



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA

ANA CAROLINE DE SOUZA BARNABÉ

**COINFECÇÃO EXPERIMENTAL DO
METAPNEUMOVÍRUS AVIÁRIO E DO VÍRUS DA
BRONquite INFECCIOSA DAS GALINHAS EM AVES
SPF**

EXPERIMENTAL CO-INFECTION OF SPF CHICKENS WITH AVIAN
METAPNEUMOVIRUS AND INFECTIOUS BRONCHITIS VIRUS

CAMPINAS

2017

ANA CAROLINE DE SOUZA BARNABÉ

COINFECÇÃO EXPERIMENTAL DO METAPNEUMOVÍRUS AVIÁRIO E DO VÍRUS
DA BRONQUITE INFECCIOSA DAS GALINHAS EM AVES SPF

EXPERIMENTAL CO-INFECTION OF SPF CHICKENS WITH AVIAN
METAPNEUMOVIRUS AND INFECTIOUS BRONCHITIS VIRUS

Tese apresentada ao Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para obtenção do título de Doutora em Genética e Biologia Molecular, na Área de Microbiologia.

Thesis presented to the Institute of Biology of the State University of Campinas as part of the requirements for the degree of Doctor in Genetics and Molecular Biology, in the area of Microbiology.

Orientadora: CLARICE WEIS ARNS

ESTE TRABALHO CORRESPONDE À
VERSÃO FINAL DA TESE DEFENDIDA
PELA ALUNA ANA CAROLINE DE
SOUZA BARNABÉ E ORIENTADA PELA
PROFA. DRA. CLARICE WEIS ARNS.

CAMPINAS

2017

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca do Instituto de Biologia
Mara Janaina de Oliveira - CRB 8/6972

B252c Barnabé, Ana Caroline de Souza, 1986-
Coinfecção experimental do metapneumovírus aviário e do vírus da
bronquite infecciosa das galinhas em aves SPF / Ana Caroline de Souza
Barnabé. – Campinas, SP : [s.n.], 2017.

Orientador: Clarice Weis Arns.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de
Biologia.

1. Coinfecção. 2. Metapneumovírus aviário. 3. Vírus da bronquite
infecciosa. I. Arns, Clarice Weis, 1956-. II. Universidade Estadual de Campinas.
Instituto de Biologia. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Experimental co-infection in SPF chickens with avian
metapneumovirus and infectious bronchitis virus

Palavras-chave em inglês:

Coinfection

Avian metapneumovirus

Infectious bronchitis virus

Área de concentração: Microbiologia

Titulação: Doutora em Genética e Biologia Molecular

Banca examinadora:

Clarice Weis Arns [Orientador]

João Pessoa Araujo Junior

Paulo Anselmo Nunes Felipe

Daniel Fábio Kawano

Marcelo Lancellotti

Data de defesa: 19-12-2017

Programa de Pós-Graduação: Genética e Biologia Molecular

COMISSÃO EXAMINADORA

Campinas, 19 de dezembro de 2017.

Profa. Dra. Clarice Weis Arns.

Prof. Dr. João Pessoa Araújo Júnior.

Prof. Dr. Paulo Anselmo Nunes Felipe.

Prof. Dr. Daniel Fábio Kawano.

Prof. Dr. Marcelo Lancellotti.

A ata de defesa com as respectivas assinaturas dos membros encontra-se no SIGA/Sistema de Fluxo de Dissertação/Tese e na Secretaria do Programa da Unidade.

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, que com amor e carinho me deram a melhor herança que um filho pode receber: a educação.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, por mais esta conquista, por me dar saúde, perseverança, força e disposição durante toda minha vida.

À minha família que apesar da dolorosa distância sempre me incentivou a continuar nesta caminhada. Obrigada por toda compreensão, paciência, apoio e amor incondicional. Sem vocês eu não chegaria até aqui.

À minha orientadora Prof. Dr. Clarice Arns. Agradeço imensamente pela oportunidade, confiança, aprendizado, amizade e tempo de dispensados à mim.

Aos membros da banca examinadora, por aceitarem o convite e por agregar ainda mais valor a este trabalho.

Ao pessoal do Laboratório de Virologia Animal que de alguma maneira contribuíram para a realização deste trabalho, em especial agradecimento à Ana Paula de Moraes, Gabriela Mansano, Geneci Davi, Marina Padilla, Matheus Martini, Leonardo Caserta, Paula Salek, Paulo Simas, Raissa Beck e Ricardo Durães.

À empresa BIOVET por toda ajuda na condução dos experimentos.

Ao Instituto de Biologia da UNICAMP e ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular pela oportunidade de realizar o doutorado.

Ao Daniel Suyama pelo amor, companheirismo, paciência e por toda ajuda direta e indireta durante o doutorado. Obrigada por sempre acreditar em mim e fazer com que ao seu lado qualquer obstáculo pareça fácil de ser ultrapassado.

Aos amigos de Campinas: Andriel, Claudia, Conceição, Mayara, Natália, Simone e Terezinha que me acolheram tão bem.

À FAPESP pela bolsa concedida (Auxílio: 2013/23303-9).

À todos aqueles que contribuíram com este trabalho de alguma forma e que, por descuido, eu tenha esquecido de mencionar.

A todos os meus sinceros agradecimentos

RESUMO

As infecções causadas por mais de um patógeno são comuns na avicultura, principalmente aquelas causadas por agentes respiratórios como metapneumovírus aviário (aMPV) e o vírus da bronquite infecciosa das galinhas (VBI). Este estudo teve como objetivo avaliar a patologia e a resposta imune de galinhas livre de patógenos específicos (SPF) coinfectadas com aMPV e VBI. Aos 28 dias de vida, 150 aves foram inoculadas e divididas em 4 grupos: controle negativo, inoculado com VBI, inoculado com aMPV e inoculado com VBI e aMPV. Ao longo do período experimental foram observadas manifestações clínicas características das infecções pelos vírus inoculados. Aos três, sete, 14, 21, 28 e 35 dias pós infecção (dpi) as aves foram necropsiadas e foram coletados sangue para sorologia e citometria de fluxo, amostras de seio nasal, traqueia e pulmão para quantificação viral por PCR quantitativo em tempo real (qRT-PCR) e histopatologia e fragmentos de traqueia para avaliação de ciliostase. A coinfeção causada pelos dois vírus estudados provocou menos danos às aves em relação ao grupo infectado somente com o VBI como foi observado na citometria de fluxo, sorologia e qRT-PCR de seio nasal e traqueia. Nas aves inoculadas com VBI, tanto no grupo VBI quanto o aMPV+VBI, ocorreu diarreia comprovando com a detecção do vírus no suabe cloacal até 35 dpi. A avaliação da ciliostase traqueal não demonstrou grandes diferenças entre os grupos experimentais. O pulmão do grupo coinfectado apresentou maiores números de cópias virais e maiores lesões microscópicas em relação aos demais grupos, se diferenciando dos demais órgãos analisados. Os resultados sugerem que a infecção simultânea por aMPV e VBI pode resultar em interferência viral.

Palavras-chave: coinfeção, metapneumovírus aviário, vírus da bronquite infecciosa.

ABSTRACT

Infections caused by more than one pathogen are common in poultry industry, especially those caused by respiratory agents such as avian metapneumovirus (aMPV) and infectious bronchitis virus (IBV). This study aimed to evaluate a pathology and immune response of specific pathogen free (SPF) chickens coinfecting with aMPV and IBV. At 28 days of life, 150 birds were inoculated and divided into 4 groups: negative control, inoculated with IBV, inoculated with aMPV and inoculated with IBV and aMPV. During the experimental period, characteristic clinical signs of infection with the inoculated virus were observed. At 3, 7, 14, 21, 28, and 35 days post inoculation (dpi) the birds were necropsied and blood was collected for serology and flow cytometry, samples of nasal sinus, trachea and lung were collected for viral quantification by real time quantitative PCR (qRT-PCR) and histopathology, and fragments of trachea for evaluation of ciliostasis. Coinfection caused by the two viruses studied caused less damage to birds than the IBV-infected group as observed in flow cytometry, serology and qRT-PCR of the nasal sinus and trachea. In birds inoculated with IBV, both IBV group and aMPV + IBV, there was diarrhea proving with the detection of the virus in the cloacal suabe up to 35 dpi. The evaluation of tracheal ciliostasis did not show large differences between the experimental groups. The lung of the coinfecting group had higher numbers of viral copies and larger microscopic lesions in relation to the other groups, differing from the other organs analyzed. The results suggest that simultaneous infection by aMPV and IBV may result in viral interference.

Keywords: Avian metapneumovirus, co-infection, infectious bronchitis virus.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Títulos de anticorpos para aMPV detectados por ELISA indireto.....	45
Figura 2. Títulos de anticorpos para VBI detectados por ELISA indireto.....	46
Figura 3 - Linfócitos T auxiliares não ativados (CD8-CD28+).....	47
Figura 4 - Linfócitos T auxiliares (CD4+TCRvβ1-).....	48
Figura 5 - Linfócitos T auxiliares de mucosa (CD4+TCRvβ1+).....	49
Figura 6 - Linfócitos T citotóxicos (CD8+CD28+).....	49
Figura 7 - Linfócitos T citotóxicos de mucosas (CD4-TCRvβ1+).....	50
Figura 8 - Linfócitos T citotóxicos ativados (CD8+CD28-).....	51
Figura 9 - Monócitos supressores (Mo+MHCII-).....	52
Figura 10 - Monócitos (Mo+MHCII+).....	52
Figura 11 - Células apresentadoras de antígeno (Mo-MHCII+).....	53
Figura 12. Quantificação relativa de aMPV por qRT-PCR em seio nasal.....	56
Figura 13. Quantificação relativa de aMPV por qRT-PCR em traqueia.....	57
Figura 14. Quantificação relativa de aMPV por qRT-PCR em pulmão.....	58
Figura 15. Quantificação relativa de aMPV por qRT-PCR em suabe cloacal.....	59
Figura 16. Quantificação relativa de VBI por qRT-PCR em seio nasal.....	60
Figura 17. Quantificação relativa de VBI por qRT-PCR em traqueia.....	61
Figura 18. Quantificação relativa de VBI por qRT-PCR em pulmão.....	62
Figura 19. Quantificação relativa de VBI por qRT-PCR suabe cloacal.....	63

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Delineamento experimental dos grupos inoculados com aMPV e VBI.	34
Quadro 2. Anticorpos primários utilizados na citometria de fluxo	37
Quadro 3. Células do sistema imunológico avaliadas com respectivos anticorpos. ...	37
Quadro 4. Escores utilizados para avaliação da atividade ciliar traqueal.	38
Quadro 5. Sequências de oligonucleotídeos e sondas utilizadas para quantificação viral relativa de aMPV e VBI.....	40
Quadro 6. Manifestações clínicas observadas nos grupos experimentalmente infectados.....	43
Quadro 7. Escores de ciliostase observados nos grupos experimentais aos três, sete, 14 e 21 dpi.....	55
Quadro 8. Escore histopatológico observado no seio nasal dos grupos inoculados aos três, 14 e 28 dpi.	65
Quadro 9. Escore histopatológico observado na traqueia dos grupos inoculados aos três, 14 e 28 dpi.....	66
Quadro 10. Escore histopatológico observado no pulmão dos grupos inoculados aos três, 14 e 28 dpi.....	67

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

aMPV: *Avian metapneumovirus* - Metapneumovírus aviário.

ANOVA: Análise de variância.

BHK: *Baby hamster kidney* - Célula de rim de hamster neonato.

BRSV: *Bovine respiratory syncytial virus* - Vírus sincicial respiratório bovino.

CEF: *Chicken embryo fibroblast* - Célula de fibroblasto de embrião de galinha.

CEK: *Chicken embryo kidney* - Célula de rim de embrião de galinha.

