

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE VETERINÁRIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

**VÍRUS DA BRONQUITE INFECCIOSA DAS GALINHAS - UM ESTUDO DE  
CAMPO EM LOTES DE PRODUÇÃO INDUSTRIAL NO BRASIL**

**Aline Padilha de Fraga**

**Porto Alegre, 2014**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL**  
**FACULDADE DE VETERINÁRIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

**VÍRUS DA BRONquite INFECCIOSA DAS GALINHAS - UM ESTUDO DE  
CAMPO EM LOTES DE PRODUÇÃO INDUSTRIAL NO BRASIL**

**Aline Padilha de Fraga**

Dissertação apresentada como requisito parcial para  
obtenção do grau de Mestre em Ciências Veterinárias, na  
área de Virologia.

**Orientador: Cláudio Wageck Canal**

**Co-orientador: Vagner Ricardo Lunge**

**PORTO ALEGRE**

**2014**

### CIP - Catalogação na Publicação

de Fraga, Aline Padilha

Vírus da bronquite infecciosa das galinhas - um estudo de campo em lotes de produção industrial no Brasil / Aline Padilha de Fraga. -- 2014.

61 f.

Orientador: Cláudio Wageck Canal.

Coorientador: Vagner Ricardo Lunge.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Veterinária, Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Porto Alegre, BR-RS, 2014.

1. vírus da bronquite infecciosa das galinhas. 2. diagnóstico molecular. I. Canal, Cláudio Wageck, orient. II. Lunge, Vagner Ricardo, coorient. III. Título.

Aline Padilha de Fraga

**VÍRUS DA BRONQUITE INFECCIOSA DAS GALINHAS - UM ESTUDO DE  
CAMPO EM LOTES DE PRODUÇÃO INDUSTRIAL NO BRASIL**

Aprovada em 2014

APROVADA POR:

---

Prof. Dr. Cláudio Wageck Canal  
Orientador e Presidente da Comissão

---

Prof. Dr. Fernando Rosado Spilki  
Membro da Comissão

---

Prof. Dr. Nilo Ikuta  
Membro da Comissão

---

Prof. Dr. André Felipe Streck  
Membro da Comissão

## **DEDICATÓRIA**

Dedico este trabalho ao meu irmão.

*In memoriam* de Willian Padilha.

Que falta você nos faz!

Saudades, neguinho!

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço imensamente ao meu orientador, professor Cláudio Canal, pela oportunidade de desenvolver este trabalho. Sem dúvidas foi determinante para continuar a fazer o que gosto. Obrigado pelas palavras de carinho e tranquilidade!

“O professor atua como um mediador e articulador do acesso das crianças que levem as crianças a desenvolverem o seu conhecimento”.

Agradeço ao professor Vagner Lunge pelo carinho e paciência. Não tenho palavras para expressar o quão importante ele é pra tudo que conquistei. Ao longo destes anos guiando meu caminho ... Mostrando a cada momento compreensão, paciência, sabedoria, dedicação e, principalmente, persistência. Agradeço também pela perseverança neste ano tão difícil e interminável.

“Parabéns aos nossos mestres que nos convidaram a voar em sua sabedoria, mesmo sabendo que este voar dependeria das asas de cada um de nós”.

*“A galinha é só um meio de um ovo fazer um outro ovo”.*

Samuel Butler

## RESUMO

As doenças respiratórias são bastante comuns na avicultura industrial, entre as quais a bronquite infecciosa das galinhas (BIG) é uma doença de importância econômica. A doença é causada pelo vírus da bronquite infecciosa (VBI) e gera grandes perdas em todas as etapas do processo de produção de aves, seja em frangos de corte, reprodutores e/ou poedeiras. Além do quadro respiratório, o VBI pode se apresentar de outras formas clínicas. As diferentes cepas do vírus possuem tropismo diferenciado pelos sistemas digestório, reprodutivo e urinário. Diversos dados recentes de caracterização genética do vírus no país demonstram a ocorrência de um único genótipo variante no Brasil (BR-I), além do genótipo vacinal Massachusetts (Mass). No entanto, pouco se sabe sobre a frequência e distribuição tecidual destas variantes nos plantéis brasileiros. A presente dissertação é composta por dois artigos científicos sobre este tema. O objetivo do primeiro trabalho foi avaliar os genótipos de ocorrência em lotes de comercialização industrial no país. Para isso, foram obtidas amostras de lotes da Região Sul, Sudeste, Centro-Oeste e Nordeste do país. A caracterização foi realizada a partir do sequenciamento parcial do gene S de 49 amostras que foram comparadas com sequências de referência do GenBank e de isolados de campo do país. Onze amostras (22,4%) foram filogeneticamente similares ao genótipo vacinal Mass e 34 amostras (69,4%) agruparam com o genótipo brasileiro, previamente descrito, denominado BR-I. No entanto, quatro amostras (8,2%) formaram um novo grupo, denominado BR-II. Estes resultados demonstram a maior ocorrência do genótipo variante de campo tipicamente brasileiro. O segundo trabalho teve por objetivo determinar a frequência do VBI em diferentes regiões do país, além de determinar a frequência dos genótipos brasileiros em duas categorias de aves (frangos de corte e matrizes), de diferentes idades e nos diferentes sistemas fisiológicos infectados pelo VBI. Para isso, foram obtidos *pools* de órgãos de 198 lotes de frangos e 234 lotes de matrizes com sinais clínicos de BIG, das regiões Sul, Centro-Oeste e Nordeste do país. A detecção do VBI foi realizada por real time RT-PCR (qRT-PCR) da região 5' UTR e a determinação dos genótipos por sequenciamento parcial do gene S1. Os resultados demonstraram frequência similar do VBI nas granjas das diferentes regiões do país, com índice maior em frangos de corte (média de 54%) do que em matrizes (média de 30,8%). O VBI foi detectado em aves de todas as idades, no entanto, o genótipo Mass foi mais frequentemente encontrado em frangos de até quatro semanas de idade, em frangos com idade próxima ao abate (> 4semanas) e matrizes houve o predomínio do genótipo BR. O sistema com maior frequência de detecção do VBI, em matrizes, foi o digestório (40%), com diferença significativa. Em frangos, a frequência de detecção nos sistemas digestório (43,5%) e respiratório (37,7%) não apresentou diferença significativa. Estes resultados demonstram a alta frequência dos genótipos brasileiros nos plantéis, sendo encontrados principalmente nos órgãos do sistema digestivo.



## ABSTRACT

Infectious bronchitis (IB) is one of the most important respiratory diseases in the poultry industry. The agent, infectious bronchitis virus (IBV), generates losses in all stages of the poultry production (broilers, breeders and/or layers). Besides respiratory signs, IBV may present other different clinical forms: digestive, reproductive and urinary. IBV presents also a high genetic diversity among strains in different poultry-producing regions of the world. Recent studies demonstrate a large dissemination of local variant strains in Brazil (genotype BR-I), but the vaccine genotype Massachusetts (Mass) is also frequently found in poultry flocks. The present Masters Dissertation has two scientific articles on this topic. The aim of the first study was to evaluate the genotypes occurring in industrial poultry production flocks in Brazil. Samples of poultry flocks were obtained from different regions (South, Southeast, Midwest and Northeast). Molecular characterization was performed by partial sequencing of the S gene and comparison with reference (obtained in Genbank database) and field isolates sequences. Eleven samples (22.4%) were phylogenetically similar to Mass vaccine genotype and 34 samples (69.4%) grouped with the BR-I genotype. However, four samples (8.2%) originated a new group, denominated BR-II. These results demonstrate a high prevalence of the variant genotype BR-I in Brazil and the emergence of the novel BR-II genotype in the Midwest region. The second study aimed to determine the occurrence of IBV in different regions of the country and to evaluate the viral frequency in two poultry production types of birds (broilers and breeders), in different ages and in different physiological systems. Organs pools were collected from 198 broilers and 234 breeder flocks with IB clinical signs and from the three different Brazilian geographic regions: South, Midwest and Northeast. IBV detection was carried out by real time RT-PCR (qRT-PCR) of the 5' untranslated region and genotyping by partial sequencing of the S1 gene. The results showed similar IBV frequency on farms of different regions of the country with a higher rate in broilers (average 54%) than in breeders (mean 30.8%). IBV was detected in birds of all ages. Mass genotype was more often found in chickens up to four weeks of age, while BR genotypes were more frequent in broilers next to slaughter age and in all ages of breeders. The system with highest frequency of IBV was the digestive (40%) in breeders. In broilers, the frequency of detection in the digestive (43.5%) and respiratory (37.7%) systems showed no significant difference. These results demonstrate the high frequency of the Brazilian genotypes in the flocks, being found mainly in the organs of the digestive system.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Desenho esquemático do VBI destacando as suas proteínas estruturais ..... 16
- Figura 2.** Representação do genoma do VBI ..... 17

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AIV: *Avian Influenza Virus* - Vírus da Influenza aviária

AmPV: *Avian Metapneumovirus* - Metapneumovírus aviário

Ark: Arkansas (sorotipo/genótipo)

BIG: Bronquite Infecciosa das Galinhas

Conn: Connecticut (sorotipo/genótipo)

E: *Envelope* - Envelope (proteína do)

ELISA: *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* - Ensaio imunoenzimático de adsorção em fase sólida

M: *Membrane* - Membrana (proteína da)

Mass: Massachusetts (sorotipo/genótipo)

N: *Nucleocapsid* - Nucleocapsídeo (proteína do)

NDV: *Newcastle disease virus* - Vírus da doença de Newcastle

IBV: *Infectious bronchitis virus* - Vírus da Bronquite Infecciosa das Galinhas

Kb: kilobase

ILTV: *Infectious laryngotracheitis virus* - Vírus da Laringotraqueíte Infecciosa

ORF: *Open Reading Frame* - Fase Aberta de Leitura

PCR: *Polymerase Chain Reaction* - Reação em Cadeia da Polimerase

PI: Pós-infecção

RFLP: *Restriction Fragment Length Polymorphism* - Polimorfismo de tamanho de fragmentos de restrição

RNA: *Ribonucleic Acid* - Ácido Ribonucléico

RT-PCR: *Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction* - Transcrição Reversa seguida de Reação em Cadeia da Polimerase

S: *Spike* - Espícula (proteína da)

S1: Subunidade 1 (da proteína da Espícula viral - S)

S2: Subunidade 2 (da proteína da Espícula viral - S)

SPF: *Specific Pathogen Free* - Livre de Patógeno Específico

UTR: *Untranslated Region* - Região não traduzida

VBI: Vírus da Bronquite Infecciosa da Galinhas

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>12</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>14</b>
2.1	Doenças respiratórias em aves.....	14
2.2	Bronquite Infecciosa das Galinhas (BIG) .....	15
2.2.1	Etiologia .....	15
2.2.2	Transmissão.....	17
2.2.3	Patogênese.....	18
2.2.4	Aspectos clínicos .....	21
2.2.5	Diagnóstico.....	21
2.2.6	Controle e Prevenção .....	23
2.2.7	Histórico e epidemiologia .....	24
<b>3</b>	<b>JUSTIFICATIVA.....</b>	<b>27</b>
<b>4</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>28</b>
4.1	Objetivo Geral.....	28
4.2	Objetivos Específicos.....	28
<b>5</b>	<b>ARTIGOS CIENTÍFICOS .....</b>	<b>29</b>
<b>6</b>	<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>48</b>
<b>7</b>	<b>CONCLUSÕES .....</b>	<b>54</b>
	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>55</b>

## 1 INTRODUÇÃO

O Brasil é o maior país exportador de carne de aves do mundo desde 2004. A produção atingiu 12,6 milhões de toneladas no ano de 2012, ocupando, no cenário mundial, o terceiro lugar em produção de carne de frango, atrás apenas dos Estados Unidos e China. A região Sul é considerada a maior produtora de carne destinada à exportação no país, responsável por quase 74% da exportação brasileira. A produção avícola no Brasil é desenvolvida, em sua maioria, por sistemas de integração entre produtor e agroindústria, e consiste em apoio aos avicultores com o fornecimento das aves (pintos de um dia), ração, produtos e consultoria de profissionais especializados (UBABEF, 2013).

Para alcançar altos índices de produtividade, é imprescindível a implementação de programas de biossegurança em todas as granjas de produção de aves. Estes programas tem como objetivo minimizar os prejuízos no processo de produção (relacionados à determinada patologia, processos operacionais, etc.) e aumentar a qualidade do produto final destinado ao consumidor (LIMA, 2007). Além disso, a sanidade dos plantéis avícolas torna-se ainda mais importante quando a agroindústria objetiva a exportação, devido a exigências sanitárias internacionais bastante rigorosas (SALLE & MORAES, 2009).

Atualmente a avicultura é uma atividade altamente tecnificada e intensiva em comparação com outras áreas de produção pecuária. Como consequência, a saúde das aves é diretamente afetada, principalmente devido à alta densidade animal nos locais de criação. Esta condição favorece a rápida multiplicação e disseminação de patógenos nos plantéis, dificultando assim o controle de doenças (LIMA, 2007). Neste sentido, é usual a adoção de medidas preventivas contra doenças infecciosas, com associação de procedimentos de manejo (tanto animal, quanto sanitário), controle profilático por meio de vacinações e monitoramento sistemático dos lotes por especialistas e monitorias periódicas. Este controle deve ser implementado em todos os níveis da cadeia produtiva, desde as aves de maior valor genético (matrizes), passando pelos frangos de corte e aves de postura, e chegando até o produto final destinado ao mercado (carne ou ovos) (SALLE & MORAES, 2009).

As doenças respiratórias em aves de produção industrial são de difícil controle e

podem causar significativas perdas econômicas. A bronquite infecciosa das galinhas (BIG), causada por um coronavírus, é uma das principais doenças respiratórias das aves de produção industrial e está associada a elevados índices de queda de produtividade dos lotes, tanto em frangos de corte quanto em poedeiras ou matrizes (DI FÁBIO & BUITRAGO, 2009). O vírus da bronquite infecciosa das galinhas (VBI) é altamente contagioso e possui elevadas taxas de replicação, mutação e recombinação gênica, levando ao surgimento de novas cepas, genótipos e sorotipos de VBI (JACKWOOD, 2012). Devido à existência destes múltiplos tipos de VBI, que podem ou não ter reação cruzada entre si, o controle da doença é bastante difícil (JACKWOOD et al., 2012). A vacinação, através de vacinas vivas atenuadas e inativadas, se constitui uma importante medida de controle, sendo o sorotipo Massachusetts o mais comumente utilizado no campo para este fim (CAVANAGH & GELB JR, 2008). No entanto, a vacinação pode não ser efetiva na proteção das aves quando o tipo de VBI que ocorre no plantel é distinto do tipo vacinal (DI FÁBIO & BUITRAGO, 2009).

O presente estudo teve por objetivo realizar a detecção e caracterização molecular do VBI em granjas de produção industrial de aves de diferentes regiões geográficas do Brasil nos anos de 2010 a 2011. Além disso, foram avaliados aspectos epidemiológicos gerais (como distribuição geográfica da doença, frequência em matrizes e frangos de corte e idade dos lotes) e a capacidade de disseminação tecidual do vírus nos plantéis industriais. Estas informações são essenciais para definição das cepas predominantes (vacinais e/ou variantes locais) no nosso meio, conhecimento da biologia viral e escolha do programa preventivo de biossegurança geral (e mais especificamente de vacinação).

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Doenças respiratórias em aves

As doenças respiratórias que acometem as aves criadas comercialmente geram grande impacto econômico ao setor avícola, pois causam prejuízos pelos gastos com medicamentos, perdas de produção (aumento da mortalidade, menor eficiência alimentar, queda de postura, redução na qualidade e eclodibilidade dos ovos). As principais doenças respiratórias tem como causa agentes infecciosos, principalmente vírus e bactérias, no entanto, há uma forte influência ambiental aumentando a susceptibilidade dos animais à essas doenças.

Entre os vírus que tem tropismo primário pelo sistema respiratório estão o vírus da doença de Newcastle (NDV, *Newcastle disease virus*), vírus da Influenza (AIV, *Avian influenza virus*), vírus da laringotraqueíte infecciosa (ILTV, *Infectious laryngotracheitis virus*), metapneumovírus (AmPV, *Avian metapneumovirus*) e o vírus da bronquite infecciosa das galinhas (IBV, *Infectious bronchitis virus*). No entanto, outros vírus podem infectar o trato respiratório de forma oportunista, tais como, reovírus e adenovírus (VILLEGAS, 1998). As enfermidades bacterianas incluem as micoplasmoses (*Mycoplasma gallisepticum* e *Mycoplasma synoviae*), coriza infecciosa (*Avibacterium paragallinarum*) e colibacilose (*Escherichia coli*).

A evolução do quadro respiratório, de forma geral, é muito similar entre as diferentes enfermidades. De forma geral, é dividido em quatro fases: 1) sinais clínicos inespecíficos, como apatia; 2) apresentação de tosse e espirros, além de edema de pálpebras e irritação ocular; 3) apresentação de secreção nasal e/ou ocular, além de comprometimento sistêmico, com hipertermia, eriçamento de penas e prostração; e 4) progressão para a recuperação/cura ou agravamento e morte. Comumente os quadros mais severos estão relacionados à associação de infecções secundárias, (normalmente bacterianas) onde as aves apresentam depressão severa e intensa dificuldade respiratória (INOUE & CASTRO, 2009).

O tratamento das doenças respiratórias é realizado quando há perdas econômicas no lote. O uso de antimicrobianos é indicado no combate das infecções secundárias na maioria das infecções virais, tendo em vista que não há uso de antivirais na avicultura. O uso de



antimicrobianos é recomendado após antibiograma, para o efetivo controle da população bacteriana, além de evitar a seleção de amostras resistentes a determinada droga (INOUE & CASTRO, 2009).

O controle das enfermidades respiratórias infecciosas envolve a adoção de medidas de biossegurança, tais como controle de trânsito, manejo de dejetos, controle de matéria prima, intervalo entre lotes, controle dos pintos de um dia, além de medidas auxiliares de manejo, como temperatura e ventilação adequadas, água de boa qualidade, ausência de estresse. O uso de vacinas também é bastante comum no campo para controlar as principais enfermidades, sendo considerado de grande importância para o efetivo controle das doenças respiratórias. Em geral, a efetividade do programa de vacinação está diretamente relacionada à identificação dos principais agentes patogênicos (inclusive com relação às cepas e/ou sorotipos específicos) de cada região (INOUE & CASTRO, 2009).

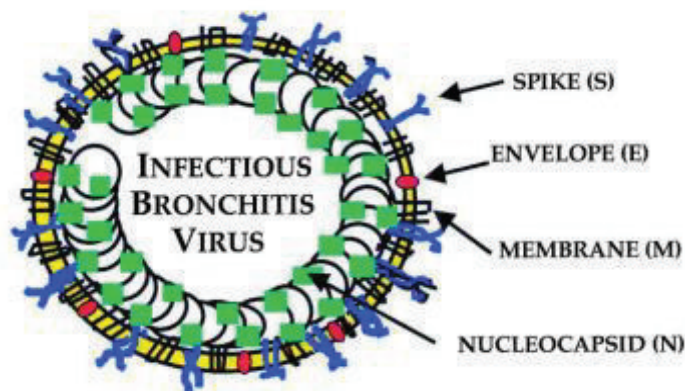
## **2.2 Bronquite Infecciosa das Galinhas (BIG)**

A BIG é uma doença viral aguda, altamente contagiosa (CAVANAGH & GELB JR, 2008), que acomete aves domésticas (*Gallus gallus*) (CAVANAGH, 2007). A doença tem distribuição mundial (CAVANAGH & GELB JR, 2008) e afeta aves de ambos os sexos e de todas as idades. Aves jovens são mais susceptíveis e a mortalidade normalmente é mais elevada nestes animais (LIMA, 2007). A doença apresenta manifestações clínicas respiratórias, renais, entéricas e reprodutivas. A BIG é uma doença de baixa mortalidade, entretanto, causa grandes perdas econômicas decorrentes da diminuição da produção de ovos, perda de qualidade interna e externa dos ovos, infertilidade, retardo no crescimento (DI FÁBIO & BUITRAGO, 2009).

