDV	=	*Porcine epidemic diarrhea virus*
PRRSV	=	*Porcine reproductive and respiratory syndrome virus*
PToV	=	*Porcine torovirus*
PVA	=	Metapneumovírus aviário
q	=	*quantitative*
Q1	=	Estirpe Q1 do IBV
QX	=	Estirpe QX do IBV
REO	=	Reovírus
REV	=	Vírus da reticuloendoteliose aviária
RFLP	=	Polimorfismo de comprimento de fragmentos de DNA
RNA	=	Ácido ribonucleico
RNAse	=	Ribonuclease
RT	=	Transcriptase reversa
RV	=	Rotavírus
S1	=	Subunidade 1 da glicoproteína da espícula do BIG
S2	=	Subunidade 2 da glicoproteína da espícula do BIG
SARS-CoV	=	*Severe acute respiratory syndrome coronavirus*
SH-like	=	*Shimodaira-Hasegawa-like procedure*
SPF	=	*Specific Pathogen Free*
TE	=	Tampão Tris EDTA
TGEV	=	*Transmissible gastroenteritis coronavirus*
TRIS	=	Hidroximetil-aminometano
U	=	Unidade de atividade enzimática
UTR	=	*Untraslated region*
UV	=	Ultravioleta
V	=	Volume
V	=	Volts
vEA	=	Vírus da encefalomielite aviária
vIA	=	Vírus da influenza aviária

vLTI	=	Vírus da laringotraqueíte infecciosa
VNT	=	Teste de neutralização viral
VU	=	Variante única do IBV
WBV	=	*White bream virus*
Y	=	Número de cópias de DNA por µL
YHV	=	*Yellow head virus*
10X	=	10 vezes concentrado
5X	=	5 vezes concentrado
793B	=	Estirpe 793B do IBV
µg	=	Micrograma
µL	=	Microlitro
µM	=	Micromolar