CEL: *Chicken embryo liver* - Célula de fígado de embrião de galinha.

CER: *Chicken embryo related* - Célula de uma linhagem híbrida de fibroblasto de embrião de galinha.

DNase: desoxirribonuclease.

DO: Densidade óptica.

DPI: Dias pós inoculação .

EDTA: *Ethylenediamine tetraacetic acid* - Ácido etilenodiamino tetra-acético.

ELISA: *Enzyme linked immunosorbent assay* - Ensaio imunoenzimático.

FITC: Isotiocianato de fluoresceína.

Fwd: *Primer forward* - Oligonucleotídeo iniciador anterior.

hMPV: *Human metapneumovirus* - Metapneumovírus humano.

HRSV: *Human respiratory syncytial virus* - Vírus sincicial respiratório humano.

IFI: Imunofluorescência indireta.

MEM: Meio essencial mínimo.

mRNA: *Messenger RNA* - RNA mensageiro.

PBS: *Phosphate buffered saline* - Solução salina tamponada e fosfatada.

PCR: *Polymerase chain reaction* - Reação em cadeia da polimerase.

PE: *Phycoerythrin* - Ficoeritrina.

PEG: *Polyethylene glycol* - Polietilenoglicol.

pH: Potencial hidrogeniônico.

qRT-PCR: *Quantitative reverse transcription polymerase chain reaction* - Reação em cadeia da polimerase quantitativa via transcriptase reversa.

QT-35: Célula de fibrosarcoma de codorna japonesa.

Rev: *Primer reverse* - Oligonucleotídeo iniciador posterior.

RNA: *Ribonucleic acid* - Ácido ribonucleico.

RNase: ribonuclease.

RT: *Reverse transcriptase enzyme* - Enzima transcriptase reversa.

RT-PCR: *Reverse transcription polymerase chain reaction* - Reação em cadeia da polimerase.

SARS: *Severe Acute Respiratory Syndrome* - Síndrome Respiratória Aguda Grave.

SFB: Soro fetal bovino.

SHS: *Swollen Head Syndrome* - Síndrome da Cabeça Inchada.

SPF: *Specific pathogen free* - Livre de patógenos específicos.

SPRD: *Spectra red*.

TA: Temperatura ambiente.

TOC: *Tracheal organ cultures* - Cultura em anel traqueal.

UTR: *Untranslated region* - Regiões não traduzidas.

VBI: Vírus da bronquite infecciosa das galinhas.

VERO: *African green monkey kidney* - Célula de rim de macaco verde africano.

VN: Teste de vírus neutralização.

LISTA DE SIMBOLOS

μ l: Microlitro.

EID₅₀ : 50% *Embryo Infectious Dose* - Dose infectante para 50% para embrião.

g: Gravidade.

kb: Kilobase.

ml: Mililitro.

mm: Milímetro.

nm: Nanômetro.

nM: Nanomolar.

rmp: Rotações por minuto.

TCID₅₀: 50% *Tissue Culture Infective Dose* - Doses infectantes para 50% dos cultivos celulares.

μ m: Micrômetro.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
2. OBJETIVOS	18
2.1. Objetivo geral.....	18
2.2. Objetivos específicos.....	18
3. REVISÃO DA LITERATURA	19
3.1. Metapneumovírus aviário	19
3.2. Vírus da Bronquite Infecciosa das Galinhas (VBI)	25
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	33
4.1. Amostras virais	33
4.2. Propagação viral.....	33
4.3. Titulação viral.....	34
4.4. Experimento in vivo	34
4.5. Manifestações clínicas.....	35
4.6. Detecção de anticorpos por ELISA indireto	35
4.7. Citometria de fluxo.....	36
4.8. Avaliação da atividade ciliar traqueal (teste de ciliostase).....	37
4.9. Preparação das amostras para extração de RNA viral	38
4.9.1. Homogeneização dos tecidos	38
4.9.2. Suabes.....	39
4.10. Extração de RNA para quantificação viral por PCR em tempo real.....	39
4.11. Quantificação relativa de RNA viral em PCR em tempo real	40
4.12. Avaliação de lesões macroscópicas	41
4.13. Histopatologia	41
4.14. Análise estatística.....	42
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	43
5.1. Manifestações clínicas.....	43
5.2. Sorologia por ELISA indireto.....	44
5.3. Citometria de fluxo.....	47
5.4. Avaliação da atividade ciliar traqueal (teste de ciliostase).....	54
5.5. Quantificação relativa de RNA viral de aMPV e VBI em órgãos	55
5.5.1. aMPV.....	56
5.5.2. VBI.....	60
5.6. Avaliação de lesões macroscópicas	64
5.7. Histopatologia.....	64

6. CONCLUSÕES	69
REFERENCIAS.....	70
ANEXOS.....	97
Comissão de ética.....	97
Declaração de autoria.....	98

1. INTRODUÇÃO

O Brasil está entre os maiores produtores e exportadores de carne de frango do mundo, o que tem contribuído para o seu desenvolvimento econômico e social. Segundo dados da Associação Brasileira de Proteína Animal (ABPA), em 2016 foram produzidos 12,9 milhões de toneladas de carne de frango e 39 bilhões de unidades de ovos (ABPA, 2017). Estes resultados se devem à avicultura intensiva, que é caracterizada pela criação das aves em ambientes de alta densidade populacional. No entanto, este tipo de criação colabora para a ocorrência e disseminação de doenças infecciosas, principalmente as que acometem o sistema respiratório. A alta densidade de aves no ambiente de criação também contribui para a deterioração da qualidade do ar devido ao aumento de poeira e da concentração de amônia atmosférica, fatores ambientais que aumentam a susceptibilidade das aves às infecções respiratórias (Inoue & Castro, 2009).

As doenças respiratórias são importantes por causarem perdas econômicas na produção avícola, tanto para a produção de carne quanto para a de ovos. Tais perdas se devem a gastos com medicamentos e vacinas, queda na produção e qualidade de ovos, condenação de carcaças em abatedouros, além de causar morbidade e mortalidade no plantel (Jones, 2010). Na maioria das doenças respiratórias diagnosticadas estão envolvidos mais de um agente patogênico.

As infecções causadas por mais de um agente patogênico são chamadas de infecções mistas e são comuns na avicultura, principalmente as causadas por agentes respiratórios. As infecções mistas podem ser divididas em coinfeções, quando os agentes invadem o hospedeiro ao mesmo tempo, ou superinfecção, quando um agente infeccioso invade o hospedeiro antes de um segundo agente (Muturi & Bara, 2015). As infecções mistas são complicadas, à medida que se torna difícil a identificação do agente primário que desencadeou o quadro clínico (Inoue & Castro, 2009). Dentre os agentes infecciosos que causam doenças respiratórias em aves, destacam-se o metapneumovírus aviário (aMPV) e o vírus da bronquite infecciosa das galinhas (VBI).

O aMPV é o agente etiológico da Rinotraqueíte dos Perus (*Turkey Rhinotracheitis* - TRT) e está associado à Síndrome da Cabeça Inchada (*Swollen Head Syndrome* - SHS) em galinhas (Umar *et al.*, 2016). As manifestações clínicas

da infecção por aMPV são inespecíficas e caracterizadas por sintomas respiratórios e reprodutivos (Jones & Rautenschlein, 2013). No mundo têm-se descrito quatro subtipos de aMPV chamados A, B, C e D. No Brasil há relatos somente dos subtipos A e B, tanto em aves domésticas quanto em aves sinantrópicas e selvagens (Felippe *et al.*, 2011). Destes subtipos, o B apresenta maior prevalência nos planteis avícolas brasileiros em relação ao A (Chacón *et al.*, 2011a; Felippe *et al.*, 2011). Supõe-se, ainda, que no Brasil há pelo menos duas subpopulações do subtipo B (Villarreal *et al.*, 2009). Estudos de patogenicidade comparando o subtipo A e B demonstraram que o B é mais patogênico em galinhas (Aung *et al.*, 2008).

A bronquite infecciosa das galinhas é uma enfermidade viral aguda causada pelo VBI, sendo altamente contagiosa e endêmica em praticamente todos os países que criam aves (Bande *et al.*, 2017). A infecção pelo vírus acomete o sistema respiratório das galinhas, podendo acometer também o sistema renal e reprodutivo (Cubillos, 2009). Infecções secundárias por vírus e bactérias podem agravar a infecção por VBI (Bande *et al.*, 2016). As perdas econômicas causadas pela doença que podem chegar a U\$ 12.705.513,96 por ano, tanto no abatedouro como na produção de ovos, em um sistema de integração (Assayag *et al.*, 2012).

O VBI possui alta taxa de mutação e, por esta razão, um grande número de variantes e sorotipos já foram e ainda são detectados em todo o mundo (De Wit *et al.*, 2011). No Brasil, estudos demonstraram a presença de dois genótipos brasileiros chamados BR-I e BR-II (Villarreal *et al.*, 2010a; Chacón *et al.*, 2011b; Fraga *et al.*, 2013). Destes, o genótipo BR-I é o mais predominante no país (Carranza *et al.*, 2017).

O VBI e o aMPV têm tropismo pelo sistema respiratório (Cook *et al.*, 1991; Cavanagh & Naqi, 1997; Catelli *et al.*, 1998), levando à possibilidade de que exista interferência entre eles no local de replicação viral. Tal interferência é conhecida por ocorrer em outras situações, como entre o VBI e o vírus da doença de Newcastle, por exemplo (Thornton & Muskett, 1975; Gelb Jr *et al.*, 2007).

Até o momento, existem poucos estudos experimentais de coinfeccções causadas por vírus respiratórios aviários. Cook *et al.*(2001) realizaram um estudo envolvendo coinfeção de aMPV e VBI. Todavia, estudos envolvendo coinfeccções com amostras de campo principalmente com o sorotipo BR do VBI são escassos na literatura. Além disso, o impacto da coinfeção em várias respostas do hospedeiro, incluindo manifestações clínicas, replicação viral, imunidade celular e humoral ainda

não foi elucidado justificando-se a importância de estudos de infecções simultâneas por vírus respiratórios aviários. Desta forma, será possível desenvolver estratégias de diagnóstico bem como controle e profilaxia adequados que possam controlar ambos os vírus.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Sabendo da ocorrência destes dois vírus nos plantéis avícolas, este trabalho tem como objetivo avaliar a patologia e a resposta imune de galinhas livres de patógenos específicos (*Specific pathogen free* - SPF) coinfectadas com aMPV e VBI.

2.2. Objetivos específicos

- Avaliar a resposta humoral frente à coinfeção dos vírus pela detecção de anticorpos através de sorologia;
- Quantificar as subpopulações de células do sistema imune através da citometria de fluxo;
- Investigar o efeito da coinfeção sobre o epitélio ciliar traqueal através da avaliação da ciliostase traqueal;
- Quantificar o ácido ribonucleico (*Ribonucleic acid* - RNA) viral nos diferentes órgãos através da técnica reação em cadeia da polimerase (*Polymerase chain reaction* - PCR);
- Avaliar o efeito da coinfeção sobre lesões microscópicas no sistema respiratório através de histopatologia.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1. Metapneumovírus aviário

O Metapneumovírus aviário (aMPV) é o agente etiológico da Rinotraqueíte dos Perus (*Turkey Rhinotracheitis* - TRT) e está associado à Síndrome da Cabeça Inchada (*Swollen Head Syndrome* - SHS) em galinhas. Anteriormente, o vírus era classificado como pertencente à família *Paramyxoviridae*, subfamília *Pneumovirinae* e gênero *Orthopneumovirus* (antigo *Pneumovirus*). Atualmente, o aMPV é classificado como pertencente à ordem *Mononegavirales*, família *Pneumoviridae* e à um novo gênero, o *Metapneumovirus*. Essa nova classificação ocorreu por o vírus apresentar em seu genoma oito genes organizados diferentemente dos outros vírus do gênero *Orthopneumovirus*, como, por exemplo, o vírus sincicial respiratório humano (hRSV) e o vírus sincicial respiratório bovino (BRSV) (Ferreira *et al.*, 2017).