### **2.2.1 Etiologia**

O agente etiológico da BIG é um vírus da ordem *Nidovirales*, família *Coronaviridae*, gênero *Gammacoronavirus* (BRANDÃO et al., 2012; JACKWOOD et al., 2012). A partícula viral é constituída por um envelope lipoproteico e glicoproteínas de superfície, além de uma fosfoproteína que interage com o RNA viral. As proteínas estruturais são: Espícula (S), Envelope (E), Membrana (M) e Nucleocapsídeo (N). A glicoproteína de espícula é clivada em

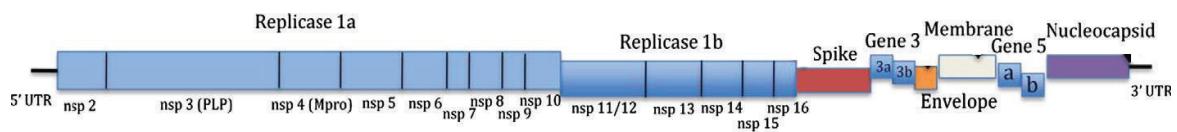
duas subunidades: S1 e S2 com aproximadamente 535 e 625 aminoácidos, respectivamente (PENA et al., 2005). A proteína E possui cerca de 100 aminoácidos (CAVANAGH, 2007) e é importante para a formação de novas partículas infecciosas (MENDONÇA et al., 2009). A proteína M se caracteriza por apresentar baixa variabilidade, sendo composta por cerca de 230 aminoácidos e, assim como a proteína E, participa da montagem das partículas infecciosas (DI FÁBIO & BUITRAGO, 2009). A fosfoproteína N possui, aproximadamente, 420 aminoácidos e tem importante função na replicação viral (ABREU et al., 2010; CAVANAGH, 2007). Especificamente S1 é uma glicoproteína importante na adsorção ao receptor celular e entrada do vírus na célula hospedeira, além de induzir anticorpos neutralizantes, enquanto S2 é responsável pela fusão da membrana (CAVANAGH, 2007). A subunidade S1 é a porção proteica mais variável do vírus onde ocorrem eventos de recombinação e mutação e que levam ao surgimento de variantes antigênicas (MONTASSIER, 2010). A Figura 1 ilustra a distribuição das proteínas estruturais na partícula viral.



**Figura 1.** Desenho esquemático do VBI destacando as suas proteínas estruturais (COLLISSON et al., 2000).

O VBI possui genoma RNA fita simples de sentido positivo com aproximadamente 27,6 kilobases (kb), incluindo de 7 a 10 fases abertas de leitura (ORFs, do inglês *open reading frames*) que codificam proteínas estruturais e não estruturais (MONTASSIER, 2010). O genoma tem a seguinte organização: 5' UTR - Replicases (1a e 1b) - *Spike* (espícula) – Gene 3 (a, b) - Envelope – Membrana – Gene 5 (a, b) - Nucleocapsídeo – 3' UTR (Figura 2). As

regiões 5' UTR e 3' UTR (do inglês, *Untranslated Region*) correspondem às regiões não traduzidas do genoma e possuem, aproximadamente, 500 nucleotídeos cada (CAVANAGH, 2007). O gene da Replicase possui duas ORFs (1a e 1b) e codifica a poliproteína precursora das enzimas associadas à replicação viral e transcrição, em um total de 15 proteínas não estruturais. O restante do genoma codifica as quatro principais proteínas estruturais: Espícula, Envelope, Membrana e Nucleocapsídeo, além de quatro proteínas não estruturais (3a, 3b, 5a e 5b) (CAVANAGH, 2007; MONTASSIER, 2010).



**Figura 2. Representação do genoma do VBI (Jackwood et al., 2012).**

A classificação dos isolados de VBI pode ser realizada por diferentes formas. A classificação mais utilizada é a de sorotipos, realizada através de reações de soro-neutralização, no entanto, com o advento das técnicas de biologia molecular a classificação em genótipos tem se tornado mais comum (DE WIT, 2000). O VBI possui altas taxas de erro durante a replicação viral, aliada a altas taxas de recombinação gênica, consequentemente, uma grande variação antigênica é observada. As taxas de mutação de alguns genótipos/sorotipos, a partir de cepas de vacinas atenuadas já são conhecidas, tais como Mass ( $1.9 \times 10^3$  substituições/sítio/ano) 4/91 ( $3 \times 10^{-3}$  substituições/sítio/ano), DE072 ( $1.5 \times 10^{-2}$  substituições/sítio/ano) e Conn ( $1.5 \times 10^4$  substituições/sítio/ano) (Revisado por JACKWOOD et al., 2012). Mais recentemente, o VBI tem sido classificado em protectotipos, ou seja, grupos de sorotipos que promovem proteção cruzada entre si (DE WIT et al., 2011; DI FÁBIO & BUITRAGO, 2009). Segundo De Wit (2000) esta classificação é de grande importância prática, pois ela é capaz de prover informação direta sobre a eficácia de determinada vacina, no entanto, este conceito ainda não se aplica no campo.

### 2.2.2 Transmissão

A BIG é uma doença altamente contagiosa e com período de incubação muito curto.

Aves infectadas podem apresentar sinais clínicos da doença 24-48 horas após a infecção (CAVANAGH & GELB JR, 2008). A partir de então, o VBI pode estabelecer infecção persistente em galinhas (CAVANAGH, 2007). Os principais sítios de persistência viral são os rins e órgãos do trato digestório, especialmente as tonsilas cecais (CAVANAGH & GELB JR, 2008; IGNJATOVIC & SAPATS, 2000). Durante este período, normalmente ocorre excreção intermitente do VBI. Em um experimento clássico, foi demonstrado que o início da postura foi precedido ou coincidiu com um período de excreção viral, além do período inicial de replicação viral (JONES & AMBALI, 1987). Os autores inclusive sugerem que a excreção intermitente pode ser um importante meio de introdução de vírus para novas instalações.

O VBI se dissemina rapidamente entre as aves de um mesmo lote por via horizontal (contato direto e indireto), sendo a transmissão vertical apenas sugerida (DI FÁBIO & BUITRAGO, 2009). A principal via de transmissão do VBI é por aerossóis, mas a infecção também pode acontecer com a ingestão de água e alimentos contaminados com material fecal. A capacidade de disseminação por via aérea entre lotes é desconhecida, no entanto, é considerado que outras espécies de aves possam atuar como vetores do VBI (CAVANAGH & GELB JR, 2008).

O vírus pode sobreviver por dias no meio ambiente, principalmente em baixas temperaturas (BRANDÃO et al., 2012). Além disso, existem relatos de sobrevivência por até 20 semanas nas fezes (CAVANAGH & GELB JR, 2008), sendo uma possível fonte de infecção às aves (IGNJATOVIC & SAPATS, 2000).

### **2.2.3 Patogênese**

O VBI é inicialmente epiteliotrófico e penetra na célula por viropexia, ou seja, ocorre a translocação do vírus inteiro através da membrana citoplasmática (PATTERSON & BINGHAM, 1976). O local inicial de replicação, independentemente da cepa, é o trato respiratório superior. Neste sistema, normalmente ocorre a infecção das células epiteliais da traqueia e apenas eventualmente do pulmão (causando pneumonia) e dos sacos aéreos (CAVANAGH, 2007). A progressão das lesões traqueais pode ser classificada em três estágios: (1) degenerativa, ocorre nos primeiros dois dias pós-infecção (PI) e apresenta

deciliação e descamação do epitélio e células caliciformes, com moderada infiltração de heterófilos e linfócitos; (2) hiperplásica, é observada a formação de novas células epiteliais; (3) regenerativa, há a reparação do tecido lesionado, podendo levar de 10 a 20 dias PI para a completa regeneração tecidual (NAKAMURA et al., 1991). A infecção do trato respiratório pode favorecer o surgimento de infecções secundárias (CAVANAGH & GELB JR, 2008; DI FÁBIO & BUITRAGO, 2009). Além disso, a deciliação e descamação que ocorre nos primeiros dias PI são utilizadas como critério diagnóstico da patogenia do vírus pela observação de ciliostase, ou seja, a parada dos movimentos ciliares observada por microscopia (COOK et al., 1976). Mas este processo não é comum a todas às cepas, pois aquelas que, normalmente, tem tropismo por outros sistemas fisiológicos podem não apresentar ciliostase (CAVANAGH & GELB JR, 2008).

A maioria das cepas de VBI podem ser isoladas a partir do trato respiratório, com maior concentração na traqueia, durante os primeiros 3 a 5 dias PI (DE WIT, 2000). O título viral cai rapidamente na segunda semana PI e o isolamento viral nem sempre é possível (DE WIT, 2000; MACLACHLAN & DUBOVI, 2011). Após a infecção no trato respiratório, segue-se viremia com a disseminação do vírus para diversos tecidos (MACLACHLAN & DUBOVI, 2011). As células dos tratos urinário (principalmente rins), reprodutivo e digestório são locais de replicação preferencial do VBI (CAVANAGH, 2007; CAVANAGH & GELB JR, 2008; COOK et al., 2012). A replicação viral nos rins ocorre nos túbulos contorcidos proximais e distais e túbulos coletores. O vírus causa degeneração granular, vacuolização e descamação do epitélio tubular (CAVANAGH & GELB JR, 2008). A lesão das células epiteliais pode resultar em alterações no transporte de líquidos e eletrólitos podendo causar falha renal aguda. Os rins podem se apresentar pálidos e edemaciados, com os ureteres dilatados e presença de uratos (DHINAKAR RAJ & JONES, 1997). Aves infectadas por cepas com tropismo preferencial pelos rins (as chamadas nefropatogênicas, como por exemplo, a cepa T, Holte, Gray, SAIBK, B1648) podem não apresentar sinais clínicos ou lesões respiratórias (CAVANAGH & GELB JR, 2008).

A replicação do VBI nas células epiteliais do trato reprodutivo pode levar à diminuição da altura celular, redução ou ausência de cílios, dilatação glandular, focos linfocíticos e infiltração celular na lâmina própria. Observam-se áreas de hipoplasia glandular

com redução da síntese do albúmen. A infecção de fêmeas menores de duas semanas de idade pode levar a danos permanentes no trato reprodutivo, causando uma síndrome denominada de “falsas poedeiras” (DHINAKAR RAJ & JONES, 1997). Já em idades muito jovens, os anticorpos maternos podem prevenir danos ao oviduto durante infecção pelo VBI. Em poedeiras, a infecção pode causar um severo declínio na produção e/ou qualidade externa e interna dos ovos (CAVANAGH & GELB JR, 2008). Também neste caso, aves com infecção por cepas de VBI com tropismo por órgãos do sistema reprodutivo podem não apresentar sinais respiratórios (CAVANAGH & GELB JR, 2008).

No trato digestório, o vírus se replica em diferentes tecidos, como esôfago, pró-ventrículo, duodeno, jejuno, tonsila cecal, reto e cloaca (CAVANAGH, 2007; DHINAKAR RAJ & JONES, 1997). A habilidade do VBI de sobreviver na presença de pH baixo, enzimas digestivas e sais biliares parece ser importante para a sua manutenção neste sistema e, a migração para o intestino (AMBALI,1992). No intestino, a replicação do VBI tem sido descrita em células semelhantes à histiócitos e células linfóides das tonsilas cecais, sendo detectado por imunofluorescência em células epiteliais das vilosidades no íleo e reto (DHINAKAR RAJ & JONES, 1997). El-Houadfi e Jones (1985) reportaram uma variante de VBI enterotrópica, denominada cepa G. Neste mesmo estudo foi realizado um experimento utilizando aves de três semanas de idade, inoculadas, por via intranasal, sendo que os autores isolaram o vírus em órgãos do trato digestório, inclusive em suabe cloacal, por um período de até 28 dias (máximo avaliado). Esta cepa também foi associada com a presença de lesões no intestino, além da traqueia, rim e trato reprodutivo. A sensibilidade das cepas G e M41 (Massachusetts) à tripsina é similar, no entanto a cepa G foi 50 vezes mais resistente aos sais biliares do que a cepa M41 (AMBALI, 1992). Além disso, sabe-se que o VBI infecta células epiteliais do tecido renal, inclusive ureteres. Dolz et al. (2012) sugerem essa como sendo uma via de disseminação do vírus para o trato digestório, fato este reforçado por uma característica anatômica diferencial das aves que não possuem bexiga. Neste caso, os ureteres conduzem a urina recém formada para a cloaca, movidos por contrações musculares retroperistálticas nas regiões mais proximais do cólon e ceco, onde se mistura com o quimo entrando a partir do intestino delgado (LAVERTY et al., 2006).

#### **2.2.4 Aspectos clínicos**

A apresentação clínica da doença é variada, com sinais clínicos respiratórios, renais, entéricos e reprodutivos, diretamente relacionados ao tropismo da cepa infectante (DI FÁBIO & BUITRAGO, 2009). A manifestação clínica mais comum da doença é a respiratória, no entanto, sinais clínicos neste sistema não são patognomônicos de infecção pelo VBI. Sinais respiratórios sugestivos são observados em frangos e incluem tosse, espirros, depressão, inflamação catarral nas vias aéreas e seios nasais com descarga nasal e lacrimejamento, com conseqüente diminuição no consumo de alimento e no ganho de peso. Geralmente as aves adultas não apresentam sinais respiratórios ou estes são discretos (CAVANAGH & GELB JR, 2008).

A manifestação renal pode ser observada em alguns casos, no entanto, são inespecíficos e se confundem com outras doenças. Estes incluem depressão, fezes aquosas, aumento no consumo de água. A doença renal pode ou não ser precedida ou acompanhada pela apresentação respiratória da doença. A mortalidade pode ser elevada quando a lesão renal é acompanhada por urolitíase (CAVANAGH & GELB JR, 2008; DI FÁBIO & BUITRAGO, 2009).

As manifestações clínicas reprodutivas incluem infertilidade, diminuição na produção de ovos, com diminuição da qualidade interna (albúmen aquoso) e externa dos ovos (descoloração da casca, casca fina e porosa). A infecção de fêmeas muito jovens pode levar a gerações de falsas poedeiras (CAVANAGH & GELB JR, 2008; COOK et al., 2012; DI FÁBIO & BUITRAGO, 2009).

Animais com a forma entérica da doença podem apresentar fezes aquosas e/ou diarreia severa (DI FÁBIO & BUITRAGO, 2009). No entanto, a infecção, pelo VBI, no trato intestinal, comumente não acompanha manifestação clínica de doença (CAVANAGH, 2007).

#### **2.2.5 Diagnóstico**

O diagnóstico de BIG, no campo, é normalmente realizado com base no histórico do lote e presença de sinais clínicos, sendo que estes podem ser os mais diversos, conforme



previamente destacado. No entanto, a apresentação clínica respiratória é a mais comumente observada pelos veterinários de campo. A confirmação é realizada por exames laboratoriais, já que a BIG apresenta sinais comuns a outras doenças. Os ensaios laboratoriais incluem inoculação em ovos embrionados, vírus-neutralização, ensaio imunoenzimático de absorção em fase sólida (*ELISA*, do inglês *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*), inibição da hemoaglutinação e técnicas de biologia molecular, como a reação em cadeia da polimerase (PCR, do inglês *Polymerase Chain Reaction*) (LIMA, 2007).

O teste padrão ouro para a detecção do VBI é o isolamento em ovos embrionados livre de patógeno específico (SPF, do inglês *Specific Pathogen Free*). O espécime clínico (órgãos e tecidos) é inoculado na cavidade alantóide de ovos embrionados SPF de 9 a 11 dias de idade e após 48-72 horas analisa-se a ocorrência de lesões características da presença do vírus, como nanismo, encurvamento e hemorragias no embrião. No entanto, apresenta como desvantagem o fato de necessitar de 3 a 5 passagens para que as lesões sejam observadas, sendo uma técnica laboriosa e demorada (BRANDÃO et al., 2012).

A metodologia mais tradicional para a caracterização do VBI é a sorotipagem (DE WIT, 2000). Esta é uma técnica baseada em reações sorológicas definidas em função dos epítomos presentes na porção S1 da proteína de espícula. Portanto, amostras de VBI que pertencem ao mesmo sorotipo (sorotipo homólogo) compartilham epítomos comuns da proteína S1. Da mesma forma, amostras com epítomos distintos pertencem a outro sorotipo (sorotipo heterólogo) (DI FÁBIO & BUITRAGO, 2009).

A transcrição reversa (RT, do inglês *Reverse Transcription*) seguida pela PCR tem sido amplamente utilizada nos últimos anos tanto para diagnóstico, quanto para tipificação de amostras. Os testes de detecção viral têm como alvo regiões altamente conservadas do genoma viral. Neste sentido, regiões do gene do nucleocapsídeo (MEIR et al., 2010; ZWAAGSTRA et al., 1992) e da 5' UTR (CALLISON et al., 2006) são os alvos principais dos testes de detecção molecular. Já a região do gene da espícula (S), especialmente a porção que codifica a subunidade S1, é altamente variável, sendo normalmente escolhida para a genotipagem das amostras de VBI (VILLARREAL, 2010). A análise de polimorfismo de tamanho dos fragmentos amplificados (RFLP, do inglês *Restriction Fragment Length*



*Polymorphism*) pode ser utilizada para a tipagem das amostras. Mais recentemente o sequenciamento de porções do genoma (principalmente da região S1 do gene da espícula) é o procedimento que tem sido mais utilizado para a identificação dos genótipos do VBI (DE WIT, 2000).

Amostras de um mesmo sorotipo, não necessariamente, pertencem ao mesmo genótipo, pois as reações sorológicas se dão em epítomos específicos da proteína S1, portanto, desde que estas porções sejam conservadas as amostras pertencerão ao mesmo sorotipo. No entanto, pequenas diferenças nessas porções da proteína S1 podem ser suficientes para gerar um novo sorotipo (DE WIT et al., 2011), principalmente se estas mutações ocorrerem nas regiões hipervariáveis (MONTASSIER, 2010).

#### **2.2.6 Controle e Prevenção**

Medidas de biossegurança e manejo são utilizados para evitar a entrada de patógenos na granja (DI FÁBIO & BUITRAGO, 2009). Estas incluem controle de trânsito, manejo de dejetos, controle de matéria prima, intervalo entre lotes, controle dos pintos de um dia, além de temperatura e ventilação adequadas, água de boa qualidade, ausência de estresse (INOUE & CASTRO, 2009). Mas mesmo nas granjas com elevado nível de biossegurança, o controle da BIG é realizado com programas de vacinação específicos. As vacinas contra BIG são utilizadas desde os anos 1950, tendo sido aperfeiçoadas ao longo dos anos. Existem vacinas para diferentes sorotipos, tais como, Massachusetts (Mass), Arkansas (Ark) e D274 (LIMA, 2007). No entanto, somente o sorotipo Mass tem seu uso licenciado, para produção de vacinas atenuadas, para lotes de produção industrial no Brasil (LIMA, 2007; MONTASSIER, 2010).

Há no mercado vacinas vivas atenuadas e inativadas contra BIG (MONTASSIER, 2010). As vacinas vivas são produzidas pela passagem seriada de vírus em ovos embrionados SPF, causando a atenuação da cepa viral (DI FÁBIO & BUITRAGO, 2009). As vacinas vivas podem ser aplicadas por *spray* ou via água até o 3º dia de vida dos pintos (LIMA, 2007). As vacinas inativadas possuem o vírus inativado e são aplicadas individualmente, sendo utilizadas em aves de postura previamente imunizadas com vacinas vivas (DI FÁBIO & BUITRAGO, 2009).

Não há uma vacina específica contra os isolados brasileiros. De acordo com Di Fábio e Buitrago (2009) a escolha da cepa vacinal mais próxima à cepa de campo seria a estratégia mais adequada para um bom programa vacinal. No entanto, a revacinação com sorotipo heterólogo ao da primo-vacinação pode prover proteção contra um número maior de sorotipos (CAVANAGH, 2007). Em experimento realizado por Cook et al. (1999) foi testado o escore de proteção, através da avaliação de ciliostase, das vacinas Ma5 (sorotipo Mass) e 4/91 (sorotipo 4/91) quando aplicadas sozinhas e associadas e posterior desafio com cepas homólogas e heterólogas. Os resultados demonstram uma ótima correlação de proteção entre os sorotipos homólogos e altos índices de proteção contra diferentes sorotipos, sendo esta forma de controle da doença em locais onde se encontram mais de um genótipo circulante.

### **2.2.7 Histórico e epidemiologia**

O primeiro relato de BIG foi descrito por Schalk e Hawn, nos Estados Unidos, em 1931. Esta foi descrita como uma doença respiratória de aves jovens, e a causa viral estabelecida em 1936 (COOK et al., 2012). Outras manifestações clínicas, como declínio na produção de ovos e a doença respiratória típica foi observada nos anos 1940. No início dos anos 1950 foi desenvolvida a primeira vacina contra VBI usando a cepa M41 (Mass). Em 1956, Jungherr e colaboradores isolaram um sorotipo distinto do sorotipo Mass original, chamado Connecticut (Conn), e verificou-se que não havia proteção cruzada entre estes dois sorotipos (CAVANAGH & GELB JR, 2008; COOK et al., 2012; DE WIT et al., 2011), sendo considerado um sorotipo variante. Na década seguinte foram desenvolvidas as vacinas H52 e H120 (ambas Mass) amplamente utilizadas até os dias atuais.

A partir de 1960, lesões no tecido renal foram associadas à BIG. Na década de 70 foram descritos diversos sorotipos variantes de VBI, tais como, Florida, Clark 333 e Ark (COOK et al., 2012). Esta última é provavelmente a mais importante variante encontrada nos Estados Unidos, causando perdas econômicas até hoje. Com o surgimento destas variantes virais, contra as quais as vacinas utilizadas não promoviam proteção adequada, houve a necessidade do desenvolvimento de novas vacinas contra as cepas Ark e Florida (DE WIT et al., 2011). O envolvimento do sistema entérico foi associado à infecção pelo VBI apenas nos anos 1970, onde diversos trabalhos reportam a excreção do vírus nas fezes, mas sem aparente

efeito sobre a função intestinal.

Na década de 1980 foram reportadas diversas variantes na Europa (tais como, D274, D1466). O controle destas variantes foi realizado com o uso de vacinas vivas e inativas que utilizavam cepas variantes locais. Com o desenvolvimento de novas ferramentas diagnósticas (em geral técnicas de biologia molecular), diversas variantes foram reportadas no mundo a partir dos anos 1990, tais como California, DE072, Vic S, N2/75, QX (COOK et al., 2012). Apesar da grande diversidade de variantes em todo o mundo, observou-se que um pequeno número tinha maior capacidade de disseminação, causando importantes perdas econômicas. Exemplos são a cepa 4/91, que foi reportada em diversas regiões do mundo como causadora de doença em lotes vacinados, e a variante QX, originalmente identificada na China, associada a casos de proventriculite e que também foi encontrada em outras partes do mundo associada à nefrite, doença respiratória e ocorrência de falsas poedeiras, causando grandes perdas econômicas inclusive em lotes vacinados (DE WIT, 2011).

Na América do Sul, estudos de caracterização molecular do VBI também foram realizados em diferentes regiões de produção industrial. Rimondi et al. (2009) reportaram a ocorrência de variantes argentinas agrupadas em três *clusters*, sendo que um deles (*cluster C*) foi relacionado com variantes brasileiras. Na Colômbia, Alvarado et al. (2005) reportaram a ocorrência de isolados relacionados com as cepas Mass e Conn, além de variantes locais.

No Brasil, o primeiro relato de BIG foi realizado por Hipólito em 1957, sendo reportado o sorotipo Mass (DE WIT et al., 2011). Outro sorotipo (Ark) foi reportado apenas dez anos depois (BRANDEN & DA SILVA, 1986). A maioria dos isolados brasileiros pertencia ao sorotipo Mass até 1989 (MENDONÇA et al., 2009). Di Fábio et al. (2000), utilizando testes de neutralização cruzada em anéis de traquéia, reportou a ocorrência de tipos antigenicamente diferentes do sorotipo Mass. Desde então, diversos trabalhos com o uso de metodologias de biologia molecular reportaram a ocorrência de variantes genotípicas no país. Villarreal et al. (2007) analisaram um total de onze amostras de VBI, isoladas de aves com lesões entéricas, provenientes de granjas das regiões Sul e Sudeste, durante os anos de 2002 a 2006. Na análise do gene S1, todas estas amostras se agruparam em um único clado, com alta similaridade de nucleotídeos entre si e mais relacionados com o genótipo D274, mas distantes

dos genótipos Mass e 4/91. Montassier et al. (2008) analisaram doze amostras de VBI (isoladas em 1988, 1999 e 2000, nas regiões Sul e Sudeste do país), por RT-PCR seguido de RFLP (com as enzimas *HaeIII*, *BstYI* e *XcmI*), do gene S1. Foram encontradas cinco amostras pertencentes ao genótipo Mass e sete amostras pertencentes ao grupo variante, ao qual foi dividido em quatro genótipos distintos, denominados A, B, C e D, de acordo com o padrão de bandas observado na clivagem com as diferentes enzimas de restrição. Felipe et al. (2010) analisaram 23 amostras de frangos (coletadas de 2003 a 2009 e provenientes das regiões Sul, Sudeste e Nordeste) e seis amostras de pombos (coletadas entre 2006 e 2007 e da região Sudeste) pelo sequenciamento do gene S1. As amostras de frango foram divididas em dois grupos principais: onze amostras agruparam com amostras de referência do genótipo Mass, enquanto dez amostras formaram um clado com amostras do genótipo D207. Cinco amostras de pombo agruparam no genótipo Mass. Além disso, uma amostra de frango e outra de pombo agruparam com o genótipo Conn. Outra amostra de frango (denominada IBV/BRAZIL/2008/UNICAMP 830) agrupou com o genótipo Ark. Villarreal et al. (2010) analisando 20 amostras de aves durante os anos de 2007 a 2008, das regiões Sul, Sudeste, Centro-Oeste e Nordeste por sequenciamento do gene S1 demonstraram a disseminação de um único *cluster* de variantes brasileiras que foi então subdividido em três grupos: Brazil 01, 02 e 03. Além disso, três amostras agruparam com o genótipo Mass e duas com o genótipo 4/91. Em estudo mais recente foram avaliadas um total de 41 amostras, provenientes das regiões Sul, Sudeste e Centro-Oeste do país, durante o período de 2003 a 2009. O sequenciamento do gene S1 demonstrou a grande disseminação de variantes genéticas locais nos lotes brasileiros. Estas variantes pertenciam a um único genótipo, intimamente relacionados entre si e distantes do genótipo vacinal Mass que foi então denominado BR-I (CHACÓN et al., (2011).

### **3 JUSTIFICATIVA**

O Brasil é um país de destaque na avicultura mundial e a bronquite infecciosa é uma doença de ampla distribuição nos lotes de produção industrial. O controle desta enfermidade é realizado através de vacinações, sendo que somente o sorotipo/genótipo Massachusetts é permitido para a produção de vacinas atenuadas no Brasil. Apesar do amplo uso de vacinas a doença não está controlada no campo. Dados de caracterização viral, no país, descrevem a ocorrência de variantes brasileiras, além de amostras do genótipo vacinal (Mass) e de alguns casos de outros genótipos previamente descritos (Ark, Conn, D207 e 4/91). No entanto, estes estudos estão limitados a determinadas regiões produtoras do Brasil (principalmente Sul e Sudeste) e não existem dados de frequência e distribuição tecidual do vírus.

## **4 OBJETIVOS**

### **4.1 Objetivo Geral**

Realizar a caracterização molecular do vírus da bronquite infecciosa das galinhas em lotes de produção industrial de aves do Brasil nos últimos anos (2010 – 2012).

### **4.2 Objetivos Específicos**

- 1) Avaliar quais os genótipos de VBI estão presentes nos lotes brasileiros em diferentes regiões produtoras;
- 2) Avaliar a frequência dos genótipos de VBI em diferentes regiões do país;
- 3) Avaliar a frequência dos genótipos de VBI de ocorrência no Brasil em lotes de diferentes idades;
- 4) Avaliar a disseminação dos genótipos de VBI de ocorrência do Brasil nos diferentes sistemas fisiológicos infectados pelo VBI.

## 5 ARTIGOS CIENTÍFICOS

Este trabalho consiste na caracterização do VBI em amostras de diferentes regiões do país. Estas amostras foram submetidas ao sequenciamento parcial do gene S1 e analisadas filogeneticamente em comparação a outras amostras do país e também com cepas de referência do GenBank. Os dados obtidos foram consolidados em um manuscrito publicado no periódico *Avian Diseases* (Artigo 1).

Além disso, foram realizadas análises para elucidar questões em relação à frequência deste vírus nos plantéis avícolas do país e traçar um perfil genotípico de acordo com a categoria animal de produção (frangos de corte e matrizes), idade do lote, região do país e sistema fisiológico das aves. Os dados foram consolidados em um segundo manuscrito aceito para publicação no periódico *Poultry Science* (Artigo 2).

## 5.1 Artigo 1

### **Emergence of a New Genotype of Avian Infectious Bronchitis Virus in Brazil\***

\*Artigo publicado, sob a forma de artigo completo, no periódico *Avian Diseases*.



## Emergence of a New Genotype of Avian Infectious Bronchitis Virus in Brazil

Aline Padilha Fraga,<sup>AC</sup> Eder Balestrin,<sup>A</sup> Nilo Ikuta,<sup>AB</sup> André Salvador Kazantzi Fonseca,<sup>B</sup> Fernando Rosado Spilki,<sup>C</sup> Cláudio Wageck Canal,<sup>D</sup> and Vagner Ricardo Lunge<sup>ABE</sup>

<sup>A</sup>Laboratório de Diagnóstico Molecular, Universidade Luterana do Brasil–ULBRA, Canoas, 92425-900 Rio Grande do Sul, Brazil

<sup>B</sup>Simbios Biotecnologia, Cachoeirinha, 94940-030 Rio Grande do Sul, Brazil

<sup>C</sup>Universidade FEEVALE, Novo Hamburgo, 93352-000 Rio Grande do Sul, Brazil

<sup>D</sup>Universidade Federal do Rio Grande do Sul–UFRGS, Porto Alegre, 91540-000 Rio Grande do Sul, Brazil

Received 4 September 2012; Accepted 6 February 2013; Published ahead of print 11 February 2013

**SUMMARY.** Infectious bronchitis virus (IBV) is the agent of a highly contagious disease that affects domestic fowl (*Gallus gallus*). Recent reports showed a high prevalence of one main IBV genotype (Brazil or BR-I) with low genetic diversity in commercial poultry flocks from Brazil. This research analyzed IBV positive poultry flocks from different rearing regions to verify the S1 gene variability and geographic distribution of variant IBV strains in recent years (2010 and 2011). Samples of IBV-positive flocks were obtained from 60 different farms. Forty-nine partial S1 gene sequences were determined and aligned for phylogenetic and amino acid similarity analyses. Eleven samples (22.4%) were similar to Massachusetts vaccine strains (Mass genotype) and 34 samples (69.4%) to the previously characterized Brazilian BR-I genotype. Interestingly, the remaining four samples (8.2%) clustered into a new IBV variant genotype (Brazil-II or BR-II), divergent from the BR-I. A unique nucleotide sequence insertion coding for five amino acid residues was observed in all the Brazilian variant viruses (BR-I and BR-II genotypes). These results show a higher genetic diversity in Brazilian IBV variants than previously described.

**RESUMEN.** Aparición de un nuevo genotipo del virus de la bronquitis infecciosa aviar en Brasil.

El virus de la bronquitis infecciosa (IBV) es el agente de una enfermedad altamente contagiosa que afecta a las gallinas domésticas (*Gallus gallus*). Los reportes recientes muestran una alta prevalencia de un genotipo principal de este virus (Brasil o BR-I) con baja diversidad genética en las parvadas avícolas comerciales de Brasil. Esta investigación analiza las parvadas avícolas positivas a la presencia de este virus en diferentes regiones, para verificar la variabilidad del gene S1 y la distribución geográfica de las cepas variantes de este virus en los últimos años (2010 y 2011). Se recolectaron muestras del virus de bronquitis de parvadas positivas en 60 granjas diferentes. Se determinaron 49 secuencias parciales del gene S1 y se alinearon para llevar a cabo análisis filogenéticos y de similitud de aminoácidos. Once muestras (22.4%) fueron similares a la cepa vacunal Massachusetts (Mass) (genotipo Mass) y 34 muestras (69.4%) fueron similares a la cepa brasileña previamente caracterizada, genotipo BR-I. De manera interesante, las cuatro muestras restantes (8.2%) se agruparon en un nuevo genotipo variante (Brasil-II o BR-II), que es divergente de la BR-I. Una inserción única en la secuencia de nucleótidos que codifica para cinco residuos de aminoácidos se observó en todos los virus variantes de Brasil (genotipos BR-I y BR-II). Estos resultados muestran una mayor diversidad genética de las cepas variantes brasileñas del virus de la bronquitis infecciosa a diferencia de lo que se había descrito anteriormente.

**Key words:** infectious bronchitis virus, genotype, variant, chicken, characterization

**Abbreviations:** Conn = Connecticut; E = envelope; GuSCN = guanidine isothiocyanate; HVR1/2 = hypervariable region 1/2; IB = infectious bronchitis; IBV = infectious bronchitis virus; M = membrane; Mass = Massachusetts; N = nucleocapsid; nt = nucleotides; RT-PCR = reverse transcription-PCR; S = spike

Infectious bronchitis (IB) is an acute and highly contagious viral disease that affects domestic fowl (*Gallus gallus*) worldwide. IB virus (IBV) initially infects the upper respiratory tract, but lesions can also affect the enteric and urinary tracts (5). The clinical signs of the IB include cough, nasal discharge, watery eyes, reduced egg quality, decreased feed conversion efficiency, and increased carcass condemnations that reduce the performance of the flocks and determine the economic impact of this disease in the poultry industry (11).

IBV is a *Coronavirus* (family *Coronaviridae*, and order *Nidovirales*) and has a single stranded RNA genome with positive sense and about 27.6 Kb in length that encode four structural proteins: nucleocapsid (N), membrane (M), envelope (E), and spike (S). The N phosphoprotein is encoded by a highly conserved gene and plays an important role in viral replication. The M protein participates in the assembly of infectious particles. The E protein, like the M protein, is important for the production of new infectious particles. The S protein is cleaved into two subunits: S1 and S2 with approximately 535 and 625 amino acids, respectively. The S1

glycoprotein is important in adsorption to the cellular receptor and virus entry into the host cell, besides inducing neutralizing antibodies. S1 is encoded by a highly variable gene among the different viral strains and is directly related to the diversity of IBV serotypes (5).

Genetic diversity of this virus, mainly in the S1 gene, was demonstrated in different poultry-producing regions of the world. Historically, serotypes Massachusetts (Mass) and Connecticut (Conn) were the first isolates in the 1940s and 1950s, respectively. In the following decades, several new IBV variants were identified and associated with the disease (8,9). In Brazil, IBV from the serotype Mass was originally identified in 1957 (17). Since then, different serotypes and viral variants were identified in all poultry-producing regions of the country as well as in some neighbor countries (2,12,16,18). Two recent studies demonstrated that the great majority of the IBV strains from commercial flocks with IB clinical signs in different states from Brazil in a period of 7 yr (2003 to 2009) were variants with a high similarity in the S1 glycoprotein gene, suggesting the prevalence of a unique genotype called Brazil (19) or BR-I (7).

<sup>E</sup>Corresponding author. E-mail: vagner.lunge@gmail.com

Table 1. Information from Brazilian IBV field samples analyzed in the present study.

Identification	Year of detection	Sample tissue	State <sup>A</sup>	Region <sup>B</sup>	RT-PCR S1	Group	GenBank Accession No.
IBV/BRAZIL/2010/SB-1558	2010	Kidney and trachea	SC	S	Positive	BR-I	JX559784
IBV/BRAZIL/2010/SB-1875	2010	Trachea	AL	NE	Positive	Mass	JX559785
IBV/BRAZIL/2010/SB-1888	2010	Trachea	RS	S	Negative	—	—
IBV/BRAZIL/2010/SB-1974	2010	Trachea	BA	NE	Positive	BR-I	JX559786
IBV/BRAZIL/2010/SB-1994	2010	Trachea	AL	NE	Positive	BR-I	JX559787
IBV/BRAZIL/2010/SB-2017	2010	Organs pool	RS	S	Positive	BR-I	JX559788
IBV/BRAZIL/2010/SB-2898	2010	Kidney and cecal tonsils	PR	S	Positive	BR-I	JX559789
IBV/BRAZIL/2010/SB-2925	2010	Kidney and trachea	SC	S	Positive	Mass	JX559790
IBV/BRAZIL/2010/SB-3730	2010	Trachea and cecal tonsils	SP	SE	Positive	BR-I	JX559791
IBV/BRAZIL/2010/SB-3735	2010	Trachea and swab of the trachea	RS	S	Negative	—	—
IBV/BRAZIL/2010/SB-4570	2010	Lung and trachea	SP	SE	Positive	BR-I	JX559792
IBV/BRAZIL/2010/SB-5258	2010	Trachea, lung, and kidney	SP	SE	Positive	—	—
IBV/BRAZIL/2010/SB-5261	2010	Trachea	RS	S	Positive	BR-I	JX559830
IBV/BRAZIL/2010/SB-5264	2010	Trachea	RS	S	Positive	BR-I	JX559793
IBV/BRAZIL/2010/SB-5267	2010	Trachea	RS	S	Negative	—	—
IBV/BRAZIL/2010/SB-5273	2010	Trachea	RS	S	Negative	—	—
IBV/BRAZIL/2010/SB-5291	2010	Trachea	RS	S	Negative	—	—
IBV/BRAZIL/2010/SB-5292	2010	Trachea	RS	S	Negative	—	—
IBV/BRAZIL/2010/SB-5293	2010	Trachea	RS	S	Positive	BR-I	JX559794
IBV/BRAZIL/2010/SB-5294	2010	Trachea	RS	S	Positive	BR-I	JX559795
IBV/BRAZIL/2010/SB-5335	2010	Trachea and kidney	SC	S	Negative	—	—
IBV/BRAZIL/2010/SB-5340	2010	Trachea, lung, and kidney	MG	SE	Negative	—	—
IBV/BRAZIL/2010/SB-5528	2010	Trachea	RS	S	Positive	BR-I	JX559796
IBV/BRAZIL/2010/SB-5530	2010	Trachea	RS	S	Positive	BR-I	JX559797
IBV/BRAZIL/2010/SB-5588	2010	Trachea	RS	S	Positive	—	—
IBV/BRAZIL/2010/SB-5677	2010	Kidney and trachea	SC	S	Negative	—	—
IBV/BRAZIL/2010/SB-5679	2010	Trachea, lung, and kidney	RS	S	Positive	BR-I	JX559831
IBV/BRAZIL/2010/SB-5808	2010	Kidney and trachea	SC	S	Positive	BR-I	JX559832
IBV/BRAZIL/2011/SB-A0297	2011	Trachea, cecal tonsil, lung	PR	S	Positive	Mass	JX559798
IBV/BRAZIL/2011/SB-A0395	2011	Cecal tonsil	PR	S	Positive	Mass	JX559799
IBV/BRAZIL/2010/SB-A0399	2010	Lung, trachea, and reproductive tract	SC	S	Positive	BR-I	JX559800
IBV/BRAZIL/2010/SB-A0451	2010	Trachea, cecal tonsil	BA	NE	Positive	BR-I	JX559801
IBV/BRAZIL/2011/SB-A0458	2011	Cecal tonsil	RS	S	Positive	BR-I	JX559802
IBV/BRAZIL/2011/SB-A0473	2011	Cecal tonsil	RS	S	Positive	BR-I	JX559803
IBV/BRAZIL/2010/SB-A0498	2010	Cecal tonsil	GO	CW	Positive	BR-I	JX559804
IBV/BRAZIL/2010/SB-A0552	2010	Trachea	GO	CW	Positive	BR-I	JX559805
IBV/BRAZIL/2011/SB-A0571	2011	Lung	PR	S	Positive	BR-I	JX559806
IBV/BRAZIL/2010/SB-A0588	2010	Trachea, cecal tonsil	BA	NE	Positive	BR-I	JX559807
IBV/BRAZIL/2010/SB-A0680	2010	Cecal tonsil	GO	CW	Positive	BR-I	JX559808
IBV/BRAZIL/2011/SB-A0797	2011	Lung, trachea, and reproductive tract	SC	S	Positive	BR-I	JX559809
IBV/BRAZIL/2010/SB-A1140	2010	Cecal tonsil	PR	S	Positive	BR-I	JX559810
IBV/BRAZIL/2010/SB-A1971	2010	Trachea, cecal tonsil, lung	BA	NE	Positive	BR-I	JX559811
IBV/BRAZIL/2010/SB-A2150	2010	Cecal tonsil	PR	S	Positive	BR-I	JX559812
IBV/BRAZIL/2010/SB-A2160	2010	Trachea, lung	PR	S	Positive	BR-I	JX559813
IBV/BRAZIL/2010/SB-A2240	2010	Trachea, lung	PR	S	Positive	BR-I	JX559814
IBV/BRAZIL/2010/SB-A2308	2010	Cecal tonsil	MT	CW	Positive	Mass	JX559815
IBV/BRAZIL/2010/SB-A2360	2010	Cecal tonsil	PR	S	Positive	BR-I	JX559816
IBV/BRAZIL/2010/SB-A2398	2010	Cecal tonsil	MT	CW	Positive	BR-II	JX559817
IBV/BRAZIL/2010/SB-A2400	2010	Cecal tonsil	PR	S	Positive	BR-I	JX559818
IBV/BRAZIL/2010/SB-A2401	2010	Cecal tonsil	MT	CW	Positive	BR-II	JX559819
IBV/BRAZIL/2010/SB-A2479	2010	Cecal tonsil	PR	S	Positive	BR-I	JX559820
IBV/BRAZIL/2010/SB-A2960	2010	Cecal tonsil	MT	CW	Positive	BR-II	JX559821
IBV/BRAZIL/2010/SB-A2962	2010	Cecal tonsil	MT	CW	Positive	BR-II	JX559822
IBV/BRAZIL/2010/SB-A3507	2010	Cecal tonsil	PR	S	Positive	BR-I	JX559823
IBV/BRAZIL/2010/SB-A3513	2010	Cecal tonsil	PR	S	Positive	Mass	JX559824
IBV/BRAZIL/2011/SB-A4016	2011	Trachea	GO	CW	Positive	Mass	JX559825
IBV/BRAZIL/2011/SB-A4069	2011	Trachea	GO	CW	Positive	Mass	JX559826
IBV/BRAZIL/2011/SB-A4072	2011	Trachea	GO	CW	Positive	Mass	JX559827
IBV/BRAZIL/2011/SB-A5004	2011	Kidney	BA	NE	Positive	Mass	JX559828
IBV/BRAZIL/2010/SB-A6540	2010	Trachea swab	SC	S	Positive	Mass	JX559829

<sup>A</sup>Brazilian states: SC = Santa Catarina; AL = Alagoas; RS = Rio Grande do Sul; BA = Bahia; PR = Paraná; SP = São Paulo; MG = Minas Gerais; GO = Goiás; MT = Mato Grosso.