O aMPV é vírus envelopado, com genoma não segmentado, composto de RNA de fita simples, sentido negativo e com aproximadamente 14 kb de extensão. Seu envelope viral possui projeções medindo cerca de 13 a 14 nm e seu nucleocapsídeo mede cerca 14 nm de diâmetro (Collins & Gough, 1988). O vírus é composto por oito proteínas estruturais: nucleocapsídeo (N), fosfoproteína (P), matriz (M), fusão (F), segunda matriz (M2), proteína hidrofóbica pequena (SH), glicoproteína (G) e grande polimerase (L) (Easton *et al.*, 2004).

As proteínas F e G estão envolvidas no processo de infectividade do aMPV. A capacidade antigênica da glicoproteína de fusão está relacionada com o papel funcional da mesma na interação entre célula do hospedeiro e patógeno (Cecchinato *et al.*, 2010). A proteína G apresenta baixa imunogenicidade quando comparada à proteína F. Isso pode ser atribuído à sua alta glicosilação (Luo *et al.*, 2010). De acordo com Wertz *et al.* (1989), provavelmente, a glicosilação extensa desta proteína pode afetar a resposta imune contra o patógeno.

A replicação viral do aMPV inicia-se pela adsorção viral com o receptor celular. A proteína G do vírus se liga ao receptor da superfície da célula hospedeira. Após esta ligação, a proteína F sofre uma mudança conformacional, ocorrendo a

liberação do peptídeo de fusão e esta se funde à membrana celular. Depois, o complexo da RNA-polimerase, responsável pela síntese do RNA viral, é liberado no citoplasma da célula. O genoma do RNA viral é utilizado como molde para síntese de RNA mensageiro (mRNA) e também para a síntese da fita antigenômica (+). A replicação viral ocorre após a síntese do mRNA e das proteínas virais. O antigenoma produzido é utilizado como molde para as cópias de RNA genômico (-). A montagem do complexo RNA-polimerase ocorre no citoplasma a partir da associação da nucleoproteína com o RNA viral, formando o complexo nucleoproteína RNA (Nucleoprotein RNA complex - RNA-N). Logo depois, o complexo RNA-N se associa às proteínas virais P e L e ocorre a montagem do capsídeo viral na superfície celular. As proteínas de membrana são sintetizadas no retículo endoplasmático da célula hospedeira, sofrendo maturação conformacional antes de serem transportadas para o Complexo de Golgi. Lá, a proteína F é clivada formando as moléculas F1 e F2. Em seguida, as proteínas são transportadas à membrana citoplasmática, ocorrendo o alinhamento do complexo RNA-polimerase associado à proteína M próximo às regiões modificadas da membrana celular. E, por fim, novos vírions são liberados na superfície celular (Easton *et al.*, 2004).

A inativação do vírus ocorre quando este é submetido à 56°C por 30 minutos. Quando sujeito a temperaturas abaixo de -50°C durante meses, o vírus se mantém estável. A exposição ao potencial hidrogeniônico (pH) ácido e a alguns desinfetantes como o quaternário de amônia, formaldeído, etanol e iodo reduz a viabilidade do vírus. A ocorrência de congelamento e descongelamento do vírus também pode reduzir a infectividade viral (Jones & Rautenschlein, 2013).

Com base nas sequências de nucleotídeos da proteína G (Juhász & Easton, 1994) e em testes de neutralização com anticorpos monoclonais (Cook *et al.*, 1993a), o aMPV é classificado em quatro subtipos: A, B, C e D. A homologia entre as proteínas do subtipo A e B é geralmente maior quando comparadas com o subtipo C (Shin *et al.*, 2002a). O subtipo C apresenta similaridade genética com o metapneumovírus humano (hMPV) (Njenga *et al.*, 2003; Govindarajan & Samal, 2004; Brown *et al.*, 2014). Já o subtipo D é geneticamente distinto dos subtipos A, B e C (Bäyon-Auboyer *et al.*, 2000).

Inicialmente, o aMPV foi isolado em ovos embrionados através da inoculação via saco vitelínico (Panigrahy *et al.*, 2000) e em cultura de anel traqueal (*Tracheal organ cultures* - TOC) de embriões de galinhas e perus (Aung, 2007).

Após o isolamento primário nesses dois sistemas, o vírus foi adaptado com sucesso em cultivos celulares de aves como células de fibroblastos de embrião de galinha (*Chicken embryo fibroblast* - CEF) (Panigrahy *et al.*, 2000), células de fígado de embrião de galinha (*Chicken embryo liver* - CEL) (Williams *et al.*, 1991), células de uma linhagem híbrida de fibroblasto de embrião de galinha (*Chicken embryo related* - CER) (Arns & Hafez, 1995), células de fibrosarcoma de codorna japonesa (QT-35) (Sabara & Larence, 2002) e, também, em cultivos celulares de mamíferos como células de rim de macaco verde africano (*African green monkey kidney* - VERO) (Williams *et al.*, 1991) e células de rim de hamster neonato (*Baby hamster kidney* - BHK) (Coswig *et al.*, 2010). O efeito citopático do vírus é caracterizado por formação de sincícios e áreas dispersas com arredondamento celular (Cook *et al.*, 1999). Diferente do subtipo A e B, o subtipo C não causa ciliostase (Cook *et al.*, 1999; Goyal *et al.*, 2000) e não é isolado em TOC.

Galinhas e perus de todas as idades são considerados hospedeiros naturais do vírus. Além das aves domésticas, o vírus também pode ser encontrado em aves silvestres. O vírus já foi detectado na Europa e na Ásia em faisões (*Phasianus colchicus*) que apresentavam quadros clínicos respiratórios (Catelli *et al.*, 2001, Ogawa *et al.*, 2001, Welchman *et al.*, 2002). Em galinhas d'angola (*Numida meleagris*) já foi relatado a ocorrência de Síndrome da Cabeça Inchada (Litjens *et al.*, 1980) e de anticorpos para aMPV (Picault *et al.*, 1986). O subtipo C já foi encontrado em várias espécies de aves silvestres (Shin *et al.*, 2000a; Bennett *et al.*, 2002; Bennett *et al.*, 2004; Turpin *et al.*, 2008). Até o momento, somente o subtipo D não foi detectado em aves silvestres. No Brasil, há relato do subtipo A e B em aves silvestres (Felippe *et al.*, 2011; Simas *et al.*, 2014; Rizotto, 2017).

A transmissão do vírus pode acontecer horizontalmente por contato direto entre aves doentes e aves saudáveis e, também, por contato indireto através da contaminação de água, ração, cama e equipamentos (Arns & Zuanaze, 2009). Embora o vírus possa infectar o sistema reprodutor de perus e galinhas, não há relato de transmissão vertical nas infecções envolvendo os subtipos A e B. Por outro lado, em um estudo desenvolvido por Shin *et al.* (2002b) foi sugerido que o subtipo C pode causar transmissão vertical em perus. Fatores ambientais como alta densidade no local de criação, má qualidade do ar atmosférico e clima seco aumentam a chance de transmissão do vírus (Arns & Zuanaze, 2009). A disseminação do vírus

da África para o continente europeu supôs que as aves silvestres migratórias têm importância na transmissão do vírus (Stuart, 1989).

O primeiro relato do aMPV ocorreu no final da década de 70 na África do Sul aparecendo inicialmente em perus e depois em galinhas (Buys & Du Preez, 1980; Buys *et al.*, 1989). Logo depois, o vírus apareceu no Reino Unido em 1985 (Anon, 1985). O aMPV já foi encontrado em toda Europa (Hafez *et al.*, 2000), Oriente Médio (Abdel-Azeem *et al.*, 2014), África (Owoade *et al.*, 2008; Hutton *et al.*, 2016), Ásia (Owoade *et al.*, 2008) e América (Cook *et al.*, 1999a; Rivera-Benitez *et al.*, 2014). Com exceção da Oceania, todos os continentes do mundo já relataram a presença do vírus (Rahimi, 2011). A literatura descreve que a maioria dos aMPV detectados no mundo são do subtipo A e B, sendo que o subtipo B possui maior prevalência em relação ao subtipo A (Banet-Noach *et al.*, 2005; Jones, 2010). O subtipo C foi detectado pela primeira vez em perus nos Estados Unidos em 1996 (Cook *et al.*, 1999a). Posteriormente, esse subtipo também foi identificado na Europa (Toquin *et al.*, 2006) e na Ásia (Lee *et al.*, 2007; Wei *et al.*, 2013). Até o momento, o subtipo D foi relatado somente em perus na França (Bäyon-Auboyer *et al.*, 2000).

No Brasil, o primeiro isolamento do aMPV foi realizado por Arns & Hafez (1995), antes da introdução da vacina no país, com amostras de matrizes de galinhas. Posteriormente, foi realizado o sequenciamento do gene G desse vírus e ele apresentou 99% de similaridade com o subtipo A europeu, sendo este também classificado como subtipo A (Dani *et al.*, 1999). Em 2007, Chacón *et al.* (2007) detectaram pela primeira vez o subtipo B no Brasil. Até o momento, só há relato dos subtipos A e B em nosso território. Destes, o subtipo B apresenta maior prevalência nos planteis avícolas em relação ao A (Chacón *et al.*, 2011a; Felipe *et al.*, 2011). Pressupõe-se que no Brasil há pelo menos duas subpopulações do subtipo B (Villarreal *et al.*, 2009).

As células alvo do aMPV são as células do sistema respiratório. A replicação do vírus ocorre no citoplasma das células epiteliais dos seios nasais, laringe e traqueia, levando à perda dos cílios no epitélio e permitindo a invasão de patógenos secundários no hospedeiro (Jones & Rautenschlein, 2013). A coinfeção bacteriana de agentes como *Escherichia coli* (Al-Ankari *et al.*, 2001), *Bordetella avium* (Jirjis *et al.*, 2004), *Ornithobacterium rhinotracheale* (Garmyn *et al.*, 2009) e *Mycoplasma gallisepticum* (Naylor *et al.*, 1992) aumentam as manifestações clínicas e a morbidade da doença. Em alguns estudos de infecção experimental, foi possível

isolar o aMPV em órgãos do sistema respiratório inferior como pulmões e sacos aéreos (Cook *et al.*, 1993b; Catelli *et al.*, 1998; Van de Zande *et al.*, 1999). Alguns autores verificaram a replicação do vírus no sistema reprodutor das aves. Em machos, já foi registrada a presença do aMPV em testículos associada à baixa fertilidade das aves (Villarreal *et al.*, 2007a). Já em poedeiras, foi observado regressão de ovário e de oviduto (Cook *et al.*, 2000), queda na produção de ovos e aumento na incidência de ovos com casca deformada (Sugiyama *et al.*, 2006). Também há relatos da detecção do vírus em outros locais como glândula de Harder (Khehra & Jones, 1999), baço, tonsila cecal e bursa de Fabricius (Aung *et al.*, 2008). As aves infectadas eliminam o vírus pelas excretas (Hess *et al.*, 2004).

O vírus está presente no trato respiratório das aves de quatro a seis dias antes do aparecimento das manifestações clínicas (Ferreira *et al.*, 2017). Em galinhas, o papel do aMPV como patógeno primário é questionado e a infecção nem sempre pode estar associada ao aparecimento das manifestações clínicas da doença. Por esta razão, a infecção em galinhas pode passar despercebida ao menos que se desenvolva a SHS (Jones, 1996; Jones & Rautenschlein, 2013). A SHS geralmente está acompanhada de um agente patogênico secundário levando à exacerbação dos quadros clínicos respiratórios em galinhas (Droual & Woolcock, 1994). O vírus associado à SHS causa nas galinhas apatia, exsudato ocular e nasal, inchaço infra e periorbitário, tosse, espirros, torcicolo, opistótono (Jones & Rautenschlein, 2013; Umar *et al.*, 2016; Ferreira *et al.*, 2017). A morbidade e a mortalidade são baixas, não excedendo 10% e 2% respectivamente (Cook, 2000).