<sup>B</sup>Brazilian regions: S = south; NE = northeast; SE = southeast; CW = center-west.

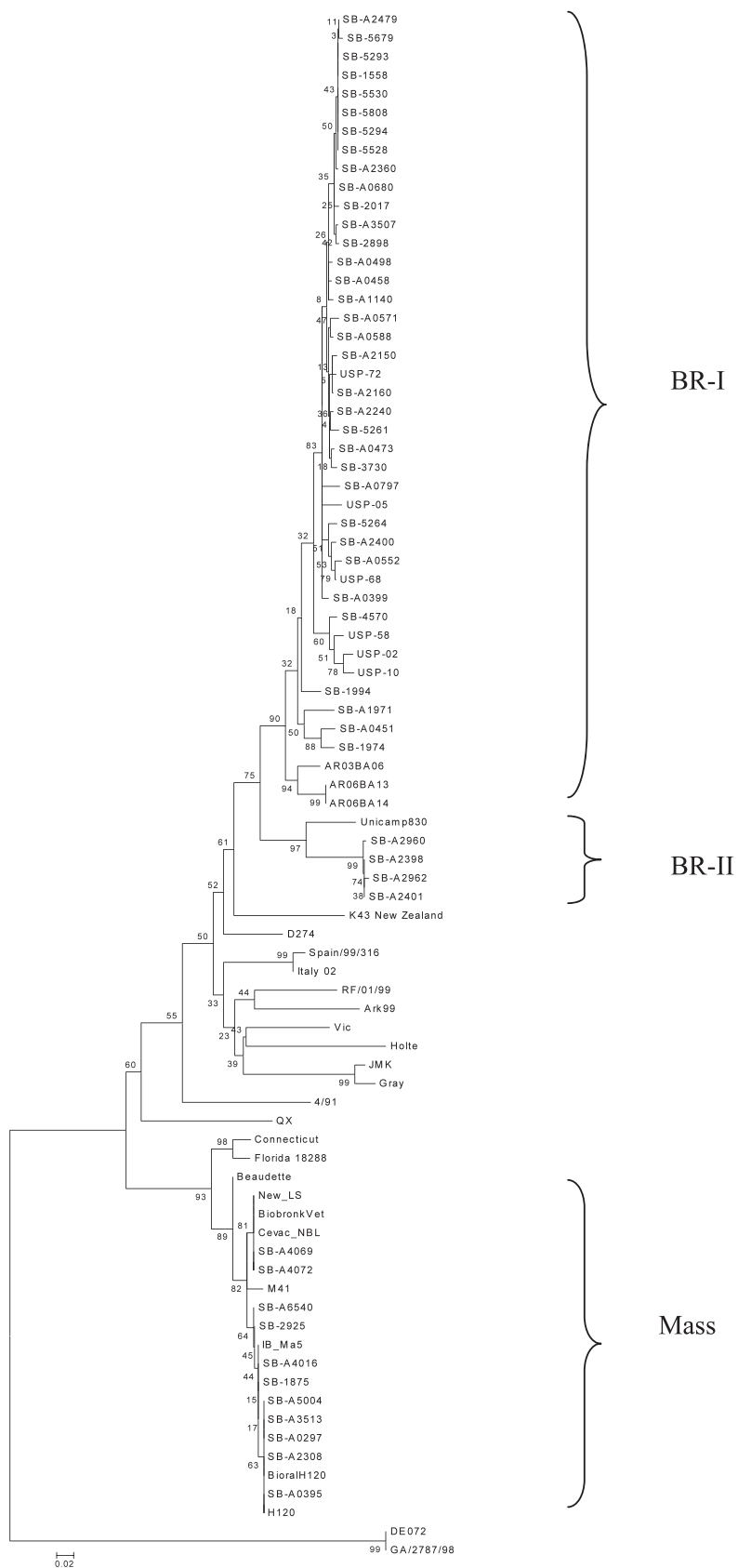


Fig. 1. Phylogenetic relationships of the Brazilian IBV samples (SB, USP, and UNICAMP) and some reference strains based on S1 partial nt sequences determined using MEGA 5.0 with the Clustal W method. Numbers along the branches refer to bootstrap values.

Table 2. Similarity analysis of nt and deduced amino acid sequences from the S1 gene of Brazilian isolates and some reference strains.

Sequence	Percent amino acid similarity											
	SB-A2400	SB-A0451	SB-A0473	SB-A1971	SB-1974	SB-1994	SB-4570	SB-5293	SB-5528	SB-5530	SB-5679	SB-A2962
SB-A2400	—	89.4	96.3	91.0	89.9	91.0	92.6	95.2	94.7	94.8	93.2	88.9
SB-A0451	92.8	—	89.3	91.5	95.8	89.9	90.5	89.4	88.8	89.0	87.8	84.1
SB-A0473	97.5	93.0	—	90.3	88.2	90.9	93.6	96.3	96.4	96.5	94.5	88.2
SB-A1971	92.6	93.6	92.5	—	92.0	89.9	89.4	89.9	88.7	88.9	87.1	86.7
SB-1974	92.2	95.8	92.0	94.5	—	89.9	88.9	87.8	87.0	87.2	85.0	84.1
SB-1994	92.1	92.1	92.5	92.2	93.5	—	92.1	89.9	89.3	90.1	87.8	84.1
SB-4570	93.5	93.3	93.8	91.7	91.7	93.5	—	91.5	91.1	90.7	89.1	86.2
SB-5293	97.0	92.8	98.0	92.4	92.2	92.4	92.9	—	100.0	100.0	98.0	87.3
SB-5528	96.7	92.1	98.4	91.7	91.6	92.5	92.3	100.0	—	100.0	98.0	85.8
SB-5530	96.7	92.3	98.4	91.8	91.7	92.6	92.3	100.0	100.0	—	97.9	86.0
SB-5679	96.4	91.6	97.7	90.5	90.7	91.8	91.2	99.3	99.3	99.3	—	83.7
SB-A2962	88.0	85.5	88.1	86.5	85.9	84.5	85.4	87.8	86.8	87.0	85.3	—
SB-A2960	88.2	85.7	88.2	86.7	85.9	84.7	85.5	88.0	87.0	87.2	85.5	99.6
SB-A2398	88.2	85.7	88.2	86.7	86.1	84.7	85.5	88.0	87.0	87.2	85.5	99.8
SB-A2401	88.2	85.7	88.2	86.7	86.1	84.7	85.5	88.0	87.0	87.2	85.5	99.8
USP-02	95.2	94.5	94.8	92.6	92.6	93.8	96.5	94.9	94.3	94.4	93.7	86.4
USP-05	94.4	91.2	94.7	91.1	89.8	90.5	90.7	94.5	94.7	94.4	94.6	86.1
USP-10	94.7	93.7	94.3	92.2	91.9	92.9	95.4	94.0	93.3	93.4	92.5	86.2
USP-68	98.5	92.9	98.3	92.5	92.6	92.8	93.5	98.0	97.8	97.9	97.5	88.1
USP-72	97.6	92.8	99.2	92.0	91.7	92.5	92.8	98.9	98.8	98.8	98.2	87.8
H120	73.3	72.9	74.3	73.3	73.4	73.3	72.3	73.3	72.1	72.8	71.2	72.0
4/91	72.1	71.7	72.9	72.3	71.9	72.8	72.8	72.1	71.5	71.7	70.2	71.7
D274	79.2	79.6	79.7	80.2	80.7	79.2	79.1	80.1	80.2	80.4	81.3	75.8
M41	73.3	72.9	73.4	73.8	73.8	73.3	72.7	73.6	72.5	73.2	71.4	72.7
QX	70.1	71.0	70.7	70.1	71.2	70.8	71.2	70.8	71.7	71.7	69.5	69.7

Percent nucleotide similarity												
SB-A2400	—	89.4	96.3	91.0	89.9	91.0	92.6	95.2	94.7	94.8	93.2	88.9
SB-A0451	92.8	—	89.3	91.5	95.8	89.9	90.5	89.4	88.8	89.0	87.8	84.1
SB-A0473	97.5	93.0	—	90.3	88.2	90.9	93.6	96.3	96.4	96.5	94.5	88.2
SB-A1971	92.6	93.6	92.5	—	92.0	89.9	89.4	89.9	88.7	88.9	87.1	86.7
SB-1974	92.2	95.8	92.0	94.5	—	89.9	88.9	87.8	87.0	87.2	85.0	84.1
SB-1994	92.1	92.1	92.5	92.2	93.5	—	92.1	89.9	89.3	90.1	87.8	84.1
SB-4570	93.5	93.3	93.8	91.7	91.7	93.5	—	91.5	91.1	90.7	89.1	86.2
SB-5293	97.0	92.8	98.0	92.4	92.2	92.4	92.9	—	100.0	100.0	98.0	87.3
SB-5528	96.7	92.1	98.4	91.7	91.6	92.5	92.3	100.0	—	100.0	98.0	85.8
SB-5530	96.7	92.3	98.4	91.8	91.7	92.6	92.3	100.0	100.0	—	97.9	86.0
SB-5679	96.4	91.6	97.7	90.5	90.7	91.8	91.2	99.3	99.3	99.3	—	83.7
SB-A2962	88.0	85.5	88.1	86.5	85.9	84.5	85.4	87.8	86.8	87.0	85.3	—
SB-A2960	88.2	85.7	88.2	86.7	85.9	84.7	85.5	88.0	87.0	87.2	85.5	99.6
SB-A2398	88.2	85.7	88.2	86.7	86.1	84.7	85.5	88.0	87.0	87.2	85.5	99.8
SB-A2401	88.2	85.7	88.2	86.7	86.1	84.7	85.5	88.0	87.0	87.2	85.5	99.8
USP-02	95.2	94.5	94.8	92.6	92.6	93.8	96.5	94.9	94.3	94.4	93.7	86.4
USP-05	94.4	91.2	94.7	91.1	89.8	90.5	90.7	94.5	94.7	94.4	94.6	86.1
USP-10	94.7	93.7	94.3	92.2	91.9	92.9	95.4	94.0	93.3	93.4	92.5	86.2
USP-68	98.5	92.9	98.3	92.5	92.6	92.8	93.5	98.0	97.8	97.9	97.5	88.1
USP-72	97.6	92.8	99.2	92.0	91.7	92.5	92.8	98.9	98.8	98.8	98.2	87.8
H120	73.3	72.9	74.3	73.3	73.4	73.3	72.3	73.3	72.1	72.8	71.2	72.0
4/91	72.1	71.7	72.9	72.3	71.9	72.8	72.8	72.1	71.5	71.7	70.2	71.7
D274	79.2	79.6	79.7	80.2	80.7	79.2	79.1	80.1	80.2	80.4	81.3	75.8
M41	73.3	72.9	73.4	73.8	73.8	73.3	72.7	73.6	72.5	73.2	71.4	72.7
QX	70.1	71.0	70.7	70.1	71.2	70.8	71.2	70.8	71.7	71.7	69.5	69.7

The prevention of IB is performed with the use of inactivated vaccines or, more frequently, attenuated live vaccines. Flock immunization is carried out using only vaccines from the Mass serotype in Brazil. However, there is a low identity among the S1 of Mass and the variant strains already identified in Brazil (7). Further, evidence suggests that vaccination with the Mass serotype provide inadequate protection against the variant strains that circulate in the region (10).

This study analyzed the nucleotide (nt) and the corresponding amino acid sequences of an IBV S1 gene variable region of samples obtained from different chicken flocks in the main poultry-producing regions from Brazil in recent years (2010 and 2011). The results were compared with IBV sequences of vaccine strains and field samples obtained from genetic databases of studies performed in South America and other continents.

## MATERIALS AND METHODS

**Field samples and vaccines.** In the period from May 2010 to June 2011, samples of chicken tissues and organs (tracheas, lungs, kidneys, and caecal tonsils) were obtained from 60 different farms of the main poultry-producing regions of Brazil (Table 1). All these field samples were from broiler, breeder, and layer flocks with IB clinical signs and positive for IBV by nested reverse transcription- (RT-) PCR. In addition, the following five vaccines were provided by the suppliers: New LS Mass I<sup>®</sup> (Fort Dodge Saúde Animal Ltda, Campinas, SP, Brazil); CEVAC<sup>®</sup> NB L (Ceva Saúde Animal Ltda, Paulínia, SP, Brazil); Bio Bronk Vet<sup>®</sup> H-120 Laboratório Biovet, Vargem-Grande Paulista, SP, Brazil); and BIORAL<sup>®</sup> H-120 (Merial Saúde Animal Ltda, Campinas, SP, Brazil); Nobilis<sup>®</sup> IB Ma5 (MSD Saúde Animal, São Paulo, SP, Brazil).

**RNA extraction.** The total RNA of the clinical samples and viral vaccines was purified by a standard silica/guanidine isothiocyanate- (GuSCN-) based procedure (3) using a commercial kit (Newgene, Simbios Biotecnologia, Cachoeirinha, Rio Grande do Sul, Brazil). Briefly, all swab samples were

resuspended on 2.5 mL of lysis buffer (GuSCN 5 M, Tris-HCl 0.1 M, EDTA 0.5 M, and Triton X-100) and incubated at 60 C for 10 min. Afterwards, 500 µl was transferred to a new tube, and 20 µl of silica suspension was added and mixed. Tubes were centrifuged at 8609 × *g* for 30 sec. The pellet was washed once with 500 µl and once with 150 µl of the washing buffer (GuSCN 5 M and Tris-HCl 0.1 M), twice with 150 µl of 75% ethanol and once with 150 µl of absolute ethanol. Silica suspension was dried at 60 C for 15 min. RNA was eluted with 50 µl of Tris-ethylenediaminetetraacetic acid buffer and incubated at 60 C for 5 min, and the solution was separated of the silica particles, centrifuging at 8609 × *g* for 3 min.

**Nested RT-PCR.** Amplification was performed in two consecutive reactions. In the first one, the RT-PCR was carried out in a total volume of 25 µl, using 2 µl of RNA template, 16 µl of H<sub>2</sub>O, 0.6 µl of dithiothreitol (0.1 M), 0.7 µl of deoxynucleotide triphosphate (2.1 mM of deoxyadenosine triphosphate, deoxythymidine triphosphate, deoxycytidine triphosphate, and deoxyguanosine triphosphate), 0.2 µl of the each primer (50 µM) S15 (14) and CK2 (13), 0.1 µl of RNAGuard 40 U/µl (GE Healthcare, Fairfield, CT), 0.1 µl of Moloney Murine Leukemia Virus reverse transcriptase 200 U/µl (Promega, Madison, WI), 0.2 µl of Taq DNA polymerase (5 U/µl) and 5 µl of a 5× concentrate RT and Taq DNA polymerase buffer (Cenbiot Enzimas, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil). Amplification was performed in a Veriti 96 Thermo Cycler (Applied Biosystems Inc., Norwalk, CT) with the following conditions: one cycle at 37 C for 30 min and 35 cycles at 94 C for 20 sec, 50 C for 40 sec, and 72 C for 1 min. The second PCR (nested) was carried out in a volume of 50 µl using 2 µl of amplified DNA, 39.1 µl of H<sub>2</sub>O treated, 1.5 µl of MgCl<sub>2</sub> (50 mM), 1.5 µl of deoxyribonucleotide triphosphate (2.1 mM), 0.2 µl of each primer (50 µM) IBVS1-1F (5'-TTR TTR RTW AGA GAT GTT GG-3') and IBVS1-3R (5'-GCT TTR AAR TRA ACA CCT GC-3'), 0.2 µl of Taq DNA polymerase (5 U/µl) and 5 µl of a 10× concentrate Taq DNA polymerase buffer (Cenbiot Enzimas). The primers for the second amplification were newly designed for the study. Thermal cycling was performed in the same equipment with the following steps: one cycle at 94 C for 3 min, 35 cycles at 94 C for 20 sec, 55 C for 40 sec and 72 C for 1 min, and a final

Table 2. Extended.

Percent amino acid similarity												
SB-A2960	SB-A2398	SB-A2401	USP-02	USP-05	USP-10	USP-68	USP-72	H120	4/91	D274	M41	QX
89.4	89.4	89.4	94.2	92.6	93.1	96.6	95.5	71.4	71.7	79.2	70.3	67.9
84.7	84.7	84.7	91.0	88.9	88.4	89.4	88.7	70.3	70.7	78.1	68.1	67.9
88.8	88.8	88.8	93.6	92.5	92.0	96.6	97.7	71.4	72.0	80.1	69.2	68.7
87.2	87.2	87.2	91.0	89.9	88.8	90.4	89.2	71.3	73.2	79.1	70.2	68.3
84.7	84.7	84.7	89.9	87.8	88.9	88.8	87.0	70.3	71.2	78.1	68.7	67.9
84.7	84.7	84.7	92.1	89.9	89.9	91.6	91.0	69.8	71.7	78.7	68.7	69.6
86.8	86.8	86.8	94.2	90.5	92.1	92.7	92.1	70.9	73.4	79.8	69.8	69.0
87.8	87.8	87.8	94.2	92.1	92.1	97.2	97.7	70.3	70.7	80.3	69.2	69.0
86.4	86.4	86.4	93.5	91.7	91.1	97.0	97.6	69.8	70.1	80.4	68.5	70.1
86.6	86.6	86.6	93.6	91.3	91.3	97.1	97.7	70.3	70.1	80.1	69.1	70.1
84.4	84.4	84.4	91.8	91.2	89.1	95.2	95.2	66.4	69.0	79.4	65.0	67.6
98.9	98.9	99.5	88.4	86.2	87.8	87.7	87.0	68.7	68.5	74.9	68.1	66.3
—	98.9	99.5	88.9	86.8	88.4	88.3	87.6	68.7	69.0	75.4	69.2	66.3
99.6	—	99.5	88.9	86.8	88.4	88.3	87.6	69.2	68.5	75.4	68.7	66.3
99.8	99.8	—	88.9	86.8	88.4	88.3	87.6	69.2	69.0	75.4	68.7	66.3
86.6	86.6	86.6	—	92.1	95.8	94.4	92.7	71.4	72.3	79.8	69.8	69.0
86.2	86.2	86.2	92.8	—	89.4	92.2	92.1	69.8	70.1	77.0	68.7	68.5
86.4	86.4	86.4	98.4	92.3	—	92.2	90.4	71.4	72.3	78.7	69.8	68.5
88.3	88.3	88.3	95.2	94.8	94.3	—	97.7	70.3	72.4	80.3	70.3	70.1
87.9	87.9	87.9	94.4	94.9	93.4	98.7	—	71.2	70.9	79.5	71.2	69.2
72.2	72.2	72.2	72.7	72.7	72.5	72.8	72.9	—	67.6	68.7	93.4	73.1
71.7	71.7	71.9	72.6	72.3	72.6	72.1	72.1	74.0	—	71.8	66.5	69.6
76.0	76.0	76.0	79.2	78.5	79.2	79.7	79.1	75.1	73.8	—	67.0	70.7
72.9	72.9	72.9	72.9	72.7	72.7	73.6	73.7	96.3	74.2	74.6	—	73.1
69.6	69.6	69.6	71.0	71.2	70.8	71.6	70.9	75.6	74.5	74.3	75.5	—

Percent nucleotide similarity												
-------------------------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

extension cycle at 72 C for 5 min. Nested RT-PCR amplified 590-bp products corresponding to the IBV S1 region. The PCR products were run on polyacrylamide gel electrophoresis and stained with silver nitrate.

**Sequencing and analysis.** The amplified PCR products were sequenced using sense and antisense PCR primers with Sequencer ABI 130 3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems Inc.). The nt sequences from both strands were edited, assembled, and analyzed using the Clustal W method available in the Bioedit software package (version 7.0.3.0. available at: <http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit>). All the Brazilian and reference nt sequences were compared using the neighbor-joining method with 1000 bootstrapping replicates for phylogenetic analysis and presence of insertions and deletions (MEGA software version 5.0; available at: <http://www.megasoftware.net/>). Amino acid sequences were also aligned using Clustal W method and compared for similarity analysis. These sequences were further evaluated using both the NetNGlyc (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>) and NetOGlyc (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetOGlyc/>) servers, searching for any glycosylation modification derived by the insertion or loss of amino acids.

Nt and amino acid sequences of reference and South American strains used in the analysis were retrieved from GenBank database. The sequences were 4/91 (AF093794), Ark99 (L10384), AR03BA06 (FJ167386), AR06BA13 (FJ167376), AR06BA14 (FJ167375), Beaudette (X02342), Conn (EU283057), D274 (X15832), DE072 (EU359658), Florida 18288 (AF027512), GA-2787-98 (AF274438), Gray (L18989), H120 (M21970), Holte (L18988), Italy-02 (AJ457137), JMK (L14070), K43 New Zealand (AF151958), M41 (AY851295), QX (AF193423), RF.01.99 (AJ440783), Spain-99-316 (DQ064809), USP-02 (DQ448273), USP-05 (DQ492308), USP-10 (DQ448275), USP-58 (GU383095), USP-68 (GU383105), USP-72 (GU383109), Unicamp830 (HM561897), and Vic (DQ490221).

## RESULTS

**IBV screening and partial amplification of S1 gene.** The 60 field samples resulted in 51 positive for IBV S1 nested RT-PCR,

displaying the expected amplified fragment of approximately 590 bp. The five vaccine strains also presented an amplified fragment with approximately the same length. The 51 amplification products were sequenced and gave rise to 49 sequences with good quality. The nt and amino acid sequences data are available in GenBank (Table 1).

**Analysis of the nt sequences.** IBV S1 sequences obtained in the present study were compared with reference and variant strain sequences from different regions of the world retrieved from GenBank. The similarity between S1 gene fragments ranging from 438 to 569 bases in length was evaluated (Table 2), and a phylogenetic tree was constructed (Fig. 1). In general, the Brazilian field samples and vaccine strains sequenced in the present study clustered in two groups/branches: 1) the five vaccine and 11 field samples that clustered with Mass serotype reference strains (Beaudette, M41 and H120); 2) the other 38 field samples that clustered with several local variant strains previously characterized in studies performed in Brazil and Argentina (7,12,16,18).

The first group (identified as Mass genotype) showed nt identities, ranging from 96.3% to 100% among themselves and reference strains M41 and H120 (data not shown). Sequences of the other cluster presented a higher diversity, varying from 84.5% to 100% of identity. The lowest sequence identity was shared by samples IBV/BRAZIL/2010/SB-1994 and IBV/BRAZIL/2010/SB-A2962, while the highest one was found between three samples (IBV/BRAZIL/2010/SB-5293, IBV/BRAZIL/2010/SB-5528, and IBV/BRAZIL/2010/SB-5530; Table 2). However, they are well separated in two genotypic clusters in the phylogenetic tree: one with 34 samples similar to the previously described BR-I genotype (7) and the other with four samples with similarity to the previously characterized variant IBV/BRAZIL/2008/UNICAMP830 (12).

Among the 34 samples from the BR-I genotype, 29 performed a specific and homogenous group in the phylogenetic tree with a high nt sequence identity among themselves (95.4%–100%) and to the



```

SB-A2398 VVFVTHCFKHGSTECPLTGLIPSGHIRIAAMKNTGPSDLFYNL
SB-A2401 VVFVTHCFKHGSTECPLTGLIPSGHIRIAAMKNTGPSDLFYNL
SB-1974 VVFVTHCYKRGAIECPLTGLIPQNHIRISVMKKGNTGPSGLFYNL
SB-1994 VVFVTHCYKSGSGECPLTGLIPQNHIRISAMKIGNTGPSGLFYNL
SB-4570 VVFVTHCYKSGSGECPLTGLIPQNHIRISAMKTGNTGPSGLFYNS
SB-5808 VVFVTHCYKSGSTACPLTGLIPQNHIRISAMKQGNNGPSGLFYNL
SB-5293 VVFVTHCYKSGSTACPLTGLIPQNHIRISAMKQGNNGPSGLFYNL
SB-A1971 VVFVTHCYKSGSECPLTGLIPQNHIRISAMKGGNTGPSGLFYNL
USP-02 VVFVTHCYKSGSTECPLTGLIPQNHIRISAMKPGNTGPSGLFYNL
USP-10 VVFVTHCFKRGNECPLTGFITQNHIRISAMKQGNTPSGLFYNL
4-91 TVFVTHCFKSSQGSCPLTGMIPQNHIRISAMRSG-----FLFYNL
D274 VVFVTHCYKSSHGSCPLTGLIPQNHIRISAMKNS-----SLFYNL
QX TVFVTHCYSSGSGSCPITGMIPRDHIRISAMKNG-----SLFYNL
H120 TVFVTHCYKHVG--CPITGMLQQHSIRVSAMKNG-----QLFYNL
M41 TVFVTHCYKYDG--CPITGMLQKNFLRVSAMKNG-----QLFYNL

```

Fig. 2. Alignment of the amino acid partial sequence of the S1 gene (amino acid 108–145, reference strain H120) showing the amino acid insertions (in bold).

previously characterized Brazilian IBV samples of the BR-I genotype (IBV/BRAZIL/2005/USP-02, IBV/BRAZIL/2005/USP-05, IBV/BRAZIL/2005/USP-10, IBV/BRAZIL/2009/USP-68, and IBV/BRAZIL/2009/USP-72). The great majority of the IBV variants from this group clustered in a specific branch with IBV/BRAZIL/2009/USP-72, a sample isolated from a poultry flock of the Paraná state (Brazilian southern region) in 2009 (7). The other five samples did not cluster to any other previously identified IBV variant, but three of them (IBV/BRAZIL/2010/SB-1974, IBV/BRAZIL/2010/SB-A0451, and IBV/BRAZIL/2010/SB-A1971) grouped together and presented a high nt similarity (93.5%–95.8%). These last samples and IBV/BRAZIL/2010/SB-1994 were identified in flocks from the northeastern region (Alagoas and Bahia states) and presented similarity with IBV variants previously characterized in Argentina (16).

The remaining four samples (IBV/BRAZIL/2010/SB-A2398, IBV/BRAZIL/2010/SB-A2401, IBV/BRAZIL/2010/SB-A2960, and IBV/BRAZIL/2010/SB-A2962) clustered together. All of these four samples were identified in flocks from the midwestern region (Mato Grosso State) and presented a very high identity (99.6%–99.8%). Further, these samples presented less than 89% of nt identity with all other sequences, including the other Brazilian variant sequences characterized here and in previous studies, with the exception of one IBV sample identified as IBV/BRAZIL/2008/UNICAMP830 collected in the southeastern region in 2008 (12). This sequence presented (91.3%) of nt similarity with these four samples and consequently was more closely related with this group in the phylogenetic tree. The IBV variants that grouped within this genotypic cluster (the four samples of the midwestern region and IBV/BRAZIL/2008/UNICAMP830) were referred to as the Brazil-II (BR-II) genotype (Fig. 1).

A phylogenetic tree constructed using only the nt sequences of the hypervariable region 1/2 (HVR1/2 [15]) showed a similar topology (data not shown). Sequences were also analyzed for nt insertions or deletions in the S1 gene. All Brazilian IBV variants presented 21 additional nt when compared with Mass reference strains (H120, M41, and Beaudette), vaccine strains, and Brazilian IBVs of the Mass group. Two nt insertions were observed in the alignment and were located at positions 358–359 (6 nt) and 418–419 (15 nt) of H120 reference strain.

**Analysis of the amino acid sequences.** The similarities among the partial S1 amino acid sequences (corresponding to the 4th to 186th residues of the H120 strain) were also evaluated. A high similarity within all the Brazilian Mass field samples was observed (95.1%–100%). On the other hand, variant strains presented a higher S1 amino acid diversity than IBVs of the Mass group (84.1%–100%

similarity), with the lowest sequence identity observed between samples IBV/BRAZIL/2010/SB-1974, IBV/BRAZIL/2010/SB-1994, IBV/BRAZIL/2010/SB-A0451, and IBV/BRAZIL/2010/SB-A2962 (Table 2). An amino acid similarity of 85% to 100% was observed among the 34 samples of the first Brazilian “variant” group, while a high similarity (98.9%–99.5%) was observed among the four samples of the second group. In the comparison between samples of the two groups, a maximum of 89.4% of amino acid identity was observed (Table 2). All Brazilian variants were also compared with H120 and M41 reference sequences, and similarity values ranged from 65% (IBV/BRAZIL/2010/SB-5679) to 71.4% (IBV/BRAZIL/2011/SB-A0473; Table 2).

As expected, a higher amino acid sequence diversity was observed in the HVR1/2 in the comparison among all samples of the two Brazilian genotypes BR-I and BR-II (75.5% to 100% of identity), with the lowest similarity observed between samples IBV/BRAZIL/2010/SB-1974 and IBV/BRAZIL/2010/SB-A2962 (data not show). An amino acid homology of 80.9% to 100% was observed among the 34 samples of the first Brazilian “variant” group, while a high similarity (97.9%–98.9%) was observed among the four samples of the second group. All Brazilian variants were also compared with Mass serotype vaccine strain H120 sequences, and similarity values ranged from 56.8% to 63.2% in this variable region (data not shown).

In the nt sequence alignments, specific substitutions and fragments insertions were observed. Specific one nt substitutions generated eight specific amino acid residues changes in all sequences of the group BR-II when compared with BR-I sequences: T66R, Y115F, Q130S, N131G, Q140N, G141N, N142G, and G147D. Interestingly IBV/BRAZIL/2008/UNICAMP830 is similar to BR-II in seven of these positions (exception to 140: Q140T), but we could not evaluate the first 60 amino acid residues (IBV/BRAZIL/2008/UNICAMP830 available sequence is shorter). Furthermore, two nt fragments insertions allowed the introduction of a variable amino acid insertion of two residues for the first position and another more conserved motif of five amino acid residues (NTGPS) for the second position in all Brazilian variants in comparison to Mass strains. The second insertion was found in the final of the HVR1/2 of the S1 protein (15) and the last three amino acids (glycine, proline, and serine) were conserved in all Brazilian IBV variants analyzed in the present and previous studies (Fig. 2) (12,16,18). These insertions did not change the predicted glycosylation pattern (evaluated with NetNGlyc and NetOGlyc servers).

## DISCUSSION

IBV is present in the majority of the regions where poultry is reared and spreads fast in nonprotected birds. The high frequency of genetic mutations and recombination events contribute to the emergence of new strains and serotypes of the virus. Some of these IBVs remain confined in one region, while others have a worldwide distribution (8).

Few IBV strains (as, for example, Mass, 4/91, and, more recently, QX) appear to have spread to different regions of the world. Among these strains, here we describe 11 flocks with the Mass genotype in different states of Brazil in the years 2010 and 2011. Mass strains have been detected in commercial poultry flocks since 1957 in Brazil (17). The intensive use of live vaccines with Mass strains (the only vaccine serotype allowed in Brazil) has probably spread this specific serotype in all poultry-producing regions of the country. It is possible that the isolates clustered in the Mass genotype were from vaccine origin; however, it was not possible to determine if these

specific flocks were previously vaccinated, although the use of live attenuated vaccines is a frequent procedure in poultry commercial flocks and the Mass serotype strains H120 and H52 are indeed widely used as vaccine viruses in Brazil. On the other hand, we did not find samples that grouped with strains from other regions of the world, including the ones present in different continents (as, for example, 4/91 and QX). Previous studies showed the rare occurrence of IBV strains from Conn and 4/91 groups in the Brazilian southeastern region (12,19). One explanation for these findings could be the use of imported live vaccines with these strains, as previously proposed (12).

Despite the large use of live vaccines with Mass strains, here we describe the predominance of a specific group of Brazilian IBV variants. These IBV variants are significantly different from the Mass strains, presenting a low nt and amino acid similarity. Previous studies have already shown that the majority of the variant strains found in Brazil clustered in the phylogenetic analysis, using partial characterization of the N (1) or the S genes (12,18). Two recent studies demonstrated that these variant viruses were present in different states of the country over a 7-yr period (2003 to 2009) and were referred as Brazil (19) and BR-I genotype (7). The majority (89.5%) of the Brazilian IBV variants described in the present study clustered with the previously characterized BR-I genotype strains, showing that this genotype appears to have spread more than any other IBV variant in the last years predominating in the main poultry producing regions of the country (south and southeast). Furthermore, other Brazilian variant sequences previously characterized as D207 group (12) also clustered with these samples (data not shown). Inside this cluster, one subgroup of four strains is slightly divergent and includes IBV samples found in chicken flocks from the northeastern region that are similar to isolates from Argentina (16). In the midwestern region of the country, another group of four samples presented a more significant divergence from the previous IBV variants characterized in Brazil. This group was similar with only one IBV sample previously identified in Brazil (IBV/BRAZIL/2008/UNICAMP830), collected in the southeastern region in 2008 (12). As this group presented nt and amino acid diversity higher than 10% in comparison to samples of the BR-I genotype, we suggest the emergence of novel IBV variants and proposed they should be classified in a new genotype: BR-II. This new genotype appears to have the same origin of the BR-I, and the observed divergence is probably related to a regional dissemination of this genotype (the midwest is a growing and independent poultry-producing region). Further, these results showed a higher IBV diversity than previous studies, demonstrating that Brazilian variant genotypes are not as stable over time as previously described (7). A broader epidemiologic study should be conducted to understand the IBV spread in all Brazilian poultry-producing regions.

The majority of the IBV epidemiologic studies analyze the S1 gene because this is a highly variable genomic region, and the deduced amino acid sequence can be an important predictor of immune status in chickens (10,15). It was already demonstrated that 1) there is a strong correlation between the S1 sequence, mainly in HVR1/2, and protective relatedness values obtained in virus neutralization tests (15) and 2) Brazilian variant IBVs have more than 25% of divergence from Mass vaccine strains in the S1 amino acid sequence and, consequently, a low antigenic relationship by virus neutralization (7). In the present study, we confirmed this high divergence in the S1 amino acid sequence and observed eight specific substitutions between BR-I and BR-II sequences and, further, two characteristic nt insertions in all Brazilian variant IBVs. These insertions are responsible for seven additional amino acid residues in

the S1 polypeptide chain when compared with the Mass genotype. One of these insertions occurs in the final of the HVR1/2 and is conserved among all the Brazilian variant IBVs, with three common residues: glycine, proline, and serine. These insertions were also observed in some IBV variants from other regions of the world, but not in the classical Mass strains (data not shown). Although the specific location of the receptor-binding domain within S1 is not known for IBV and varies among other coronaviruses, monoclonal antibody analyses revealed that some of the amino acids from the virus-neutralizing epitopes are located within the HVR1/2 (15,20). This is very suggestive that these insertions are probably responsible for a different three-dimensional structure providing Brazilian variant IBVs with a selective advantage in chicken flocks vaccinated with heterologous serotypes such as Mass (5). Other possible effects of these insertions were further analyzed using heterologous recombination, but no N or O glycosylation sites or other common modifications could be found. The construction of a three-dimensional model was also not possible due the lack of appropriate templates. These results could explain a possible failure of Mass strains to control the dissemination of these Brazilian variant IBVs.

On the other hand, S1 glycoprotein is also an important epitope in adsorption to the cellular receptor and virus entry into the host cell. Amino acid divergences in the peptide chain were found in strains with different cell tropisms (4,5,20). The same modifications in the S1 three-dimensional structure could be affecting cell tropism of the Brazilian variant IBVs. Although there is evidence that the same genotype can be associated to different cell tropisms and could be related with multiple clinical conditions (7), new studies should be performed to define the specific location and importance of this region for the development of the disease.

In summary, this study confirms the high prevalence of one main IBV genotype (BR-I) in commercial poultry flocks from Brazil in recent years (2010 and 2011). However, we found a new group of variant IBV in Brazil (BR-II) in the midwestern region, a growing poultry-producing center. It was also demonstrated that all Brazilian IBV variants (BR-I and BR-II genotypes) presented specific nt and amino acid sequence insertions in the S1 gene in comparison to the Mass vaccine strains that could be associated with the occurrence of clinical disease in vaccinated flocks.

## REFERENCES

1. Abreu, J. T., M. M. Mourão, C. E. Santos, C. J. M. Veloso, J. S. Resende, R. B. Flatschart, A. V. Folgueras-Flatschart, S. N. Júnior, M. M. Santoro, A. C. R. Mendes, G. R. Franco, A. Silva, A. B. Campos, and S. Fernandez. Molecular studies of the Brazilian infectious bronchitis virus isolates. *Rev. Bras. Cienc. Avic.* 12:107–110. 2010.
2. Alvarado, I. R., P. Villegas, N. Mossos, and M. W. Jackwood. Molecular characterization of avian infectious bronchitis virus strains isolated in Colombia during 2003. *Avian Dis.* 49:494–499. 2005.
3. Boom, R., C. J. A. Sol, M. M. M. Salimans, C. L. Jansen, P. M. E. Wertheim-Van Dillen, and J. Van Der Noordaa. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *J. Clin. Microbiol.* 28:495–503. 1990.
4. Casais, R., B. Dove, D. Cavanagh, and P. Britton. Recombinant avian infectious bronchitis virus expressing a heterologous spike gene demonstrates that the spike protein is a determinant of cell tropism. *J. Virol.* 77:9084–9089. 2003.
5. Cavanagh, D. Coronavirus avian infectious bronchitis virus. *Vet. Res.* 38:281–297. 2007.
6. Cavanagh, D., and J. Gelb Jr. Infectious bronchitis. In: *Diseases of poultry*, 12th ed. Y. M. Saif, A. M. Fadly, J. R. Glisson, L. R. McDougald, L. K. Nolan, and D. E. Swayne, eds. Iowa State University Press, Ames, IA. pp. 117–135. 2008.

7. Chacón, J. L., J. N. Rodrigues, M. S. Assayag Júnior, C. Peloso, A. C. Pedroso, and A. J. P. Ferreira. Epidemiological survey and molecular characterization of avian infectious bronchitis virus in Brazil between 2003 and 2009. *Avian Pathol.* 40:153–162. 2011.
8. Cook, J. K. A., M. Jackwood, and R. C. Jones. The long view: 40 years of infectious bronchitis research. *Avian Pathol.* 41:239–250. 2012.
9. De Wit, J. J., J. K. A. Cook, and H. M. J. Van Der Heijden. Infectious bronchitis virus variants: a review of the history, current situation and control measures. *Avian Pathol.* 40:223–235. 2011.
10. De Wit, J. J., W. A. J. M. Swart, and T. H. F. Fabri. Efficacy of infectious bronchitis virus vaccinations in the field: association between the  $\alpha$ -IBV IgM response, protection and vaccine application parameters. *Avian Pathol.* 39:123–131. 2010.
11. Di Fábio, J., and L. Y. B. Buitrago. Bronquite infecciosa das galinhas. In: *Doenças das aves*, 2nd ed. A. Berchieri Jr, E. N. Silva, J. Di Fábio, L. Sesti, and M. A. F. Zuanaze, eds. Facta, Campinas, Brasil. pp. 631–648. 2009.
12. Felipe, P. A. N., L. H. A. Silva, M. M. A. B. Santos, F. R. Spilki, and C. W. Arns. Genetic diversity of avian infectious bronchitis virus isolated from domestic chicken flocks and coronaviruses from feral pigeons in Brazil between 2003 and 2009. *Avian Dis.* 54:1191–1196. 2010.
13. Keeler, C. L. J., K. L. Reed, W. A. Nix, and J. J. Gelb. Serotype identification of avian infectious bronchitis virus by RT-PCR of the peplomer (S-1) gene. *Avian Dis.* 42:275–284. 1998.
14. Kwon, H. M., M. W. Jackwood, and J. J. Gelb. Differentiation of infectious bronchitis virus serotypes using polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism analysis. *Avian Dis.* 37:194–202. 1993.
15. Ladman, B. S., A. B. Loupos, and J. Gelb Jr. Infectious bronchitis virus S1 gene sequence comparison is a better predictor of challenge of immunity in chickens than serotyping by virus neutralization. *Avian Pathol.* 35:127–133. 2006.
16. Rimondi, A., M. I. Craig, A. Vagnozzi, G. König, M. Delamer, and A. Pereda. Molecular characterization of avian infectious bronchitis virus strain from outbreaks in Argentina (2001–2008). *Avian Pathol.* 38:149–153. 2009.
17. Silva, E. N. Infectious bronchitis in Brazilian chickens: current data and observations of field service personnel. *Rev. Bras. Cienc. Avic.* 12:197–203. 2010.
18. Villarreal, L. Y. B., P. E. Brandão, J. L. Chacón, A. B. S. Saldenberg, M. S. Assayag, R. C. Jones, and A. J. P. Ferreira. Molecular characterization of infectious bronchitis virus strains isolated from the enteric contents of Brazilian laying hens and broilers. *Avian Dis.* 51:974–978. 2007.
19. Villarreal, L. Y. B., T. L. Sandri, S. P. Souza, L. J. Richtzenhain, J. J. De Wit, and P. E. Brandão. Molecular epidemiology of avian infectious bronchitis in Brazil from 2007 to 2008 in breeders, broilers, and layers. *Avian Dis.* 54:894–898. 2010.
20. Weiss, S. R., and S. Navas-Martín. Coronavirus pathogenesis and the emerging pathogen severe acute respiratory syndrome coronavirus. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 69:635–664. 2005.