As lesões em galinhas são mais leves e apresentam menor duração do que as observadas em perus (Jones & Rautenschlein, 2013). As principais lesões observadas em galinhas são edema e exsudato purulento no tecido subcutâneo da cabeça, pescoço e barbela. Também pode ocorrer edema dos seios infraorbitários (Umar *et al.*, 2016; Ferreira *et al.*, 2017). As alterações histopatológicas encontradas no epitélio respiratório incluem perda dos cílios e infiltração inflamatória de submucosa.

O diagnóstico das infecções por aMPV não pode ser fundamentado apenas na observação clínica, uma vez que suas manifestações clínicas não são específicas. Sendo assim, o seu diagnóstico é baseado em testes laboratoriais como isolamento viral, detecção do genoma viral e detecção de anticorpos específicos. O isolamento do aMPV em galinhas é mais difícil do que em perus (Jones, 1996). Em

galinhas com quadros clínicos severos, o isolamento do vírus se torna mais difícil, possivelmente devido à presença de agentes patogênicos secundários (Jones & Rautenschlein, 2013). O melhor material para o isolamento são secreções oculares e nasais e, também raspado de seio nasal das aves infectadas. É importante que se obtenha este material ainda no início da infecção (Worthington *et al.*, 2003). O isolamento viral pode ser feito em cultivos celulares, ovos embrionados SPF e em TOC.

O diagnóstico molecular do aMPV tem sido muito utilizado, uma vez que oferece resultados mais rápidos que o isolamento viral. A reação em cadeia da polimerase via transcriptase reversa (Reverse transcription polymerase chain reaction - RT-PCR) é utilizada para a detecção do genoma do aMPV com base na sequência das proteínas F, G, M e N (Aung, 2007). Para a diferenciação dos subtipos do vírus, foram desenvolvidos ensaios baseados nas sequências do gene G (Cavanagh *et al.*, 1999). A reação em cadeia da polimerase quantitativa via transcriptase reversa (Quantitative reverse transcription polymerase chain reaction - qRT-PCR) tem mostrado bons resultados para a detecção, diferenciação e quantificação dos quatro subtipos de aMPV (Guionie *et al.*, 2007).

A detecção de anticorpos para aMPV é usada para avaliar a resposta imune das aves seja à vacinação ou ao desafio de campo. São métodos utilizados para detecção de anticorpos o teste de imunofluorescência indireta (IFI) (Baxter-Jones *et al.*, 1989), teste de imunodifusão (Gough & Collins, 1989), teste de vírus neutralização (VN) (Williams *et al.*, 1991) e ensaio imunoenzimático (Enzyme linked immunosorbent assay - ELISA) (Toquin *et al.*, 1996). Destes, o ELISA é o mais utilizado, uma vez que os testes são rápidos, específicos, exigem um pequeno volume de soro e permitem o processamento de muitas amostras ao mesmo tempo (Brown *et al.*, 2006). Os *kits* de ELISA disponíveis comercialmente são indiretos e fazem a detecção de anticorpos específicos somente para os subtipos A e B.

A prevenção e o controle do aMPV em granjas são feitos por boas práticas de manejo na criação das aves e o estabelecimento de programas de biossegurança na propriedade. Apesar da infecção pelo vírus não poder ser tratada diretamente, o uso de antibióticos pode ajudar a controlar infecções bacterianas secundárias que normalmente estão envolvidas no curso da doença. A imunidade materna não confere proteção contra o vírus, nem interfere no sucesso da vacinação (Naylor *et al.*, 1997). Uma ferramenta que se tem mostrado eficiente no

controle da doença é a vacinação. A vacinação, se administrada de forma correta, confere excelente proteção nas aves comerciais (Cook, 2009).

O primeiro protótipo de vacina para aMPV surgiu após a descoberta do vírus na África do Sul (Buys *et al.*, 1989). O vírus isolado de perus foi atenuado após passagens seriadas em ovos embrionados. Depois, quando o vírus foi detectado na Europa, a vacina passou a ser desenvolvida por vários grupos de pesquisa. As tentativas de atenuação do vírus foram por cultivos celulares, passagens em ovos embrionados e em TOC (Cook, 2009). Atualmente, estão disponíveis comercialmente vacinas vivas atenuadas e inativadas do vírus.

As vacinas vivas atenuadas demonstraram estimular tanto a imunidade sistêmica quanto a imunidade local no sistema respiratório (Khehra & Jones, 1999). Geralmente a sua administração ocorre via óculo-nasal, através de água de bebida ou por spray (Ganapathy *et al.*, 2010). As vacinas dos subtipos A e B protegem contra o subtipo C, porém, as vacinas do subtipo C não protegem contra os subtipos A e B (Cook *et al.*, 1999a).

Atualmente no Brasil são comercializadas vacinas vivas atenuadas e inativadas de aMPV dos subtipos A e B. Alguns estudos demonstraram que as vacinas existentes no país não protegem totalmente as aves contra novas cepas circulantes do vírus (Chacón *et al.*, 2007; Villarreal *et al.*, 2009). Uma hipótese é que podem surgir mutantes de escape do vírus para os quais a vacina confere proteção insuficiente (Cecchinato *et al.*, 2008). Outros fatores que levam às falhas vacinais são atenuação exacerbada ou insuficiente da cepa vacinal e diferença genética entre as cepas de campo e as cepas vacinais (Cook, 2009).

3.2. Vírus da Bronquite Infecciosa das Galinhas (VBI)

O vírus da bronquite infecciosa das galinhas (VBI) pertence à ordem *Nidovirales*, família *Coronaviridae*. Essa família viral é dividida em duas subfamílias *Coronavirinae* e *Torovirinae*. Dentro da subfamília *Coronavirinae* existem quatro gêneros: *Alphacoronavirus*, *Betacoronavirus*, *Gammacoronavirus* e *Deltacoronavirus*. O *Alphacoronavirus* e *Betacoronavirus* são gêneros que acometem mamíferos. Os *Gammacoronavirus* são encontrados em aves, com

exceção do coronavírus de baleia beluga (Mihindukulasuriya *et al.*, 2008). O gênero *Deltacoronavirus* está relacionado com aves e suínos (Woo *et al.*, 2010; Woo *et al.*, 2012). O VBI pertence ao gênero *Gammacoronavirus*, dentro da subfamília *Coronavirinae*.

O genoma do VBI é formado por RNA de fita simples, sentido positivo, não segmentado, com cerca de 27,6 kb de comprimento (Bournsnell *et al.*, 1987). O seu envelope viral apresenta proteínas em forma de espículas que circundam o vírus externamente, conferindo o aspecto de coroa quando observado em microscopia eletrônica (Caron, 2010). As principais proteínas estruturais são: a proteína de espícula (*spike* - S), a proteína de envelope (E), a proteína de membrana (M) e a proteína de nucleocapsídeo (N).

A porção S1 é responsável por induzir anticorpos neutraizantes (Cavanagh, 2007). A proteína E é essencial para a formação de partículas de vírus, a proteína M é exposta a 10% na superfície do vírus externo; A proteína N envolve o genoma de RNA de sentido positivo de cadeia simples para formar a ribonucleoproteína (Lai & Cavanagh, 1997; Jackwood e de Wit, 2013). O VBI tem uma enorme capacidade de mudar tanto por mutação espontânea quanto por recombinação genética (Jackwood & De Wit, 2013).

O VBI pode manter a sua estrutura infectante no ambiente por dias, principalmente em regiões de temperaturas baixas. Exsudato traqueal seco e tecidos de aves infectadas se conservados em refrigeração, mantêm a viabilidade do vírus por dias. Em longo prazo, recomenda-se o armazenamento do vírus à temperatura de -80°C. A inativação do vírus ocorre após 15 minutos a 56°C ou por 90 minutos a 45°C. O pH ácido, cerca de 3,0, leva à queda na infectividade do vírus. Além disso, o VBI é considerado sensível à maioria dos desinfetantes, como o clorofórmio e a formalina (Jackwood & De Wit, 2013).

O isolamento e a propagação do VBI podem ser feitos em embriões SPF, cultivos celulares e cultivo em TOC. O VBI tem boa propagação em embriões de galinhas SPF quando inoculado na cavidade alantoide. As alterações encontradas nos embriões infectados variam de acordo com a dose inoculada. Os principais efeitos encontrados são nanismo, enrolamento, hemorragia e morte embrionária. Outro achado é a presença de uratos nos rins do embrião. Fatores como a idade do embrião e patogenicidade da cepa inoculada influenciam na gravidade das lesões e na mortalidade (Jackwood & De Wit, 2013). Geralmente, são utilizados para a

inoculação ovos com embriões com 10 dias de idade. O título máximo do vírus é alcançado em dois dpi. Em amostras que não se adaptam à ovos embrionados, é necessário que se faça mais passagens sucessivas nos ovos (Di Fabio & Buitrago, 2009).

Para o isolamento do VBI em cultivos celulares é necessário que se faça a adaptação da cepa na célula para induzir efeito citopático. O número de passagens virais nas linhagens celulares pode variar de acordo com o sorotipo do VBI (Jackwood & De Wit, 2013). Já foi relatada a propagação do vírus em células de rim de embrião de galinha (*Chicken embryo kidney* - CEK) (Otsuki *et al.*, 1979; Zegpi *et al.*, 2017), CER (Ferreira *et al.*, 2003), HeLa (Chen *et al.*, 2007) e VERO (Brandão *et al.*, 2012). Os efeitos citopáticos encontrados são arredondamento celular e formação de sincícios (Liu *et al.*, 2001).

A utilização do cultivo em TOC pode ser útil para o isolamento, titulação e sorotipagem do VBI. A presença de VBI em amostras de campo deve ser confirmada por outro teste específico para o vírus, pois outros agentes patogênicos também podem induzir a ciliostase (Jackwood & De Wit, 2013). A ciliostase é observada cerca de três a quatro dias após a inoculação, porém este período pode variar de acordo com a cepa viral e a dose de inoculação. (De Wit, 2000).

Anteriormente, a espécie *Gallus gallus* era a única espécie aviária naturalmente infectada pelo VBI e na qual o vírus causava doença (Jackwood & De Wit, 2013). Entretanto, há evidências que o VBI tem um alcance de hospedeiro mais amplo do que se pensava anteriormente, não apenas se limitando à ordem Galliformes (Cavanagh, 2007). O vírus já isolado em faisões (*Phasianus colchicus*) com quadros clínicos respiratórios, queda na produção de ovos de nefrite (Gough *et al.*, 1996). O vírus já foi detectado em várias espécies de aves silvestres (Jonassen *et al.*, 2005; Hughes *et al.*, 2009; Tarnagda *et al.* 2011; Domanska-Blicharza *et al.* 2014). No Brasil, o vírus já foi isolado de pombos (*Columba livia*) (Felippe *et al.*, 2010) e aves de cativeiro (Cardoso *et al.*, 2011). Em um trabalho realizado por Martini *et al.* (2015) as cepas Massachusetts e BR-I foram inoculadas em camundongos. Os autores notaram que os camundongos da linhagem Balb/C parecem ser mais susceptíveis à infecção por VBI do que os camundongos A/J. Anticorpos para VBI já foram encontrados em seres humanos com contato próximo à frangos de corte, mas não há relato de doença clínica no homem (Miller & Yates, 1968). Especula-se o potencial zoonótico do vírus, uma vez que outro coronavírus

como o vírus da Síndrome Respiratória Aguda Grave (*Severe Acute Respiratory Syndrome* - SARS) foi isolado de morcegos e transmitidos à humanos.