#### ACKNOWLEDGMENTS

We would like to thank Laboratório Biovet, Pfizer Animal Health, Ceva Animal Health, and Merial (Brazil) for providing the vaccine strains; the veterinarians and farmers who submitted clinical samples; the technicians of Simbios Biotecnologia and Laboratório de Diagnóstico Molecular (ULBRA) who performed technical support. This work was supported by Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS), Grant No. 11/1203-1, and Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP), Grant No. 01.09.0240.00. FRS and CWC are fellows of the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq).



## 5.2 Artigo 2

### **Infectious bronchitis virus in different avian physiological systems – a field study in Brazilian poultry\***

\*Artigo submetido e aceito para publicação, sob a forma de artigo completo, ao periódico *Poultry Science*.

## Infectious bronchitis virus in different avian physiological systems— A field study in Brazilian poultry flocks

Eder Balestrin,\* Aline P. Fraga,\* Nilo Ikuta,\*† Cláudio W. Canal,‡ André S. K. Fonseca,†  
and Vagner R. Lunge\*†<sup>1</sup>

\*Laboratório de Diagnóstico Molecular, Universidade Luterana do Brasil (ULBRA), Av. Farroupilha, 8001, Prédio 22, Sala 312, Bairro São José, CEP 92425-900, Canoas, RS, Brazil; †Simbios Biotecnologia, Rua Cai, 541, Vila Princesa Izabel, CEP 94940-030, Cachoeirinha, RS, Brazil; and ‡Laboratório de Virologia, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Av. Bento Gonçalves 9090, Bairro Agronomia, CEP 90540-000, Porto Alegre, RS, Brazil

**ABSTRACT** Avian infectious bronchitis is a highly contagious viral disease with economic effects on poultry agribusiness. The disease presents multi-systemic clinical signs (respiratory, renal, enteric, and reproductive) and is caused by one coronavirus (infectious bronchitis virus, IBV). Infectious bronchitis virus is classified into different serotypes and genotypes (vaccine strains and field variants). This study aimed to evaluate the occurrence of IBV in commercial poultry flocks from 3 important producing regions in Brazil and to determine the tropism of the main circulating genotypes to 3 different avian physiological systems (respiratory, digestive, urinary/reproductive). Clinical samples with suggestive signs of IBV infection were collected from 432 different poultry commercial flocks (198 from broilers and 234 from breeders). The total number of biological samples consisted of organ pools from the 3 above physiological systems obtained of farms from 3 important producing regions: midwest, northeast, and south. Infectious

bronchitis virus was detected by reverse-transcription, real-time PCR of the 5' untranslated region. The results showed 179 IBV-positive flocks (41.4% of the flocks), with 107 (24.8%) from broilers and 72 (16.8%) from breeders. There were similar frequencies of IBV-positive flocks in farms from different regions of the country, most often in broilers (average 54%) compared with breeders (average 30.8%). reverse-transcription was more frequently detected in the digestive system of breeders (40%), and in the digestive (43.5%) and respiratory (37.7%) systems of broilers. Infectious bronchitis virus genotyping was performed by a reverse-transcription nested PCR and sequencing of the S1 gene from a selection of 79 IBV-positive flocks (45 from broilers and 34 from breeders). The majority of the flocks were infected with Brazilian variant genotype than with Massachusetts vaccine genotype. These results demonstrate the predominance of the Brazilian variant (mainly in the enteric tract) in commercial poultry flocks from 3 important producing regions in Brazil.

**Key words:** infectious bronchitis virus, poultry, avian, genotype, Brazil

TBC Poultry Science TBC:1–8

<http://dx.doi.org/10.3382/ps.2014-03875>

## INTRODUCTION

Infectious bronchitis is a highly contagious viral disease that may be associated with multi-systemic clinical signs (respiratory, renal, enteric, and reproductive) and reduced production in poultry commercial flocks. Besides these, airsacculitis due to co-infection with *Mycoplasma* or *Escherichia coli* is responsible for the condemnation of a large number of carcasses in slaughterhouses, generating great economic impact on

the poultry industry (Cavanagh and Gelb, 2008). Infectious bronchitis virus (IBV) is a member of the *Coronaviridae* family and has a single-strand positive sense RNA genome with approximately 27 kb. The IBV has 4 structural proteins: nucleocapsid, membrane, envelope, and spike (S), and this last protein is cleaved in the S1 and S2 subunits after translation (Cavanagh, 2007). The S gene is highly polymorphic and is the main responsible for the antigenic variation of the virus (Jackwood et al., 2012).

Infectious bronchitis virus has tropism for several avian cell types and presents different clinical signs and pathogenic forms according to the affected tissue (Di Fábio and Buitrago, 2009; Fan et al., 2012). Initial IBV replication occurs in the respiratory tract, usually in

©TBC Poultry Science Association Inc.

Received January 4, 2014.

Accepted April 14, 2014.

<sup>1</sup>Corresponding author: [vagner.lunge@gmail.com](mailto:vagner.lunge@gmail.com)

epithelial cells of trachea (eventually also in nasal turbinates, lungs, and air sacs) and the main clinical signs are of a cold. Afterward, the virus replicates in other parts of the body, as the oviduct of the female reproductive tract, urinary system (renal tubular epithelial cells), and several organs of the digestive tract (esophagus, proventriculus, duodenum, jejunum, cloacal bursa, cecal tonsils, rectum, and cloaca). According to the system involved, chickens can present since few pathobiological clinical effect until more evident clinical signs as false layers or decreased egg production (reproductive), nephritis (urinary), enteric disorders (digestive[**AU1: Clarify meaning of sentence.**]). All these different pathogenic forms have been reported in different poultry producing regions of the world, including Brazil (Cavanagh, 2007; Villarreal et al., 2007; Cavanagh and Gelb, 2008; Di Fábio and Buitrago, 2009; Cook et al., 2012).

Confirmation of the IBV infection must be carried out by laboratory testing. Classical methodology includes virus isolation in embryonated SPF eggs and subsequent identification by serum neutralization. The whole process is lengthy and laborious because field isolates usually require more passages to cultivate the virus in embryonated eggs (De Wit, 2000; Cavanagh and Gelb, 2008). Molecular techniques, such as reverse transcription (**RT**) followed by PCR, do not require prior isolation and therefore have been widely used for detection and genotyping the virus directly from clinical samples (Cavanagh and Gelb, 2008). The main clinical specimen for this analysis is traditionally the trachea, considered the first replication site in the beginning of the infection. However, the cloaca and cecal tonsils are also recommended because IBV can replicate in the digestive tract in later stages of the infection (De Wit, 2000; Cavanagh and Gelb, 2008).

Infectious bronchitis virus control is usually performed with the use of live attenuated or inactivated vaccines (or both) in commercial poultry flocks. In Brazil, only Massachusetts (**Mass**) derived strains are allowed in commercial vaccine production by the Ministry of Agriculture, Livestock and Food Supply (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento). However, this approach may not be effective when the field strains are different from the vaccine (Cavanagh, 2007). Further, new serotypes/genotypes (antigenic variants) are continuously emerging in the field due to genetic events (recombination or point mutations) within field and vaccine strains (Jackwood et al., 2012).

The first IBV isolate in Brazil was from the Mass serotype (Hipólito, 1957). Three decades later, IBV isolates of at least 5 different antigenic types were found in commercial chickens throughout Brazil (Di Fábio et al., 2000). More recent molecular epidemiological studies revealed the predominance of local field variants (identified as **BR** genotypes) in the majority of the important poultry-producing regions in Brazil (Villarreal et al., 2007; Felipe et al., 2010; Villarreal et al., 2010; Chacón et al., 2011; Fraga et al., 2013). In this period,

an IBV strain similar to genotype 4/91 was also described in Southeastern Brazil (Villarreal et al., 2010). Despite these previous works, information about the frequency and distribution of IBV in geographic regions with an increase in poultry production (such as northeast and midwest) as well as the spread of the different genotypes in the physiological systems of the chickens is still scarce and not available, hindering the control and prevention of disease. This field study aimed to evaluate the occurrence of IBV in commercial poultry flocks from 3 important producing regions in Brazil and to determine the tropism of this virus (and the main circulating genotypes) to 3 different avian physiological systems (respiratory, digestive, urinary/reproductive) in commercial poultry flocks (broilers and breeders).

## MATERIALS AND METHODS

### *Clinical Samples*

Samples were collected from poultry flocks with clinical signs of infectious bronchitis (234 breeders and 198 broilers) in the period of January of 2010 to December of 2011. These flocks were from farms located in cities of 7 different states in the south (235 flocks), midwest (94 flocks), and northeast (103 flocks) regions from Brazil. The breeders age ranged from 1 to 90 wk (average = 20 wk) and broiler age ranged from 0.5 to 8.8 wk (average = 5.1 wk). All the samples were analyzed in pools (set of organs collected from 3 to 5 birds). Each pool contained organs from specific physiological systems: respiratory (lung, trachea, tracheal swabs), digestive (cecal tonsil and intestine), and urinary/reproductive (kidney, ovary, oviduct).

### *RNA Extraction*

Viral RNA extraction was performed with commercial kits NewGene (Preamp and Prep) according to the protocol of the supplier (Simbios Biotechnology, Cachoeirinha, RS, Brazil). Briefly, swabs and macerated organs from each pool were placed in 1 mL of lysis solution (Preamp) and incubated for 10 min at 60°C. After centrifugation for 1 min (8,609 × *g*), 0.5 mL was removed and added to a new tube containing 20 µL of silica suspension. The tube was again centrifuged for 1 min (8,609 × *g*[**AU2: Add temperature of centrifugation here and above.**]). The supernatant was discarded and the pellet washed successively with 150 µL of wash solutions A, B, and C (Prep). After the last wash, the silica was dried at 60°C and total RNA was eluted with 50 µL of elution buffer.

### *IBV Detection*

Infectious bronchitis virus was detected by reverse transcription followed by real-time TaqMan PCR (**RT-qPCR**) as previously described (Callison et al., 2006). All the amplification reactions were performed in a

StepOnePlus Real Time PCR System (Applied Biosystems, Norwalk, CT) under the following conditions: 1 cycle of 37°C for 30 min, followed by 40 cycles at 95°C for 15 s and 60°C for 1 min.

### **IBV Genotyping**

Some RT-qPCR-positive samples were randomly selected for IBV genotyping. The RNA from these samples was subjected to RT-nested-PCR amplification and sequencing of the S1 IBV gene as previously described (Fraga et al., 2013). Phylogenetic analysis was performed based on the nucleotide sequence, and the samples were classified in genotypes Mass and BR, the latter including the Brazilian variant genotypes BR-I and BR-II (Fraga et al., 2013).

### **Statistical Analysis**

Chi-squared test was used to compare the frequencies of IBV-positive flocks (and also the main genotypes) in the different geographic regions, age categories, and physiological systems. Poultry flocks were classified according to the geographic origin in 3 groups: midwest (centro-oeste), northeast (nordeste), and south (sul). They were also classified into 4 categories for age comparison analysis: young broilers (0 to 4.5 wk), old broilers (4.6 to 9.0 wk), young breeders (0 to 33 wk), and old breeders (33.1 to 66 wk). The clinical samples were finally divided in 3 groups according to the analyzed specimen: respiratory (lung, trachea, tracheal swabs), digestive (cecal tonsils and intestines), and urinary/reproductive (kidney, ovary, oviduct). Differences were considered significant when  $P < 0.05$ .

## **RESULTS**

### **IBV in Different Brazilian Regions**

In this study, 1,294 organ pools were analyzed with a total of 382 broiler pools (from 198 different flocks) and 912 breeder pools (from 234 flocks). Breeders were usually more sampled (average 3.9 samples / flock) than broilers (average 1.9 samples/flock). The flock was considered IBV positive when at least one pool of the different systems (respiratory, digestive, urinary/reproductive) presented a positive amplification result by RT-qPCR. A total of 179 flocks (41.4%) presented positive result for IBV, 107 (24.8%) from broilers and 72 (16.8%) from breeders. There was no significant difference in the IBV frequency in breeder ( $30.8 \pm 5.4\%$ ) and broiler ( $54\% \pm 8.4\%$ ) flocks from different geographical regions, but the higher IBV frequency in broiler than in breeder flocks was observed in the 3 geographic regions (Figure 1).

Infectious bronchitis virus from 79 randomly selected flocks (45 broilers and 34 breeders) was genotyped by performing S1 gene partial sequencing. Sequence analysis showed the occurrence of 3 genotypes, 23 samples

(29.1%) of the Mass vaccine, 52 samples (65.8%) of the field variant BR-I (Chacón et al., 2011; Fraga et al., 2013), and 4 samples (5.1%) of the field variant BR-II (Fraga et al., 2013). The 2 Brazilian genotypes (BR-I and BR-II) were grouped as BR variants for the subsequent analyses. Genotypes Mass and BR were detected in broiler and breeder flocks from the 3 regions. Mass genotype was identified in 20 broiler flocks and in 3 breeder flocks. The BR was more frequent and widespread than Mass genotype, being detected in 25 broiler and 31 breeder flocks. The proportion of Mass genotype in broilers was significantly higher than that observed in breeders ( $P < 0.05$ ).

### **IBV in Flocks with Different Ages**

Age information was available for 174 broiler and 227 breeder flocks (these data were missing in 24 broiler and 5 breeder flocks). Infectious bronchitis virus was detected in 101 (58%) broiler flocks, 36 (35.6%) between 0 and 4.5 wk (younger broilers) and 65 (64.4%) between 4.6 and 9.0 wk (older broilers). In breeders, 70 (30.8%) were IBV positive, 43 (61.4%) between 0 and 33 wk (younger breeders) and 27 (38.6%) between 33.1 and 66 wk of age (older breeders; difference not significant). In addition, age and genotype (Mass or BR) were available for 74 flocks (41 broilers and 33 breeders). In broilers, the Mass genotype was detected in 17 (41.5%) flocks, 15 (88.2%) younger broilers and 2 (11.8%) older broilers, whereas the BR genotype was detected in 24 (58.5%) flocks, 9 (37.5%) younger broilers and 15 (62.5%) older broilers ( $P < 0.05$ ). In breeders, the Mass genotype was detected in only 3 (9.1%) flocks, 2 (66.7%) younger breeders and 1 (33.3%) older breeder, and BR genotype in the remaining 30 (90.9%) flocks, 20 (66.7%) of younger breeders and 10 (33.3%) of older breeders (Table 1).

### **IBV in Different Avian Physiological Systems**

Broiler and breeder flocks were classified into 7 groups according to the availability of the IBV results from the different physiological systems: digestive, respiratory, and urinary/reproductive (these last 2 were grouped together; Table 2). The results from 73 flocks (59 broiler and 14 breeder flocks) could not be compared because the organs from different systems were mixed in a unique pool for the analysis. Available analysis results from the remaining flocks were mostly obtained from the respiratory system (131 broiler, 200 breeder), followed by the digestive (62 broiler, 82 breeder) and urinary/reproductive (37 broiler, 109 breeder) systems (Table 3).

Infectious bronchitis virus-positive samples were mostly found in samples of the digestive (59/144, 40.9%), followed by respiratory (82/331, 24.7%) and urinary/reproductive (24/146, 16.4%) systems, these

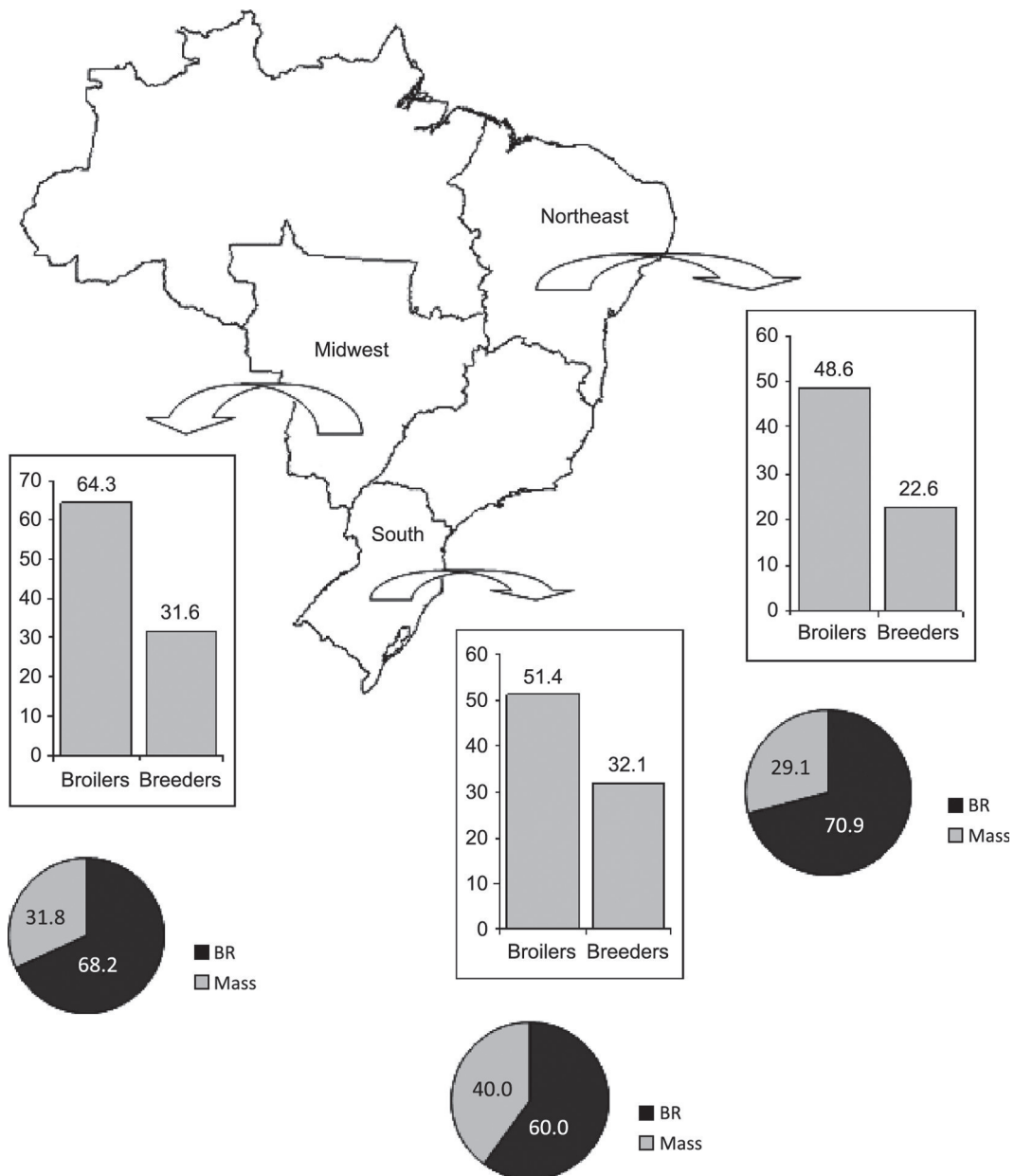
**Table 1.** Infectious bronchitis virus detection and genotyping in broiler and breeder flocks classified by age range

Item	Age range (wk)	Detection (flocks)		Genotyping (flocks)		
		Total	Positive (%)	Total	Mass (%)	BR (%)
Broilers	0.0 to 4.5	67	36 (35.6)	24	15 (62.5)	9 (37.5)
	4.6 to 9.0	107	65 (64.4)	17	2 (11.8)	15 (88.2) <sup>a</sup>
Breeders	0.0 to 33.0	124	43 (61.4)	22	2 (9.1)	20 (90.9)
	33.1 to 66.0	103	27 (38.6)	11	1 (9.1)	10 (90.9)

<sup>a</sup>Statistical difference of the proportion the Massachusetts (Mass)/Brazilian (BR) genotypes between “young” and “old” broilers ( $\chi^2$  test with  $P < 0.05$ ).

last 2 without a significant difference ( $P < 0.05$ ). In the separate analysis of broiler and breeder flocks results, this finding was confirmed only for breeders, because 32 of 82 (39%) were IBV positive in the digestive system,

in comparison with 33 of 200 (16.5%) in the respiratory and 18 of 109 (16.5%) in the urinary/reproductive systems ( $P < 0.05$ ). In broilers, the frequency of IBV detection was similar in the digestive (27 of 62, 43.5%)



**Figure 1.** Infectious bronchitis virus (IBV) detection and genotyping. Bar graphics demonstrate IBV frequency (%) in broilers and breeders flocks suspect to have infectious bronchitis from the 3 different Brazilian geographic regions. Pie charts demonstrate the genotype frequency in each region. BR = Brazilian; Mass = Massachusetts.



**Table 2.** Total number (and percentage) of the available samples for each physiological system in broiler and breeder flocks

Group	Digestive	Respiratory	Urinary/reproductive	Broiler flocks		Breeder flocks	
				Total	%	Total	%
1	NA <sup>1</sup>	+	NA	67	(48.2)	100	(45.5)
2	+	+	+	27	(19.4)	60	(27.3)
3	NA	+	+	8	(5.8)	31	(14.1)
4	NA	NA	+	2	(1.4)	9	(4.1)
5	+	NA	NA	7	(5.0)	8	(3.6)
6	+	+	NA	28	(20.1)	6	(2.7)
7	+	NA	+	0	(0.0)	6	(2.7)
Total				139	(100)	220	(100)

<sup>1</sup>Not available (samples of these systems were not collected).

and respiratory (49 of 131, 37.4%) systems, which were significantly higher than in samples of the urinary/reproductive systems (6 of 37, 16.2%;  $P < 0.05$ ; Table 3).

These results were confirmed in the comparative analysis of 87 flocks (27 broiler and 60 breeder), which had PCR results for the 3 organ groups (digestive, respiratory, and urinary/reproductive). In broilers, IBV was commonly detected in the samples of the digestive and respiratory tracts (9 out of 12, 75% for both groups), but rarely in samples of the urinary/reproductive systems (2 out of 12, 16.7%;  $P < 0.01$ ). In breeders, IBV was detected mainly in the samples of the digestive system (22 out of 26, 84.6%), whereas virus frequency detection was significantly lower in the samples of the respiratory (6 out of 26, 23.1%) and urinary/reproductive (11 out of 26, 42.3%) systems ( $P < 0.01$ ; Table 4).

Genotypes Mass and BR were found in the different physiological systems investigated. The BR genotypes were found in similar frequency in the 3 systems, whereas the Mass genotype was significantly more frequent in the respiratory system than in the 2 other systems ( $P < 0.01$ ; Table 5).

## DISCUSSION

In a total of 432 flocks (broilers and breeders) with suggestive signs of infectious bronchitis, IBV was detected in 41.4% of them in 3 important poultry-producing regions of Brazil. There was no difference in IBV frequency in these regions, even between the south, traditional poultry-producing zone, and the other 2 regions (midwest and northeast) that started commercial poultry production more recently. Other previous studies have also reported IBV prevalence in different

regions of the country, showing that infectious bronchitis is a disseminated disease in Brazilian poultry flocks (Villarreal et al., 2010; Chacón et al., 2011). The present study reinforces the high frequency of this disease in the country, even in the 2 more recent and growing producing regions. It was also further demonstrated that IBV is detected in a significantly higher proportion of broiler (average 54.8%) than in breeder flocks (28.8%), probably because the most rigorous biosafety programs submitted to [AU3: Clarify.] the breeders.

This study also observed the occurrence of local field variant genotypes (BR-I and-II) and Mass vaccine strains in Brazilian broiler and breeder commercial poultry flocks. The BR genotype was found in a higher frequency than Mass genotype in all the 3 regions. Further, BR genotype sequences had a higher identity with other Brazilian field variants previously described (Villarreal et al., 2007; Felipe et al., 2010; Chacón et al., 2011; Fraga et al., 2013). These data reaffirm the high prevalence of BR genotypes in Brazilian commercial poultry flocks in 2 recent years (2010 to 2011), a similar scenario for the period between 2003 and 2009 (Felipe et al., 2010; Villarreal et al., 2010; Chacón et al., 2011). An important new finding is the high frequency (90%) of BR genotypes in breeder flocks in all ages (Table 1).

On the other hand, the Mass genotype was found in a significant number of poultry flocks from the 3 geographic regions, mainly in broiler flocks. The samples identified as Mass displayed a high identity with Massachusetts reference sequences (H120, M41), demonstrating these flocks were probably infected with vaccine-derived strains. Although there was no information about the IBV immunization status of the flocks, the higher frequency of Mass genotype in young broiler

**Table 3.** Infectious bronchitis virus (IBV) detection in the different physiological systems

Physiological system	All flocks		Broiler flocks		Breeder flocks	
	Total	IBV+ <sup>1</sup> (%)	Total	IBV+ (%)	Total	IBV+ (%)
Digestive	144	59 (40.9) <sup>a</sup>	62	27 (43.5) <sup>a</sup>	82	32 (39) <sup>a</sup>
Respiratory	331	82 (24.7) <sup>b</sup>	131	49 (37.4) <sup>a</sup>	200	33 (16.5) <sup>b</sup>
Urinary/reproductive	146	24 (16.4) <sup>b</sup>	37	6 (16.2) <sup>b</sup>	109	18 (16.5) <sup>b</sup>

<sup>a,b</sup>Different letters indicate statistical significant differences in the IBV detection from the respective physiological systems by  $\chi^2$  test ( $P < 0.05$ ).

<sup>1</sup>IBV+ = IBV positive.

**Table 4.** Comparison among the results of the 3 physiological systems in broilers and breeders (the 3 systems were investigated in all these flocks)<sup>1</sup>

Item	Physiological system								
	Digestive			Respiratory			Urinary/reproductive		
	IBV+	IBV–	Total	IBV+	IBV–	Total	IBV+	IBV–	Total
Broiler flocks									
IBV+	9	3	12	9	3	12	2	10	12
IBV–	0	15	15	0	15	15	0	15	15
Total	9	18	27	9	18	27	2	25	27
Breeder flocks									
IBV+	22	4	26	6	20	26	11	15	26
IBV–	0	34	34	0	34	34	0	34	34
Total	22	38	60	6	54	60	11	49	60

<sup>1</sup>Flock status was defined with at least one infectious bronchitis virus positive (IBV+) result in any clinical sample. IBV– = IBV negative.

flocks is probably related to the use of commercial Mass vaccines (usually held in the hatchery in the first day of life; Cavanagh and Gelb, 2008; Maclachlan and Dubovi, 2011).

The comparative analysis of samples from different physiological systems demonstrated a higher frequency of IBV-positive samples (mostly BR genotype, but even Mass vaccine strains) in the digestive tract than in the other physiological systems. Coronaviruses support the harsh conditions of the gastrointestinal tract (Flint et al., 2000). Further IBV strains have tropism and grow in cells of the digestive system (esophagus, proventriculus, duodenum, jejunum, cloacal bursa, cecal tonsils, rectum, and cloaca) and may establish persistent infections in birds of different ages without any pathobiological clinical effect (Cavanagh, 2003). Different strains have been isolated from cecal tonsils, cloacal swabs, and feces, many of them persisting for long periods (Raj and Jones, 1997; Cook et al., 2012). Other studies have already shown that intensive virus replication occurs in the cecal tonsils, ileum, and rectum, but not in the duodenum or proventriculus (Raj and Jones, 1996; Dolz et al., 2012). These viruses are probably being excreted in the feces, where they can still remain for a long period and be a potential source of infection (Cavanagh and Gelb, 2008; Cook et al., 2012). This is a likely explanation for the IBV persistence in the commercial flocks (mainly BR genotypes) and consequently the high prevalence of these field variants in studies performed previously in Brazil (Villarreal et al., 2010; Chacón et al., 2011; Fraga et al., 2013). Further studies should be conducted to assess the occurrence and

viability of the different genotypes (BR-I, BR-II, and Mass) in feces under field conditions.

Although less frequent, IBV was also detected in respiratory samples. The respiratory tract is the main site for the multiplication of the IBV strains, especially during the first 3 to 5 d after infection (De Wit, 2000). The viral titer decreases rapidly in the second week after infection; however, IBV can persist for a period up to 77 d in the trachea in some special situations (Naqi et al., 2003). In the present study, Mass and field variant genotypes were detected in the trachea of birds with different ages. Mass genotypes were detected primarily in younger broilers (between 0 and 4.5 wk of age, corresponding to the probable multiplication period after vaccination), although they were also observed in 3 additional breeder flocks with older ages (24, 28, and 49 wk). However, strains from the BR genotype were detected in a different number of ages in breeder and broiler flocks. Infectious bronchitis virus-positive breeder flocks had a minimum of 13 wk and a maximum of 61 wk of age, whereas positive broiler flocks had a minimum of 1.4 and a maximum of 6.5 wk (data not shown). This wide age variation is probably related to the different episodes of initial infection with BR strains that are circulating in the flocks (Cavanagh and Gelb, 2008). However, the possibility should not be ruled out that strains from the BR genotype have a longer persistence in the trachea, as found with the Arkansas strain (Cavanagh and Gelb, 2008; Jackwood et al., 2009).

Infectious bronchitis virus was rarely detected in samples (such as kidneys and oviducts) of the urinary

**Table 5.** Infectious bronchitis virus genotyping in the different physiological systems in broiler and breeder flocks<sup>1</sup>

System	All flocks			Broiler flocks			Breeder flocks		
	Total	Mass (%)	BR (%)	Total	Mass (%)	BR (%)	Total	Mass (%)	BR (%)
Digestive	18	1 (5.5)	17 (94.5)	11	1 (9.1)	10 (90.9)	7	0 (0)	7 (100)
Respiratory	30	11 (36.7)	19 (63.3)	16	8 (50)	8 (50)	14	3 (21.4)	11 (78.6)
Urinary-reproductive	13	1 (7.7)	12 (92.3)	1	1 (100)	0 (0)	12	0 (0)	12 (100)
Total	61	13 (21.3)	48 (78.7)	28	10 (35.7)	18 (64.3)	33	3 (9.1)	30 (90.9)

<sup>1</sup>Mass = Massachusetts; BR = Brazilian.

and reproductive system of broilers and breeders. The only positive sample of these system in broilers belonged to the Mass genotype, whereas all the positive samples found in the oviducts ( $n = 3$ ) and kidney ( $n = 9$ ) of breeders belonged to the BR genotype. The Mass genotype was detected in a sample of broilers at 4.1 wk of age (probably related to the dissemination of the Mass vaccine strain in immunized flock), whereas the BR genotype was found in breeder flocks with different ages (13 to 30 wk). Infectious bronchitis virus replication in the kidney or oviduct is not directly correlated with evident renal disease, but some IBV strains are intrinsically nephropathogenic (Cavanagh, 2007). Specifically, strains from the BR genotype have already been detected in poultry flocks with nephritis and reproductive disorders (Villarreal et al., 2010; Chacón et al., 2011). Furthermore, Dolz et al. (2012) detected IBV in epithelial cells of the ureters by immunohistochemistry, suggesting that retrograde tubular peristalsis, a physiological characteristic of poultry (Laverty et al., 2006), can contribute to the successful replication of IBV in this system.

In Brazil, veterinary laboratories usually recommend collecting and analyzing samples of the respiratory system for IBV detection. In the present study, trachea and tracheal swabs were the only samples collected and evaluated by RT-qPCR in approximately half of the commercial poultry flocks (45.5% breeders and 48.2% broilers; Table 2). Although infectious bronchitis is initially a respiratory disease, viral titers are often lower in the trachea than in the enteric organs (Cavanagh and Gelb, 2008). Previous studies also reported a higher probability to detect IBV with the use of digestive tract samples than with respiratory samples (El-Houadfi et al., 1986; Almeida et al., 2012; Boroomand et al., 2012; Dolz et al., 2012). Therefore, an important recommendation would be to collect samples of at least these 2 systems (respiratory and digestive) to a more conclusive diagnosis of the IBV status in the flocks.

In conclusion, this study demonstrates IBV detection in broiler and breeder flocks from different geographic regions of Brazil. The BR variant genotype was more prevalent than Mass vaccine strains, mostly in breeders. Moreover, it was possible to detect strains from the BR and Mass genotype in different physiological systems, mainly in the organs of the digestive system.

## ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank the veterinarians and farmers who submitted clinical samples; the technicians of Simbios Biotecnologia; and Laboratório de Diagnóstico Molecular (ULBRA), who performed technical support. This work was supported by Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS), grant 11/1203-1, and Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP), grant 01.09.0240.00[AU4: Provide locations for all institutions/organizations mentioned.].

## REFERENCES

- Almeida, D. O., R. Tortelly, E. R. Nascimento, M. A. Chagas, M. I. Khan, and V. L. Pereira. 2012. Avian infectious bronchitis and deep pectoral myopathy—A case control study. *Poult. Sci.* 91:3052–3056.
- Boroomand, Z., K. Asasi, and A. Mohammadi. 2012. Pathogenesis and tissue distribution of avian infectious bronchitis virus isolate IRFIBV32 (793/B serotype) in experimentally infected broiler chickens. *Scientific World Journal* 2012:402537.
- Callison, S. A., D. A. Hilt, T. O. Boynton, B. F. Sample, R. Robison, D. E. Swayne, and M. W. Jackwood. 2006. Development and evaluation of a real-time Taqman RT-PCR assay for the detection of infectious bronchitis virus from infected chickens. *J. Virol. Methods* 138:60–65.
- Cavanagh, D. 2003. Severe acute respiratory syndrome vaccine development: Experiences of vaccination against avian infectious bronchitis coronavirus. *Avian Pathol.* 32:567–582.
- Cavanagh, D. 2007. Coronavirus avian infectious bronchitis virus. *Vet. Res.* 38:281–297.
- Cavanagh, D., and J. Gelb Jr. 2008. Infectious bronchitis. Pages 117–135 in *Diseases of Poultry*, 12th ed. Y. M. Saif, A. M. Fadly, J. R. Glisson, L. R. McDougald, L. K. Nolan, and D. E. Swayne, ed. Iowa State University Press, Ames.
- Chacón, J. L., J. N. Rodrigues, M. S. Assayag Jr., C. Peloso, A. C. Pedroso, and A. J. P. Ferreira. 2011. Epidemiological survey and molecular characterization of avian infectious bronchitis virus in Brazil between 2003 and 2009. *Avian Pathol.* 40:153–162.
- Cook, J. K., M. Jackwood, and R. C. Jones. 2012. The long view: 40 years of infectious bronchitis research. *Avian Pathol.* 41:239–250.
- De Wit, J. J. 2000. Detection of infectious bronchitis virus. *Avian Pathol.* 29:71–93.
- Di Fábio, J., and L. Y. B. Buitrago. 2009. Bronquite infecciosa das galinhas. Pages 631–648 in *Doenças das aves*, 2nd ed. A. Berchieri Jr, E. N. Silva, J. Di Fábio, L. Sesti, and M. A. F. Zuanaze, ed. Facta, Campinas, Brasil.
- Di Fábio, J., L. I. Rossini, S. J. Orbell, G. Paul, M. B. Huggins, A. Malo, B. G. Silva, and J. K. Cook. 2000. Characterization of infectious bronchitis viruses isolated from outbreaks of disease in commercial flocks in Brazil. *Avian Dis.* 44:582–589.
- Dolz, R., J. Vergara-Alert, M. Pérez, J. Pujols, and N. Majó. 2012. New insights on infectious bronchitis virus pathogenesis: characterization of Italy 02 serotype in chicks and adult hens. *Vet. Microbiol.* 156:256–264.
- El-Houadfi, M., R. C. Jones, J. K. Cook, and A. G. Ambali. 1986. The isolation and characterization of six avian infectious bronchitis viruses isolated in Morocco. *Avian Pathol.* 15:93–105.
- Fan, W., H. Wang, Y. Zhang, Z. Guan, T. Wang, C. Xu, A. Zhang, and X. Yang. 2012. Comparative dynamic distribution of avian infectious bronchitis virus M41, H120, and SAIBK strains by quantitative real-time RT-PCR in SPF chickens. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 76:2255–2260.
- Felippe, P. A., L. H. Da Silva, M. M. Santos, F. R. Spilki, and C. W. Arns. 2010. Genetic diversity of avian infectious bronchitis virus isolated from domestic chicken flocks and coronaviruses from feral pigeons in Brazil between 2003 and 2009. *Avian Dis.* 54:1191–1196.
- Flint, S. J., L. W. Enquist, R. M. Krug, V. R. Racaniello, and A. M. Skalka. 2000. *Principles of Virology: Molecular Biology, Pathogenesis, and Control*. ASM Press, Washington, DC.
- Fraga, A. P., E. Balestrin, N. Ikuta, A. S. K. Fonseca, F. R. Spilki, C. W. Canal, and V. R. Lunge. 2013. Emergence of a new genotype of avian infectious bronchitis virus in Brazil. *Avian Dis.* 57:225–232.
- Hipólito, O. 1957. Isolamento e identificação do vírus da bronquite infecciosa das galinhas no Brasil. *Arquivo Escola Veterinária Universidade de Minas Gerais* 10:131–151.
- Jackwood, M. W., D. Hall, and A. Handel. 2012. Molecular evolution and emergence of avian gammacoronaviruses. *Infect. Genet. Evol.* 12:1305–1311.
- Jackwood, M. W., D. A. Hilt, A. W. McCall, C. N. Polizzi, E. T. McKinley, and S. M. Williams. 2009. Infectious bronchitis virus



- field vaccination coverage and persistence of Arkansas-type viruses in commercial broilers. *Avian Dis.* 53:175–183.
- Lavery, G., V. S. Elbrond, S. S. Arnason, and E. Skadhauge. 2006. Epithelial structure and function in the hen lower intestine. Pages 65–84 in *Avian Gut Function in Health and Disease*. G. C. Perry, ed. CABI International, Oxon, UK.
- Maclachlan, N. J., and E. J. Dubovi. 2011. Coronaviridae. Pages 393–413 in *Fenner’s Veterinary Virology*. 4th ed. Elsevier, San Diego, CA.
- Naqi, S., K. Gay, P. Patalla, S. Mondal, and R. Liu. 2003. Establishment of persistent avian infectious bronchitis virus infection in antibody-free and antibody-positive chickens. *Avian Dis.* 47:594–601.
- Raj, G. D., and R. C. Jones. 1996. Immunopathogenesis of infection in SPF chicks and commercial broiler chickens of a variant infectious bronchitis virus of economic importance. *Avian Pathol.* 25:481–501.
- Raj, G. D., and R. C. Jones. 1997. Infections bronchitis virus: Immunopathogenesis of infection in the chicken. *Avian Pathol.* 26:677–706.
- Villarreal, L. Y., P. E. Brandão, J. L. Chacón, A. B. Saldenberg, M. S. Assayag Jr., R. C. Jones, and A. J. P. Ferreira. 2007. Molecular characterization of infectious bronchitis virus strains isolated from the enteric contents of Brazilian laying hens and broilers. *Avian Dis.* 51:974–978.
- Villarreal, L. Y., T. L. Sandri, S. P. Souza, L. J. Richtzenhain, J. J. De Wit, and P. E. Brandão. 2010. Molecular epidemiology of avian infectious bronchitis in Brazil from 2007 to 2008 in breeders, broilers, and layers. *Avian Dis.* 54:894–898.

## 6 DISCUSSÃO

O Brasil apresenta grande importância na indústria avícola mundial, sendo o maior exportador de carne de frango. Altos índices de produção são mantidos devido a um complexo sistema de melhoramento genético, sanidade e manejo destes animais. No entanto, o crescimento acelerado dos frangos de corte em um período tão curto de tempo acarreta deficiências que nem sempre são supridas pelo manejo na granja. Existe um déficit cardiorrespiratório na comparação com o crescimento destes animais, ou seja, este sistema não se desenvolve na mesma proporção que o sistema muscular, consequência do melhoramento genético. Consequentemente o sistema respiratório destes animais é bastante susceptível a doenças, sejam estas infecciosas e/ou ambientais. A bronquite infecciosa das galinhas é uma das principais doenças respiratórias das aves de produção, apresentando distribuição mundial e sendo responsável por significativas perdas de produtividade nas diversas categorias de produção (frangos de corte, reprodutores, poedeiras).

No país, a BIG foi inicialmente descrita em 1957, com a descrição do sorotipo Mass, sendo esse o principal sorotipo descrito no país até os anos 2000 (MENDONÇA et al., 2009). A partir disto, variantes antigênicas foram amplamente descritas no Brasil (CHACÓN et al., 2011; DI FÁBIO et al., 2000; FELIPPE et al., 2010; VILLARREAL et al., 2007; VILLARREAL et al., 2010), além de outros países da América do Sul (ALVARADO et al., 2005; RIMONDI et al., 2009). Chacón et al. (2011) analisaram amostras pertencentes ao período de 2003 a 2009 e reportaram a ocorrência de amostras pertencentes ao genótipo Mass, assim como uma maior frequência de amostras variantes brasileiras, específicas do nosso país e intimamente relacionadas entre si, denominadas BR-I. No presente estudo, foi realizada a caracterização do VBI em anos posteriores, ou seja, entre 2010 e 2011. Nas 49 amostras de diferentes regiões do país (Sul, Sudeste, Nordeste e Centro-Oeste), 34 amostras (69,4%) agruparam com o genótipo variante brasileiro BR-I que demonstrou grande predominância em relação ao sorotipo vacinal. Mas também foram encontradas quatro amostras (8,2%) que formaram um novo grupo, com alto grau de similaridade entre si. Este grupo, que não havia sido previamente descrito no país, foi denominado de BR-II. Este grupo apresentou grande similaridade com uma amostra denominada IBV/BRAZIL/2008/UNICAMP 830, descrita por

Felippe et al. (2010) como similar ao genótipo Ark. Essa amostra foi isolada a partir de suabe de traqueia, no ano de 2008, na região Sudeste em um lote com sintomatologia de BIG.