O vírus da bronquite infecciosa é altamente contagioso e se espalha rapidamente entre galinhas em uma criação (De Wit *et al.*, 1998). A doença apresenta período de incubação curto, cerca de aves susceptíveis colocadas recentemente galinhas infectadas geralmente desenvolvem manifestações clínicas dentro de 24-48 horas (Jackwood & De Wit, 2013). A transmissão do vírus pode ser por contato direto entre aves contaminadas por inalação ou ingestão de partículas do vírus. Além disso, ocorre também por contato indireto por aerossóis, fômites como vestuário e equipamentos. O vírus também é eliminado nas excretas das aves. Durante o estágio crônico da infecção por VBI, o vírus pode ser detectável por mais tempo e com mais facilidade no trato intestinal (tonsilas cecais ou suabe de cloaca) do que no sistema respiratório (De Wit, 2000). Todas as idades são susceptíveis ao vírus, mas a doença é mais grave em aves jovens, levando em muitos casos à mortalidade. Conforme a idade da ave vai aumentando, aumenta-se a resistência aos efeitos da infecção (Jackwood & De Wit, 2013).

O primeiro relato do VBI no mundo foi feito por Schalk & Hawn (1931) em Dakota do Norte, EUA, referindo-se a uma doença altamente contagiosa em aves jovens com sintomas respiratórios. Os autores acharam alterações patogênicas no sistema respiratório superior das aves por este motivo a doença foi chamada de “Bronquite Infecciosa de Pintinhos”. Cinco anos depois, foi demonstrado que o agente causador desta doença era um vírus, denominado Vírus da Bronquite Infecciosa (VBI) (Beach & Schalm, 1936). Em 1937, Beuadette & Hudson (1937) fizeram o primeiro cultivo de bronquite infecciosa em ovos embrionados pela cavidade corioalantóide. Em 1956, Jungherr *et al.*(1956) encontraram diferenças antigênicas entre isolados de VBI obtidos nos estados de Massachusetts e Connecticut. Isso levou à compreensão de que existem diferentes sorotipos do vírus e que eles não se protegeram (Jackwood & De Wit, 2013). No mesmo ano, o vírus foi diagnosticado e isolado pela primeira vez na Holanda (Bijlenga *et al.*, 2004). A doença nefrítica relacionada ao VBI foi relatada pela primeira vez em 1962 por Winterfield & Hitchner (1962). A partir da década de 90, diversos sorotipos foram reportados no mundo como, por exemplo, California, DE072, Vic S, N2/75 e QX. Atualmente o vírus encontra-se distribuído em todos os continentes do mundo. Algumas variantes tem distribuição global, ao mesmo tempo em que outras estão

restritas à alguns países ou regiões (Cook *et al.*, 2012). Sabe-se que em algumas regiões do mundo os sorotipos do VBI evoluam de forma independente em relação ao resto do mundo em razão da sua posição geográfica isolada, como, por exemplo, Austrália e Nova Zelândia (Ignjatovic *et al.*, 2006).

No Brasil, o primeiro relato do VBI foi o isolamento de uma estirpe do sorotipo Massachusetts por Hipólito (1957). Esse sorotipo parece ter predominado no país até a década de 80 quando foi reportado o isolamento da variante Arkansas (Branden & Da Silva, 1986). Até 1989, a maioria dos isolados brasileiros pertenciam ao sorotipo Massachusetts (Mendonça *et al.*, 2009). Entretanto, alguns estudos epidemiológicos do vírus notaram a ocorrência de sorotipos antígenicamente diferentes do Massachusetts. Em 2007, Villareal *et al.* (2007b) identificaram isolados brasileiros inseridos em um cluster próximo ao genótipo D274, um vírus europeu não relacionado ao sorotipo Massachusetts. Montassier *et al.* (2008) avaliaram amostras coletadas de granjas da região Sul e Sudeste do Brasil. Neste estudo, 12 novos isolados brasileiro foram identificados com base no gene S1. Desses, cinco eram de origem vacinal de Massachusetts e sete foram classificados em quatro grupos brasileiros de VBI. Villarreal *et al.* (2010a) caracterizaram variantes em diferentes regiões do Brasil, detectou-se a variante BRAZIL (BR), além da variante 4/91, descrita anteriormente na Europa e até então inédita no Brasil. Outros autores (Felippe *et al.*, 2010; Chacón *et al.*, 2011b) também encontraram isolados que pertenciam ao grupo BR-I. Em 2013, Fraga *et al.* (2013) identificaram um novo grupo variante do vírus, o BR-II. Carranza *et al.* (2017) em um estudo com amostras coletadas de todas as regiões do Brasil no período de 2010 a 2015 observaram que a maior prevalência do genótipo BR-I em relação ao BR-II.

O vírus replica no sistema respiratório, urinário e reprodutivo. De acordo com o tropismo da cepa infectante, a doença pode ter apresentação clínica respiratória, renal, entérica e reprodutiva. Todavia, a forma clínica respiratória é mais comum da doença. As manifestações clínicas respiratórias podem ser tosse, espirros, exsudato seroso ou catarral nos seios nasais e traqueia, respiração ofegante e presença de estertores traqueais. A gravidade do quadro respiratório é influenciada por fatores como má qualidade do ar atmosférico, programas vacinais e presença de coinfeções por agentes secundários sejam eles virais ou bacterianos. Pequenas áreas de pneumonia podem ser observadas nos pulmões. Em casos de

infecção aguda pode ser encontrado aerossaculite acompanhado de exsudato caseoso amarelo nos sacos aéreos (Jackwood & De Wit, 2013).

As cepas nefropatogênicas de VBI são mais descritas em frangos de corte. As manifestações incluem apatia, diarreia e aumento do consumo de água. O tropismo do vírus pelo sistema reprodutor leva à queda de postura e alteração na qualidade dos ovos (Bande *et al.*, 2016). Já foi relatada a miopatia peitoral em galinhas infectadas pela cepa 793B, levando ao aparecimento de inchaço e palidez da musculatura peitoral, hemorragias e edema gelatinoso na superfície muscular. Verificou-se que a causa dessa lesão não é a replicação do vírus no músculo, mas sim a formação e deposição de complexos imunes nas paredes dos capilares dos músculos (Raj & Jones, 1997). O vírus já foi isolado em outros tecidos como proventrículo, duodeno, jejuno, fígado, baço, Bursa de Fabricius, tonsilas cecais, íleo e reto (Awad, 2014).

O VBI provoca alterações nos seios nasais e traqueia como edema, perda de cílios e infiltração por linfócitos. As cepas nefropatogênicas causam depósito de uratos e nefrite caracterizada por aumento e congestão dos rins (Bande *et al.*, 2016). Em fêmeas, o vírus pode causar hipoplasia glandular do oviduto e em machos a replicação viral nas células dos ductos eferentes leva à queda na fertilidade (Di Fabio & Buitrago, 2009).

A bronquite infecciosa das galinhas não apresenta manifestações clínicas patognomônicas. Sendo assim, é necessária a utilização de diagnóstico laboratorial para a confirmação da doença. Esse diagnóstico pode ser direto, quando baseado no isolamento viral (ovos embrionados e TOC) e através da detecção por testes moleculares, e também pode ser indireto por meio da detecção de anticorpos (Villarreal, 2010b).

Materiais como raspado traqueal ou o próprio tecido traqueal fresco são as melhores amostras para o isolamento do vírus especialmente nos sete primeiros dias de infecção nas aves. O isolamento deste material pode ser feito através de inoculação na cavidade alantoide de embriões SPF com nove dias de vida ou em TOC (Jackwood & De Wit, 2013). Os efeitos característicos do vírus nos embriões são nanismo, hemorragia, enrolamento e morte. A desvantagem do isolamento em ovos embrionados é a demora desse tipo de teste, uma vez que são necessárias pelo menos três passagens consecutivas nos embriões. Além dos embriões, o vírus também pode ser isolado em TOC de embriões SPF com 19 a 20 dias de incubação

(Villarreal, 2010b). A desvantagem deste teste é que a ciliostase também pode ser induzida por outros agentes infecciosos, portanto ele deve ser utilizado associado à outros testes de diagnóstico (De Wit, 2000).

Um teste molecular bastante utilizado para a detecção do VBI é qRT-PCR (Callison *et al.*, 2006). A vantagem deste teste é que muitas amostras podem ser examinadas em um curto período de tempo, além de determinar a quantidade de vírus na amostra. O PCR convencional também pode ser utilizado na detecção do vírus, porém, se amostra clínica analisada conter uma baixa quantidade de vírus, será necessário que se faça várias passagens em ovos embrionados para conseguir um resultado positivo (Jackwood & De Wit, 2013). Para o diagnóstico de VBI são utilizados o gene N e uma região que se localiza no final do genoma, a qual não codifica qualquer proteína, mas tem papel na replicação do genoma viral que é a região UTR (Di Fabio & Buitrago, 2009). Todavia, esses genes não permitem diferenciação entre novas cepas virais. O gene S1 é melhor para a classificação genotípica de novas cepas de VBI (Bande *et al.*, 2016).

Uma outra ferramenta de diagnóstico das infecções por VBI é a detecção de anticorpos específicos. Alguns fatores podem influenciar o diagnóstico através desse teste como a idade das aves no momento da infecção ou da vacinação, presença de anticorpos maternos no momento da infecção ou vacinação, número de aves amostras e reações cruzadas entre sorotipos (De Wit, 2000).

As medidas de controle e prevenção da bronquite infecciosa incluem um efetivo programa de biossegurança na granja, a implantação de boas práticas na criação das aves e o uso de programas vacinais. Ações como o sistema de alojamento “todos dentro todos fora” (*all-in all-out*), a limpeza e desinfecção dos galpões e equipamentos entre os lotes e, também, o controle do trânsito de pessoas e veículos na propriedade contribuem para a redução do nível de infecção na propriedade (Dhama *et al.*, 2014). Uma estratégia adequada para o controle do VBI é a utilização de cepas vacinais semelhantes às cepas encontradas na região. Em locais no qual não há vacinas disponíveis para as cepas predominantes, o uso de programas vacinais compostos por diferentes cepas tendem a induzir uma proteção maior e mais ampla contra os desafios da região. Geralmente, a taxa de sucesso da vacinação irá depender das diferenças genéticas entre os vírus vacinais e os vírus de campo (Awad *et al.*, 2014).

As vacinas vivas são administradas principalmente por spray ou água de bebida (Cavanagh & Gelb, 2008), mas para uma melhor vacinação é preferível vacinar intraocularmente ou intranasalmente. As vacinas vivas atenuadas de VBI são produzidas a partir de isolados virais patogênicos de campo através de passagens em ovos embrionados de galinhas SPF. A atenuação é definida como a falta de manifestações clínicas respiratórias associadas à doença em pintos após a inoculação (Bijlenga, 1960).

No início da década de 1950, a primeira vacina para VBI foi desenvolvida nos EUA usando a estirpe van Roekel M41 do sorotipo Massachusetts (Cook *et al.*, 2012). No início dos anos 60, a doença foi diagnosticada na Holanda, levando o país a produzir uma própria vacina feita pela estirpe H do sorotipo Massachusetts. A letra H representava Huyben, nome do proprietário da fazenda cujo vírus foi isolado. As vacinas produzidas pela Holanda foram chamadas de H120 e H52 (Bijlenga *et al.*, 2004). Essas duas vacinas foram comercializadas no mundo todo, sendo a H120 a mais utilizada. Até hoje, o sorotipo Massachusetts é o mais utilizado na vacinação para VBI. Em muitos países produtores de aves, ele também é o único sorotipo autorizado para vacinação (Jordan, 2017). A maioria das vacinas vivas atenuadas disponíveis comercialmente são derivadas de cepas virulentas, como a Massachusetts sorotipo M41 e as cepas holandesas H52 e H120. Conforme novos sorotipos e variantes foram surgindo em todo o mundo, novas vacinas foram produzidas para combater sorotipos de importância regional, como, por exemplo, Arkansas (Ark), Connecticut (Conn), Delaware (Del), Georgia98 (GA98), Georgia 08 (GA08) e Georgia 13 (GA13), 793/B, QX e Q1 (Jackwood, 2012).