No Brasil, em lotes comerciais de aves, a vacinação contra o VBI é amplamente difundida. São utilizadas somente vacinas contendo as cepas Massachusetts (Ma5, H-120, M41). Nas amostras analisadas, onze (22,4%) apresentaram alta similaridade com as cepas vacinais utilizadas no país, o que demonstra uma baixa difusão de sorotipos vacinais. Segundo Brandão (2010), sorotipos do padrão vacinal (Mass) são responsáveis por cerca de 25% da ocorrência de BIG em lotes industriais no Brasil.

Sabe-se que o VBI é um vírus com alta capacidade de mutação e recombinação e que este pode acabar desenvolvendo mecanismos para escapar do sistema imune do hospedeiro. Neste sentido foi verificado neste estudo uma inserção de cinco aminoácidos, sendo os três comuns a todas as amostras (GPS) na posição 418-419 da proteína de espícula S1 de todas as amostras brasileiras (BR-I e BR-II) (cepa H120 como referência). Esta inserção de aminoácidos não foi verificada nas cepas vacinais (Mass), 4/91 e D207 de referência. Sabe-se que diferenças sutis (10 a 15 aminoácidos) na sequência da proteína de espícula S1 são responsáveis pelo surgimento de novos sorotipos, que podem ou não, ter algum nível de proteção cruzada (Cavanagh, 2007). Isto pode justificar uma menor eficácia de vacinas com sorotipos distintos dos sorotipos encontrados a campo. Segundo Cavanagh (2007), em estudo realizado previamente, aves inoculadas com a cepa Beaudette e que foram desafiadas com a cepa M41 (ambas com similaridade na sequência de aminoácidos de 95%) apresentaram quase nenhuma proteção contra o desafio quando avaliada atividade ciliar traqueal, o que talvez seja explicado pelos locais específicos onde ocorrem estas substituições. Existem regiões da proteína S1 que estão envolvidas com indução de anticorpos neutralizantes e substituições de aminoácidos nestas regiões parecem ser primordiais para analisar a imunogenicidade das cepas vacinais frente às cepas de campo, quando comparadas com substituições de aminoácidos aleatórias.

Além disso, outra análise realizada teve como objetivo avaliar a disseminação desses genótipos em diferentes sistemas fisiológicos das aves (infectados pelo VBI). Para tal, foram avaliados 198 lotes de frangos de corte e 234 lotes de matrizes de corte, de diferentes idades,

das regiões Sul, Centro-Oeste e Nordeste do país. As amostras foram processadas sob a forma de *pool* de órgãos conforme foram encaminhadas para o laboratório.

Estudos de prevalência de BIG em lotes do país não são comuns, sendo comuns estudos de caracterização dos isolados de campo (CHACÓN et al., 2011; FELIPPE et al., 2010; VILLARREAL et al., 2007; VILLARREAL et al., 2010). Este estudo traz informações relevantes da atual situação da doença a campo no Brasil. Foi analisado um total de 432 lotes de matrizes e frangos de corte quanto à presença do VBI. A frequência encontrada foi de 41,4%. Foram encontrados lotes positivos para VBI em todas as regiões analisadas (Centro-Oeste, Nordeste e Sul), sem diferença estatística entre elas. No entanto, foi encontrada uma maior proporção de lotes de frangos infectados pelo VBI quando comparados com lotes de matrizes, sendo encontrados valores de frequência de 30,8% e 54% em matrizes e frangos, respectivamente. Este estudo está em concordância com recentes trabalhos que reportam a ocorrência de BIG nas regiões Sul, Sudeste, Centro-Oeste (CHACÓN et al., 2011; VILLARREAL et al., 2010) e Nordeste (VILLARREAL et al., 2010), demonstrando que esta é uma doença amplamente disseminada nos plantéis do país. Sandri et al. (2008) demonstraram frequência de 73,5% de positividade de um total de 200 lotes analisados (matrizes, poedeiras e frangos de corte – frequência variando de 85,4% em frangos de corte a 63,6% em poedeiras, com 74,2% em matrizes), utilizando a mesma técnica descrita neste estudo.

Este mesmo estudo relata a alta disseminação do VBI nas regiões Sul, Centro-Oeste, Sudeste e Nordeste do país, com a prevalência de genótipos não-Mass, classificados como variantes, independentemente da categoria de produção das aves, a frequência destes genótipos foi de 77,5%, resultado muito similar ao encontrado no presente estudo, com valores de frequência de 70,9% para genótipos Variantes (denominados genericamente de BR). No entanto, a proporção de genótipo BR *versus* genótipo Mass variou conforme a categoria de produção, em frangos de corte foi encontrada uma proporção muito similar entre Mass e BR, diferentemente das matrizes, onde uma proporção muito maior do genótipo BR foi encontrada.

O que se verifica é que nas idades mais iniciais de produção a frequência de genótipos

Mass é maior e conforme a idade das aves vai aumentando a frequência deste genótipo diminui. A vacinação contra BIG em frangos de corte é, comumente, realizada no incubatório, no primeiro dia de vida dos pintos, com cepas atenuadas do genótipo Mass e, possivelmente uma segunda imunização entre 10 e 18 dias de idade dependendo do desafio de campo. (CAVANAGH & GELB JR, 2008; MACLACHLAN & DUBOVI, 2011). Conforme demonstrado na Tabela 1 (Artigo 2), nas primeiras 4,5 semanas de idade (período que compreende as datas vacinais nesta categoria de produção) o genótipo predominante foi o Mass, fato este que pode explicar a maior frequência deste genótipo em frangos de corte, no entanto, não se pode afirmar que a cepa isolada seja a cepa vacinal, além disso, em idades próximas ao abate dos frangos (após 4,5 semanas) houve o predomínio do genótipo BR. Nas matrizes são realizadas de três a quatro primo-vacinações, com vacinas vivas atenuadas, dependendo do desafio de campo; e uma última vacinação entre 10 e 18 semanas de idade, com vacinas inativadas (2-4 semanas pós-vacinação viva) (CAVANAGH & GELB JR, 2008). Entretanto, os resultados obtidos demonstram uma elevada frequência de genótipos BR (90,9%) em matrizes, durante todo o período de idade avaliado (até 66 semanas).

O VBI se replica inicialmente nas células epiteliais do trato respiratório, independentemente da cepa viral, no entanto, o vírus pode se replicar em diferentes tecidos, como células epiteliais do trato reprodutivo, células tubulares do epitélio renal (CAVANAGH & GELB JR, 2008), além de células do trato digestório (COOK et al., 2012; DOLZ et al., 2012). Para tanto, o sucesso da detecção do VBI é influenciado pela escolha e qualidade dos órgãos amostrados, além de outros fatores, tais como, o período decorrente do início da infecção e a amostragem, o nível de imunidade dos animais no momento da infecção, o número de aves amostradas e o período após a vacinação das aves. Quando os sinais respiratórios agudos são predominantes, as amostras devem ser, preferencialmente, do trato respiratório (DE WIT, 2000).

Na rotina laboratorial para a detecção de VBI é comum o envio de amostras do sistema respiratório (predominantemente traqueia e/ou suabe de traqueia), por se tratar primariamente de uma doença respiratória (CAVANAGH, 2007). Neste estudo, quase metade dos lotes amostrados (45,5% em matrizes e 48,2% em frangos) teve como único sistema avaliado, para a detecção do RNA viral por RT-PCR, o sistema respiratório. Todas as cepas

de VBI podem ser isoladas a partir do trato respiratório, com maior concentração na traqueia, durante os primeiros 3 a 5 dias pós-infecção (DE WIT, 2000). O título viral cai rapidamente na segunda semana PI e o isolamento viral nem sempre é possível (DE WIT, 2000; MACLACHLAN & DUBOVI, 2011). Como no campo não é possível determinar qual o dia da infecção dos animais, a análise somente do sistema respiratório pode não ser suficiente para a detecção do VBI nos lotes, pela presença de resultados falsos negativos, em função da amostragem inadequada, portanto a associação de sistema respiratório e digestório parece ser o mais adequado para o correto diagnóstico da doença. Segundo Cavanagh e Gelb Jr. (2008) amostras de suabes de traqueia e cloaca podem ser usadas para detecção e tipificação de amostras de VBI. Isso é suportado por diversos estudos que reportam um maior período de detecção do VBI em amostras do tecido digestório (BORROOMAND et al., 2011; DOLZ et al., 2012; EL-HOUADFI et al., 1986).

A frequência de VBI em cada um dos sistemas fisiológicos foi analisada de acordo com a categoria de produção das aves, e ficou evidente que o sistema urogenital é onde o VBI foi menos encontrado tanto em lotes de matrizes como em frangos de corte. Nos lotes de matrizes, o VBI foi detectado com maior frequência no sistema digestório (40%) do que nos demais sistemas, em concordância com De Wit. (2000) que sugere que em casos crônicos ou em infecções de poedeiras e matrizes a amostragem deve incluir as tonsilas cecais e cloaca, pois quantidades baixas de vírus são esperadas no trato respiratório. Em frangos de corte não foram encontradas diferenças significativas na detecção nos sistemas digestório (43,5%) e respiratório (37,7%).

Nas amostras analisadas, pertencentes ao sistema digestório, foi detectado o RNA viral em 43,5% frangos de corte e em 39,0% nas matrizes. Os resultados indicam que o VBI pode ser encontrado em elevada frequência neste sistema, independentemente da categoria de produção das aves. No entanto, nos frangos de corte a frequência do VBI no sistema respiratório também foi elevada (37,4%). É importante ressaltar que o órgão mais pesquisado no sistema digestório foi o intestino.

Diferentes cepas já foram isoladas a partir de suabe cloacal, fezes e tonsilas cecais (COOK et al., 2012; DHINAKAR RAJ & JONES, 1997), algumas vezes associadas com

persistência viral por longos períodos. Rins e intestinos são os prováveis locais de persistência viral (MACLACHLAN e DUBOVI, 2011). O real significado da excreção entérica do vírus ainda não é totalmente compreendido, no entanto, sabe-se que este pode atuar como um contaminante ambiental (COOK et al., 2012), já que este pode persistir por até 20 semanas nas fezes (MACLACHLAN e DUBOVI, 2011). O VBI comumente persiste em aves jovens e adultas no trato digestório sem apresentação clínica de doença (CAVANAGH & GELB JR, 2008), podendo persistir por até 14 semanas em tonsila cecal.

A bronquite infecciosa está entre as doenças aviárias mais prevalentes no Brasil e no mundo. Sua diversificada manifestação clínica causa grandes perdas econômicas na avicultura. No presente estudo foi detectado o VBI em matrizes e frangos de corte de modo disseminado no território brasileiro, sendo o genótipo BR mais prevalente do que o genótipo Mass, principalmente em matrizes. Foi possível detectar a presença dos genótipos BR e Mass nos 3 sistemas analisados, tanto em matrizes quanto em frangos de corte, no entanto, a detecção do genótipo Mass foi significativamente maior no sistema respiratório, no entanto, o genótipo BR foi encontrado, de forma bastante similar, em todos os sistemas analisados. Entretanto, estudos de patogenicidade e eficácia vacinal devem ser realizados para avaliar o impacto destas variantes na manifestação clínica e severidade da doença, bem como na eficiência dos programas de vacinação utilizados no país.

## 7 CONCLUSÕES

- 1) O presente estudo reporta a ocorrência de genótipos Mass e Variantes de campo (BR-I e BR-II), presentes nas regiões Sul, Sudeste, Centro-Oeste e Nordeste do país, não sendo encontrados outros genótipos descritos previamente (Ark, D274 e 4/91);
- 2) Um novo genótipo de Variantes brasileiras foi relatado, sendo denominado BR-II;
- 3) As variantes brasileiras foram detectadas em todas as regiões pesquisadas (Sul, Sudeste e Nordeste), sem diferença estatística entre elas, bem como o genótipo Mass;
- 4) A proporção do genótipo BR foi mais elevada do que o genótipo vacinal Mass (70,9% e 29,1%, respectivamente);
- 5) Os frangos de corte apresentaram frequência do VBI mais elevada quando comparado às matrizes (54 e 30,8%, respectivamente);
- 6) Foi detectada uma maior frequência do genótipo Mass em frangos de corte com até 4,5 semanas de idade. Os lotes de frango com idade mais próxima do abate (maior de 4,5 semanas) e os lotes de matrizes apresentaram maior frequência do genótipo BR;
- 7) Em matrizes o sistema fisiológico com maior frequência de detecção do VBI foi o sistema digestório (40%). Já em frangos de corte não houve diferença entre a frequência do VBI nos sistemas digestório (43,5%) e respiratório (37,4%).



## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

ALVARADO, I.R., VILLEGAS, P., MOSSOS, N., JACKWOOD, M.W. Molecular characterization of avian infectious bronchitis virus strains isolated in colombia during 2003. **Avian Diseases**. v.49, n.4, p.494-499, 2005.

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

BOROOMAND, Z., K. ASASI, A. MOHAMMADI. Pathogenesis and tissue distribution of avian infectious bronchitis virus isolate IRFIBV32 (793/B serotype) in experimentally infected broiler chickens. **Scientific World Journal**. v.2012:402537. 2012.

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

BRANDÃO, P.E. Avian infectious bronchitis virus in Brazil: A Highly Complex Virus Meets a Highly Susceptible Host Population. **Brazilian Journal of Poultry Science**.v.12, n.2, p.121-124, 2010.

BRANDEN, R.C., DA SILVA, E.N. Ocorrência de "nuevos" serotipos de bronquitis infecciosa en Brasil. **Proceedings of 6<sup>th</sup> Seminario Internacional de Patologia Aviar**; Georgia, USA, 1986.

CALLISON, S.A., HILT, D.A., BOYNTON, T.O., SAMPLE, B.F., ROBISON, R., SWAYNE, D.E., JACKWOOD, M.W. Development and evaluation of a real-time Taqman RT-PCR assay for the detection of infectious bronchitis virus from infected chickens. **Journal of Virological Methods**. v.138, p.60-65, 2006.

CAVANAGH, D. Coronavirus avian infectious bronchitis virus (Review). **Veterinary Research**. v.38, p.281-297, 2007.

CAVANAGH, D., GELB JR, J. Infectious Bronchitis. In: SAIF, Y.M., FADLY, A.M., GLISSON, J.R., MCDOUGALD, L.R., NOLAN, L.K., SWAYNE, D.E. **Diseases of Poultry**. 12.ed. Ames: Blackwell, 2008.

CHACÓN, J.L., RODRIGUES, J.N., ASSAYAG JÚNIOR, M.S., PELOSO, C., PEDROSO, A.C., FERREIRA, A.J.P. 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.

COLLISSON, E. W., PEI, J. DZIELAWA, J., SEO, S. H. Cytotoxic T lymphocytes are critical in the control of infectious bronchitis virus in poultry. **Developmental and Comparative Immunology**. v.24, p.187-200, 2000.

COOK J.K., DARBYSHIRE, J.H., PETERS, R.W. The use of chicken tracheal organ cultures for the isolation and assay of avian infectious bronchitis virus. **Archives of Virology**. v.50, n.1-2, p.109-118, 1976.

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

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

DE WIT. J.J. Technical Review: 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. Infectious bronchitis virus variants: a review of the history, current situation and control measures. **Avian Pathology**. v.40, n.3, p.223-235, 2011.

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

DI FÁBIO, J., BUITRAGO, L.Y.V. Bronquite Infecciosa das Galinhas. In: BERCHIERI JÚNIOR, A., SILVA, E.N., DI FÁBIO, J., SESTI, L., ZUANAZE, M.A.F. **Doenças das Aves**. 2.ed. Campinas: FACTA, 2009.

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

DOLZ, R., J. VERGARA-ALERT, M. PÉREZ, J. PUJOLS, N. MAJÓ. New insights on infectious bronchitis virus pathogenesis: characterization of Italy 02 serotype in chicks and adult hens. **Veterinary Microbiology**. v.156, p.256-264, 2012.

EL-HOUADFI, M., JONES, R.C., COOK, J.K.A., AMBALI, G. The isolation and characterization of six avian infectious bronchitis viruses isolated in Morocco. **Avian Pathology**. v.15, p.93-105, 1986.

EL-HOUADFI, M.D., JONES, R.C. Isolation of avian infectious bronchitis viruses in Morocco including an enterotropic variant. **Veterinary Record**. v.116, n.16, p.445, 1985.

FELIPPE, P.A.N., SILVA, L.H.A., SANTOS, M.M.A. B., SPILKI, F.R., ARNS, C.W. Genetic Diversity of Avian Infectious Bronchitis Virus Isolated from Domestic Chicken Flocks and Coronaviruses from Feral Pigeons in Brazil Between 2003 and 2009. **Avian Diseases**. v.54, p.1191-1196, 2010.

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

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

JACKWOOD, M.W. Review of Infectious Bronchitis Virus Around the World. **Avian Diseases**. v.56, n.4, p.634-641, 2012.

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

JONES, L.C., AMBALI, A.G. Re-excretion of an enterotropic infectious bronchitis virus by hens at point of lay after experimental infection at day old. **Veterinary Record**, v.120, p.617-618, 1987.

LAVERTY, G., ELBROND, V.S., ÁRNASON, S.S., SKA DHAUGR, E. Epithelial structure and function in the hen lower intestine. In: PERRY, G. C. **Avian Gut Function in Health and Disease**. Vol. 28. Cambridge: Cabi, 2006.

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

MACLACHLAN, N.J., EDWARD J.D. Coronaviridae. In: Fenner's. **Veterinary Virology**. 4. Ed. San Diego: Elsevier, 2011.

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

MENDONÇA, J.F.P., MARTINS, N.R.S., CARVALHO, L.B., SÁ, M.E.P., MELO, C.B. Bronquite Infecciosa das Galinhas: conhecimentos atuais, cepas e vacinas no Brasil (Revisão). **Ciência Rural**. v.39, n.8, p. 2559-2566, 2009.

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

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

NAKAMURA, K., COOK, J.K.A., OTSUKI, K., HUGGINS, M.B., FRAZIER, J.A. Comparative study of respiratory lesions in two chicken lines of different susceptibility , infected with infectious bronchitis virus: histology, ultrastructure and immunochemistry. **Avian Pathology**, v.20, p.245-261, 1991.

PENA, L.J., SANTOS, B.M., ROBERTI, R.P., MARIN, S.Y. Bronquite Infeciosa das Galinhas (Revisão). **Arquivos do Instituto Biológico**, v.72, n.3, p.397-404, 2005.

RIMONDI, A., CRAIG, M.I., VAGNOZZI, A., KÖNIG, G., DELAMER, M., PEREDA, A. Molecular characterization of avian infectious bronchitis virus strain from outbreaks in Argentina (2001-2008). **Avian Pathology**. v.38, n.2, p.149-153, 2009.

SALLE, C.T.P., MORAES, H.L.S. Prevenção de doenças/Manejo profilático/Monitoria. In: BERCHIERI JÚNIOR, A., SILVA, E.N., DI FÁBIO, J., SESTI, L., ZUANAZE, M.A.F. **Doenças das Aves**. 2.ed. Campinas: FACTA, 2009.

UBABEF. **União Brasileira de Avicultura**. Disponível em <[http://www.ubabef.com.br/estatisticas/frango/producao\\_mundial\\_carne\\_frango\\_2012](http://www.ubabef.com.br/estatisticas/frango/producao_mundial_carne_frango_2012)> Acesso em: 13 agosto, 2013.

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

VILLARREAL, L.Y.B., BRANDÃO, P.E., CHACÓN, J.L., SAIDENBERG, A.B.S., ASSAYAG, M.S., JONES, R.C., FERREIRA, A.J.P. Molecular Characterization of Infectious Bronchitis Virus Strains Isolated from the Enteric Contents of Brazilian Laying Hens and Broilers. **Avian Diseases**. v.51, n.4, p.974-978, 2007.

VILLARREAL, L.Y.B., SANDRI, T.L., SOUZA, S.P., RICHTZENHAIN, L.J., WIT, J.J., BRANDÃO, P.E. Molecular Epidemiology of Avian Infectious Bronchitis in Brazil from 2007 to 2008 in Breeders, Broilers, and Layers. **Avian Diseases**. v.54, p.894-898, 2010.

VILLEGAS, P. Viral Diseases of the Respiratory System. **Poultry Science**. v.77, p.1143–1145, 1998.

ZWAAGSTRA, K.A., VAN DER ZEIJST, B.A.M., KUSTERS, J.G. Rapid Detection and Identification of Avian Infectious Bronchitis Virus. **Journal of Clinical Microbiology**. v.30, n.1, p.79-84, 1992