No Brasil, a vacinação dos plantéis avícolas começou em 1979, quando o Ministério da Agricultura aprovou e licenciou a importação e a produção local da vacina viva com as cepas H120 e H52 do sorotipo Massachusetts. Um ano depois, vacinas inativadas das mesmas cepas foram introduzidas no país (Trevisol, 2014). Durante anos, a vacinação contra VBI no Brasil era realizada apenas com vacinas vivas atenuadas e inativadas do sorotipo Massachusetts (H120, D274, D207, H52 e Ma5). A partir de 2016, começou a ser comercializada no Brasil a vacina viva atenuada da cepa variante brasileira BR-I de VBI. Em um estudo realizado por Tatár-Kis (2016) foi realizada a vacinação simultânea das cepas vacinais BR-I e B48 em aves desafiadas com a estirpe 793B, observou-se boa proteção vacinal da vacina BR-I.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Amostras virais

Para a infecção experimental foi utilizada a amostra IBV/BRAZIL/2007/UNICAMP/810, isolada por Felipe *et al.*(2010) de suabe traqueal de galinhas da região Sudeste do Brasil com manifestações clínicas características de infecção por VBI. Esta amostra se agrupa junto ao genótipo BR-I (brasileiro) do VBI. A amostra de aMPV usada foi a STG-SHS-1439 , pertencente ao subtipo B. A amostra foi isolada de perus com sintomas de rinotraqueite no Laboratório Estadual de Stuttgart, Alemanha, após 16 passagens em células CER.

4.2. Propagação viral

A amostra viral de VBI foi isolada em ovos embrionados de galinhas SPF conforme descrito por Felipe *et al.*(2010). Após as passagens em ovos, coletou-se o líquido alantoide dos ovos para a confirmação da presença do vírus por PCR. Para isso, foram utilizados primers descritos na literatura por Bochkov *et al.* (2007), tendo como alvo de amplificação o gene S1. Além disso, também foram observadas lesões características da replicação do VBI como nanismo e enrolamento. As passagens em ovos embrionados foram repetidas até a décima passagem que foi a utilizada na inoculação das aves.

A amostra de aMPV foi propagada em linhagem celular CER cultivada em MEM, acrescida de 10% de soro fetal bovino (SFB) (Cripion®, Brasil) e incubadas a 37°C, observando-se efeitos citopáticos como formação de sincícios e arredondamento celular diariamente em microscópio óptico invertido Axiovert 100tm (Carl Zeiss®, Alemanha) até a quinta passagem. Para confirmar a presença do vírus foi realizado PCR com primers descritos por Naylor *et al.*(1997), com amplificação do gene G.

4.3. Titulação viral

Para a titulação do VBI, seis ovos embrionados SPF foram utilizados para cada diluição das amostras, inoculando-se 100 µl de suspensão viral por ovo. Foram feitas diluições seriadas graduais, aumentado 0,7 log a cada diluição. Nesta segunda titulação, observou-se que o título resultante foi próximo de $10^{4,8}$ EID₅₀ calculado pelo método de Reed & Muench (1938).

O aMPV foi propagado em CER até a quinta passagem. Foram realizadas leituras diárias até o 5º dpi em microscópio invertido para a observação do efeito citopático característico do vírus: áreas focais de arredondamento celular e formação de sincícios. O título viral do aMPV foi de $10^{4,4}$ TCID₅₀, calculado pelo método e Reed & Muench (1938).

4.4. Experimento *in vivo*

Foram utilizadas 150 aves de postura da linhagem comercial *White Leghorn*, SPF e machos. Aos 28 dias de vida, as aves foram inoculadas e divididas conforme do delineamento experimental do Quadro 1. As aves inoculadas e não inoculadas foram alojadas separadamente para evitar a contaminação cruzada e mantendo-se a mesma ambiência.

Quadro 1. Delineamento experimental dos grupos inoculados com aMPV e VBI.

Grupo experimental	Nº de aves	Inoculação via óculo nasal
A (Controle negativo)	36	0,2 ml MEM
B (aMPV)	38	0,2 ml de aMPV ¹
C (VBI)	38	0,2 ml de VBI ²
D (aMPV+VBI)	38	0,2 ml de aMPV ¹ + 200 µl de VBI ²

Títulos virais: 1: (aMPV): $10^{4,4}$ TCID₅₀; 2 (VBI): $10^{4,8}$ EID₅₀

4.5 Manifestações clínicas

Durante todo o período experimental foram observados e anotados diariamente manifestações clínicas como apatia, exsudato nasal, exsudato ocular, inchaço infraorbital, respiração ofegante, tosse e diarreia.

4.6. Detecção de anticorpos por ELISA indireto

A análise das concentrações de anticorpos específicos contra VBI e aMPV foi feita por ELISA indireto. Aos três, sete, 14, 21, 28 e 35 dpi coletou-se o sangue de cinco aves por grupo, sendo coletado o sangue das mesmas aves durante todo o período experimental. O sangue foi coletado por punção da veia braquial utilizando seringas e agulhas estéreis. Após a coleta, o sangue foi deixado em temperatura ambiente (TA) para retração do coágulo e separação do soro. Depois, o sangue foi centrifugado a 2500 x g durante 10 minutos a 24 °C e o soro obtido foi dividido em alíquotas de 50 µl e armazenado a -20 °C.

Para a detecção de anticorpos anti-VBI e anti-aMPV utilizou-se os *kits* de ELISA indireto Infectious Bronchitis Virus Antibody Test *Kit* (BioChek®, EUA) para VBI e Avian Rhinotracheitis Antibody Test *Kit* (BioChek®, Holanda) para aMPV seguindo as recomendações do fabricante. A leitura dos resultados foi obtida com base na densidade ótica (DO) determinada na leitora de absorbância ELx800 (Biotek®, EUA) no qual utilizou-se comprimento de onda de 405 nm. Os resultados foram calculados e interpretados através do programa BioCheck Software (BioChek®, EUA), que correlaciona a leitura das amostras à leitura dos controles, estabelecendo, a partir dessa correlação, a concentração de anticorpos e quais amostras foram positivas para os vírus.

A DO de cada amostra foi relacionada com os controles negativos e positivos testados, gerando relação amostra/positivo (A/P). Esta relação determina o ponto de corte ou valor de DO no teste que determina quais amostras são positivas

e negativas. Com base na relação A/P foram calculados os títulos de anticorpos das amostras.

4.7. Citometria de fluxo

Para a avaliação das populações celulares circulantes do sistema imunológico foi realizada a citometria de fluxo. Ao zero, três, sete, 14, 21, 28 e 35 dpi coletou-se o sangue de sete aves por grupo, sendo coletado o sangue das mesmas aves durante todo o período experimental. O sangue foi coletado por punção da veia braquial utilizando seringas e agulhas estéreis. Após a coleta, alíquotas de 1 ml de sangue foram colocadas em tubos contendo ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) como anticoagulante. O isolamento de células mononucleares ocorreu através de separação por gradiente de densidade utilizando Histopaque®1077 (Sigma-Aldrich®, EUA). O sangue foi diluído 1:1 em solução salina tamponada e fosfatada (PBS) com pH 7,4, ou seja, 1 ml de sangue total para 1 ml de PBS, para um volume final de 2 ml. Essa diluição do sangue total foi adicionada a um tubo cônico estéril de 15 ml contendo 1 ml de Histopaque. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 400 x g, por 30 minutos a 21°C. Com o auxílio de pipeta Pasteur, a camada de células mononucleares foi coletada e transferida para outro tubo de 15 ml. As células foram lavadas com 10 ml de PBS e centrifugadas a 250 x g por 10 minutos a 21°C. O sobrenadante foi descartado e o pellet de células foi lavado mais uma vez com 5 ml de PBS, com posterior centrifugação a 250 x g por 10 minutos a 21°C. O sedimento final foi ressuspensionado em 1 ml de PBS com SFB.

Os anticorpos primários utilizados (Quadro 2) foram adquiridos da Southern Biotechnology Associates Inc. (Birmingham, EUA). As amostras de sangue total foram tratadas segundo Stabel *et al.* (2000) com algumas modificações descritas a seguir. Incubou-se 50 µl de sangue total com os anticorpos específicos por 30 minutos a 37°C e, em seguida, fixou-se com paraformaldeído por 30 minutos a 4°C. Posteriormente, as amostras foram acondicionadas em tubos de citometria em volume final de 2 ml de PBS. As amostras foram analisadas no citômetro de fluxo FACSCalibur (Becton Dickinson, BD®, EUA) equipado com laser de 488 nm. As

fluorescências detectadas foram isotiocianato de fluoresceína (FITC), ficoeritrina (PE) e spectra red (SPRD) nos canais FL1, FL2 e FL3, respectivamente.

Quadro 2. Anticorpos primários utilizados na citometria de fluxo.

Anticorpos primários	Conjugação ou fluoróforo
Camundongo anti-galinha CD4	FITC
Camundongo anti-galinha CD8 α	FITC
Camundongo anti-galinha MHC de classe II	FITC
Camundongo anti-galinha TCR $\alpha\beta$ /V β 1	PE
Camundongo anti-galinha CD28	PE
Camundongo anti-galinha Kul-01	PE
Camundongo anti-galinha CD45	SPRD

As células analisadas (Quadro 3) foram caracterizadas por múltiplas marcações com diferentes anticorpos por amostra, sendo: CD4 (FITC) + TCR β 1 (PE) + CD45 (SPRD); CD8 α (FITC) + CD28 (PE) + CD45 (SPRD); Kul-01 (PE) + MHCII (FITC) + CD45 (SPRD).

Quadro 3. Células do sistema imunológico avaliadas com respectivos anticorpos.

Células	Anticorpos
Linfócitos T auxiliares (CD4 ⁺ TCR $\nu\beta$ 1 ⁻)	CD4/TCR $\nu\beta$ 1/CD45
Linfócitos T auxiliares de mucosas (CD4 ⁺ TCR $\nu\beta$ 1 ⁺)	CD4/TCR $\nu\beta$ 1/CD45
Linfócitos T citotóxicos de mucosas (CD4 ⁻ TCR $\nu\beta$ 1 ⁺)	CD4/TCR $\nu\beta$ 1/CD45
Linfócitos T auxiliares não ativados (CD8 ⁻ CD28 ⁺)	CD8 α /CD28/CD45
Linfócitos T citotóxicos (CD8 ⁺ CD28 ⁺)	CD8 α /CD28/CD45
Linfócitos T citotóxicos ativados (CD8 ⁺ CD28 ⁻)	CD8 α /CD28/CD45
Monócitos (Kul ⁺ MHCII ⁺)	Kul-1/MHCII/CD45
Monócitos supressores (Kul ⁺ MHCII ⁻)	Kul-1/MHCII/CD45
Células apresentadoras de antígenos [APCs] (Kul ⁻ MHCII ⁺)	Kul-1/MHCII/CD45

4.8. Avaliação da atividade ciliar traqueal (teste de ciliostase)

A avaliação da atividade ciliar do epitélio traqueal foi verificada pelo teste da ciliostase (parada do movimento ciliar). Aos três, sete, 14, 21, 28 e 35 dpi foi realizada a necropsia de três aves por grupo. A traqueia de cada ave foi dividida em três porções: cranial, medial e distal e, com auxílio de lâmina de bisturi, foram feitas em cada porção três, quatro e três secções transversais, respectivamente, com aproximadamente 2 mm cada, resultando um total de dez anéis traqueais. Em seguida, os anéis traqueais foram colocados em microplacas de cultura celular com 24 orifícios contendo MEM com SFB a 10% a 37°C. Os anéis foram examinados em microscópio óptico invertido Axiovert 100tm (Carl Zeiss®, Alemanha) sob o aumento de 40X para a observação dos movimentos ciliares (Darbyshire & Peters, 1985).

Em cada anel traqueal analisou-se quatro quadrantes e foi dado um escore variando de zero a quatro de acordo com os batimentos dos cílios. Os anéis que apresentaram movimentação ciliar contínua em todos os quadrantes foram classificados com escore zero e os anéis com ausência de movimentação ciliar em todos os quadrantes foram classificados com escore quatro (Cook *et al.*, 1999b) (Quadro 4).

Quadro 4. Escores utilizados para avaliação da atividade ciliar traqueal.

Escores	Integridade do epitélio traqueal
0	100% de atividade ciliar
1	75 a <100% de atividade ciliar
2	50 a <75% de atividade ciliar
3	25 a <50% de atividade ciliar
4	0 a <25% de atividade ciliar

4.9. Preparação das amostras para extração de RNA viral

4.9.1. Homogeneização dos tecidos

Fragmentos de traqueia e pulmão foram colocados em tubos de 2 ml livres de ribonuclease (RNase) e desoxirribonuclease (DNase) contendo esferas

magnéticas de cerâmica para homogeneização. O tubo utilizado foi o Matriz de lise do tipo Z (MP Biomedicals Europa®, França) e foi adicionado ao tubo 500 µl de MEM. Em seguida, colocou-se os tubos no equipamento Magna Lyser (Roche Applied Science®, Alemanha) e o mesmo foi ajustado para 6000 rpm por 15 segundos, realizando-se este processo duas vezes. Entre os passos de homogeneização, as amostras foram colocadas em gelo por 1 minuto para minimizar a degradação do RNA. Posteriormente, centrifugou-se os tubos a 10000 rpm por 10 minutos a 4 °C e o sobrenadante foi coletado para extração de RNA viral.

4.9.2. Suabes

Além dos órgãos, também foram coletadas amostras de suabes de seio nasal e cloaca. Para a coleta do material de seio nasal, foi feita uma incisão no órgão das aves com auxílio de lâmina de bisturi e, em seguida, foi feita a coleta na região. A obtenção do suabe cloacal foi feita pela introdução do suabe na cloaca da ave, forçando-o contra a mucosa intestinal de modo a se obter a maior quantidade possível de muco e excretas. Após a coleta, os suabes foram colocados em tubos identificados e acondicionados a -80 °C.

Para extração de RNA viral do material dos suabes, adicionou-se 500 µl de MEM ao tubo contendo os mesmos. Em seguida, homogeneizou-se em vórtex por 15 segundos e centrifugou-se a 8000 rpm por 2 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi coletado para extração de RNA viral.

4.10. Extração de RNA para quantificação viral por PCR em tempo real

Para a extração do RNA viral utilizou-se o método de extração por coluna em sílica com o *kit* QIAamp Viral RNA Mini QIACUBE *Kit* (Qiagen®, Alemanha), sendo a extração automatizada pelo equipamento QIAcube (Qiagen®, EUA). As amostras teciduais e o sobrenadante dos suabes foram extraídos utilizando o protocolo QIAamp Viral RNA do QIACUBE (Qiagen®, EUA). Após o término da

extração, foi realizada a quantificação do RNA no fluorímetro Quibit 2.0 (Invitrogen®, Life Technologies, EUA) para determinar a concentração do RNA extraído.

4.11. Quantificação relativa de RNA viral em PCR em tempo real

A partir do RNA viral extraído realizou-se a quantificação relativa dos vírus em diferentes órgãos. A reação de qRT-PCR foi baseada em sondas marcadas com fluorescência VIC para aMPV e FAM para VBI. As sequências dos oligonucleotídeos e sondas estão no Quadro 5.

Quadro 5. Sequências de oligonucleotídeos e sondas utilizadas para quantificação viral relativa de aMPV e VBI.

Vírus e Referencia	Gene alvo	Primers e sonda
aMPV/B Guionie <i>et al.</i> , 2007	G	<p><i>Fwd</i>: 5'- AATAGTCCTCAAGCAAGTCCTCAGA-3'</p> <p><i>Rev</i>: 5'- CTGTCGTAATTTGACCTGTTCTACT-3'</p> <p>Sonda: 5'-VIC- CTGGTGTTATCAGCCTTAGGCTTGACGC T-BHQ-3'</p>
VBI Callison <i>et al.</i> , 2006	UTR	<p><i>Fwd</i>: 5'-GCTTTTGAGCCTAGCGTT-3'</p> <p><i>Rev</i>: 5'-GCCATGTTGTCAGTGTCTATTG-3'</p> <p>Sonda: 5'-FAM- CACCACCAGAACCTGTCACCTC-BHQ-3'</p>

Para a reação de qRT-PCR utilizou-se o *kit* QuantitecProbe RT-PCR (Qiagen®, EUA) em volume de 12,5 µl contendo 6,25 µl de Master Mix, 0,125 µl de enzima RT, 0,0625 µl of cada oligo (500 nM de cada oligonucleotídeo), 0,0125 µl de sonda (100 nM de sonda) e 2,5 µl de RNA.

O ciclo utilizado para VBI foi o mesmo descrito por Callison *et al.* (2006) que compreende 30 minutos a 50°C para a transcrição reversa, seguidos de 15 minutos a 95°C para a inativação da enzima RT e ativação da enzima Taq polimerase. Após esta etapa, são efetuados 45 ciclos: 1 segundo a 94°C (desnaturação), 1 minuto a 60°C (extensão e anelamento).

Já para aMPV utilizou-se o ciclo relatado por Guionie *et al.* (2007): 30 minutos a 48°C para a transcrição reversa, seguidos de 10 minutos a 95°C para a inativação da enzima RT e ativação da enzima Taq polimerase, e depois 45 ciclos: 15 segundos a 95°C (desnaturação) e 1 minuto a 60°C (extensão e anelamento). As reações foram realizadas no termociclador ABI 7500 (Applied Biosystems®, EUA).

Realizou-se a quantificação de RNA viral das amostras virais usadas na inoculação para determinar a curva padrão e o limite de detecção. Foram feitas oito diluições seriadas 1:100 das amostras virais de aMPV e VBI. O limite de detecção calculado foi de 40,13, ou seja, todas as amostras cujo cycle threshold (Ct) resultarem maior que 40,13 foram consideradas negativas. Os valores dos resultados de cada diluição foram confrontados com os valores de Ct para gerar um gráfico objetivando a análise da curva padrão. A eficiência do ensaio, estimada utilizando uma equação linear baseada no gráfico, resultou no valor de 96,12%.

O título das amostras, obtido após as reações, foi transformado em valores de log₁₀ possibilitando avaliar a persistência dos vírus ao longo dos dias pós infecção nos órgãos.

4.12. Avaliação de lesões macroscópicas

Aos três, sete, 14, 21, 28 e 35 dpi durante as necropsias das aves os órgãos do sistema respiratório foram avaliados quanto à presença de lesões macroscópicas características da infecção por aMPV e por VBI.

4.13. Histopatologia

Aos três, 14 e 28 dpi, fragmentos de seio nasal, traqueia e pulmão foram coletados e acondicionados em frascos previamente identificados contendo formol tamponado a 10% com pH 7,2 para a fixação do material. Posteriormente, as peças passaram pelos processos de desidratação, clarificação e inclusão em parafina histológica. Em seguida, os blocos de parafina contendo as peças foram seccionados a 5,0 μm em micrótomo rotativo e depois colocados em lâminas de vidro para posterior coloração pelo método de Hematoxilina Eosina (Luna, 1968).

4.14. Análise estatística

Os dados de citometria de fluxo foram submetidos à análise de variância (ANOVA) com pós-teste de Bonferroni. Para os demais dados como sorologia e quantificação viral, utilizou-se ANOVA e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5%.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Manifestações clínicas

Os dados referentes às manifestações clínicas das aves encontram-se no Quadro 6.

Quadro 6. Manifestações clínicas observadas nos grupos experimentalmente infectados.

Dpi	Grupo aMPV	Grupo VBI	Grupo aMPV+VBI
3 dpi	exsudato nasal	diarreia, apatia	apatia
7 dpi	respiração ofegante	respiração ofegante, apatia, diarreia	respiração ofegante, apatia, diarreia
14 dpi	-	diarreia	-

-: ausência de manifestações clínicas

As aves do grupo controle negativo não apresentaram manifestações clínicas. Durante o período experimental, manifestações como exsudato ocular, inchaço infraorbital e tosse não foram observados nos grupos.

No grupo inoculado somente com aMPV notou-se a presença de exsudato nasal aos três dpi e de respiração ofegante aos sete dpi. O vírus possui tropismo principalmente pelo sistema respiratório superior, o que levou ao aparecimento do exsudato e da respiração ofegante. Segundo Catelli *et al.*(1998), manifestações clínicas como exsudato nasal são observados entre quatro a 10 dpi em aves infectadas experimentalmente por aMPV. A severidade das manifestações clínicas pode variar de acordo com a dose e a virulência da cepa viral. As infecções naturais com aMPV são mais severas do que as infecções experimentais, sugerindo

que agentes secundários, como bactérias, desempenham um papel importante no processo da doença clínica (Turpin *et al.*, 2002).

Nos grupos VBI e aMPV+VBI notou-se que as aves apresentavam respiração ofegante. Além disso, as aves também apresentaram apatia aos três e sete dpi. O VBI apresenta como forma clínica mais comum quadros respiratórios como tosse, exsudato nos seios nasais e traqueia, espirros e respiração ofegante (Jackwood & De Wit, 2013). Estas manifestações clínicas aparecem devido à replicação do VBI no epitélio do sistema respiratório superior.

A diarreia foi um achado comum entre os grupos VBI e aMPV+VBI, sendo observada no grupo VBI até 14 dpi. Apesar de o VBI ser conhecido por replicar no sistema respiratório das aves, o vírus já foi detectado e isolado a partir de conteúdo intestinal de aves (Villarreal *et al.*, 2007b; Chacón *et al.*, 2014). A replicação do VBI nos enterócitos que constituem as vilosidades intestinais causa hipotrofia dos vilos levando à má absorção dos nutrientes pela ave, acarretando em diarreia (Saif, 1993).

Conforme as aves iam ficando mais velhas as manifestações clínicas iam desaparecendo. Quando não há maiores complicações, as manifestações clínicas da infecção por VBI tendem a desaparecer até 15 dpi (Di Fabio & Buitrago, 2009). Além disso, com o aumento da idade, as aves vão se recuperando da infecção naturalmente (Crinion & Hofstad, 1972).

5.2. Sorologia por ELISA indireto

De acordo com as recomendações do fabricante dos *kits* de ELISA utilizados neste estudo, as amostras com A/P igual ou superior a 0,5 para aMPV e 0,2 para VBI foram consideradas positivas. Baseado nisso, o grupo controle foi negativo em todas as datas de coleta para anticorpos anti-aMPV e anti-VBI. Os dados relacionados aos títulos de anticorpos anti-aMPV estão na Figura 1.

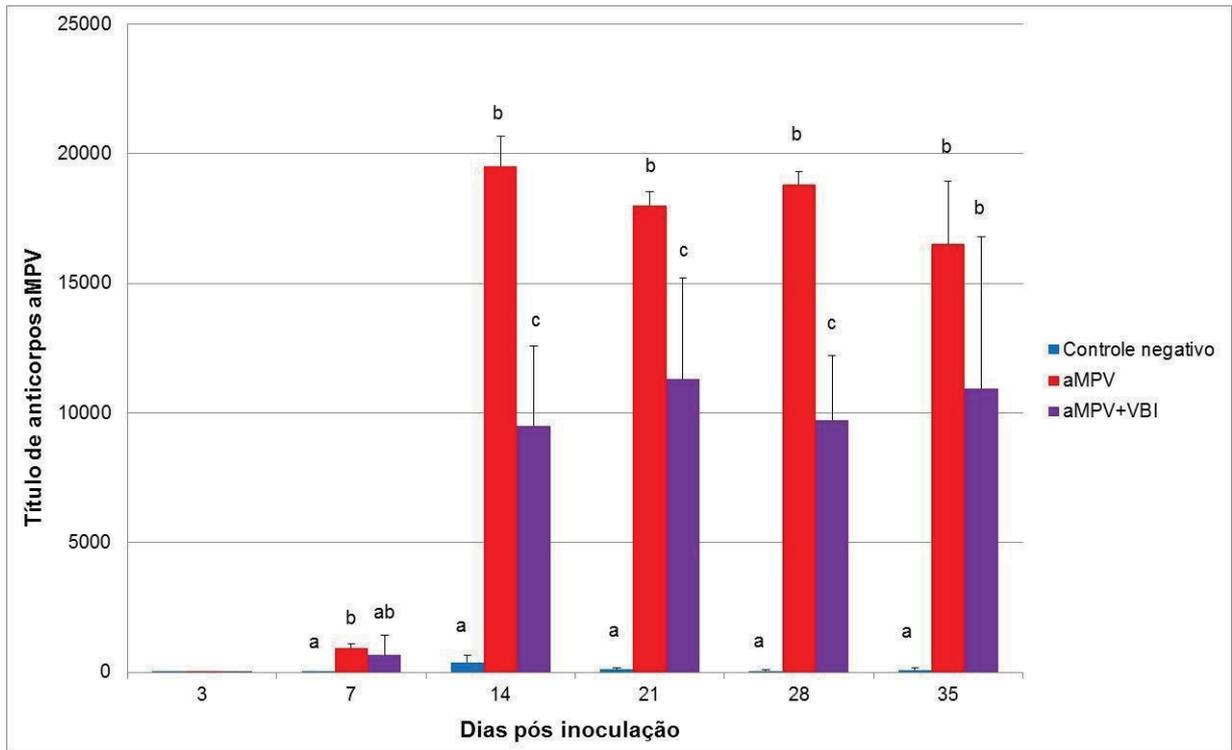


Figura 1. Títulos de anticorpos para aMPV detectados por ELISA indireto.

O grupo infectado somente com aMPV apresentou maiores títulos de anticorpos quando comparado ao grupo coinfestado. Estes achados são evidentes aos 14, 21 e 28 dpi, no qual houve diferença significativa ($P < 0,05$) entre os grupos. Isto está de acordo ao encontrado por Cook *et al.* (2001) no qual o grupo infectado com VBI mais aMPV apresentou redução de produção de anticorpos para aMPV em relação ao grupo infectado somente com aMPV.

Um dos fatores que pode ter levado aos resultados do grupo coinfestado é a interferência viral. A interferência viral é um mecanismo pelo qual a célula animal pode se defender contra a infecção viral. A infecção de um hospedeiro por um vírus pode afetar a infecção por um segundo vírus, isto é, as células infectadas por um vírus não permitem a multiplicação de um segundo vírus (Dianzani *et al.*, 1975). A competição dos vírus pela fixação no hospedeiro pode ocorrer por diferentes mecanismos. Um deles é a competição intracelular dos vírus pela maquinaria celular do hospedeiro utilizada para a replicação viral (Kimura *et al.*, 1976). O principal local de replicação do VBI e do aMPV é o sistema respiratório superior, o que confirma a hipótese que ocorreu interferência entre eles neste local. Por esta razão, o grupo coinfestado apresentou menor detecção de anticorpos em relação ao grupo aMPV.

Durante a infecção por aMPV a produção de anticorpos específicos para o vírus ocorre geralmente em duas semanas após a infecção (Catelli *et al.*, 1998), o que foi observado neste estudo. Observa-se, ainda, que a detecção de anticorpos para aMPV ocorreu até 35 dpi, porém, as manifestações clínicas nos grupos com o vírus foram observados somente até os sete dpi. Os anticorpos de aMPV podem ser encontrados em aves que não apresentam manifestações clínicas da doença, não havendo correlação entre a presença de anticorpos e a doença clínica, mas sim com a infecção pelo vírus (Ferreira *et al.*, 2017).

Os dados relativos aos títulos de anticorpos anti-VBI estão na figura 2.

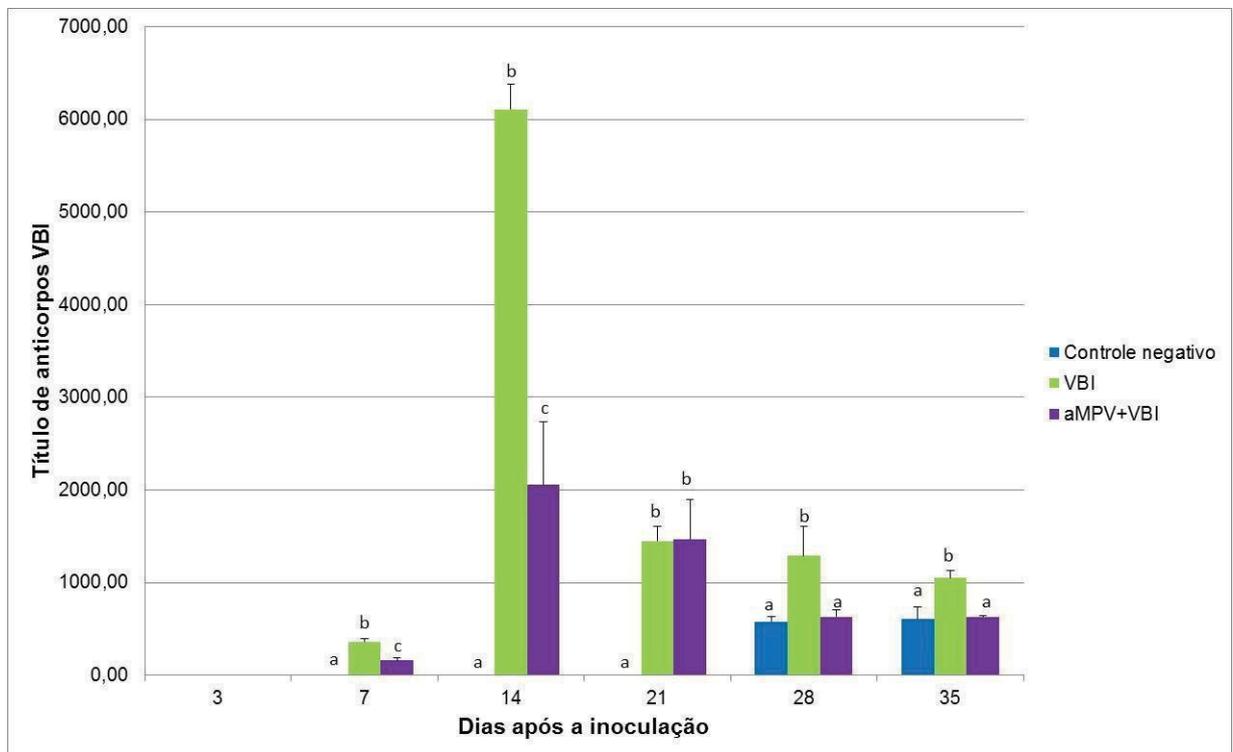


Figura 2. Títulos de anticorpos para VBI detectados por ELISA indireto.

O aparecimento de anticorpos para VBI ocorreu aos sete dpi. Nota-se diferença significativa ($P < 0,05$) entre o grupos VBI e aMPV+VBI somente aos 14 dpi. Com exceção do 21º dpi, nas demais datas de coleta o grupo infectado somente com VBI apresentou maiores títulos de anticorpos anti-VBI quando comparados ao grupo coinfestado e os anticorpos foram detectados até 35º dpi. Este comportamento também se apresentou na detecção de anticorpos anti-aMPV. Entretanto, ao contrário do aMPV, produção de anticorpos em todos os grupos inoculados foi reduzida conforme as aves ficaram mais velhas.

Segundo Cavanagh (2003), os resultados sorológicos pela técnica de ELISA, indicam que quando uma ave é inoculada com uma cepa virulenta de VBI, a resposta de anticorpos se inicia seis dias após a infecção, sendo o pico de anticorpos aos 21 dias e, em seguida, ocorre o declínio dos anticorpos. No caso deste estudo, o pico de resposta foi aos 14 dpi.

5.3. Citometria de fluxo

Observa-se na Figura 3, que os linfócitos T auxiliares não ativados de todos os grupos experimentais apresentaram-se reduzidos no 14^o dpi. A partir deste período, as populações celulares foram aumentando principalmente a do grupo coinfectado aos 21 dpi. O grupo infectado com VBI foi maior estatisticamente ($P=0,1$) aos 28 dpi em relação ao grupo controle negativo. O grupo inoculado somente com aMPV foi menor em relação aos demais grupos.

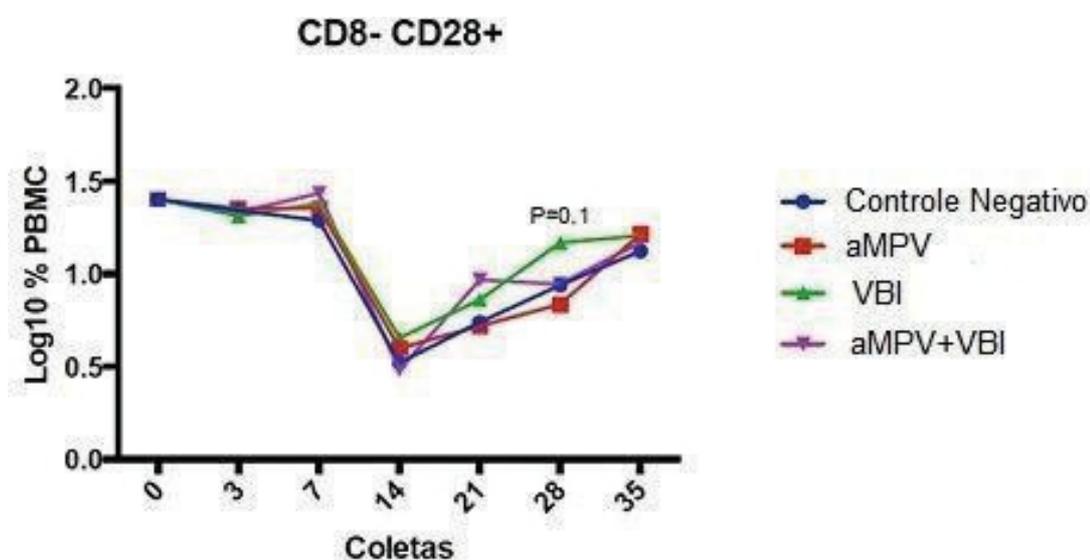


Figura 3 - Linfócitos T auxiliares não ativados (CD8-CD28+).

Os linfócitos T auxiliares (Figura 4), assim como os linfócitos T auxiliares não ativados, também apresentaram redução aos 14 dpi, sendo observado aumento

no grupo coinfectado no 21º dpi. Aos 21 dpi, o grupo aMPV+VBI teve um aumento de células e no 28º dpi as aves inoculadas com VBI tiveram um aumento de T auxiliares não ativados em relação aos demais grupos. O grupo inoculado somente com aMPV foi menor em relação aos demais grupos.

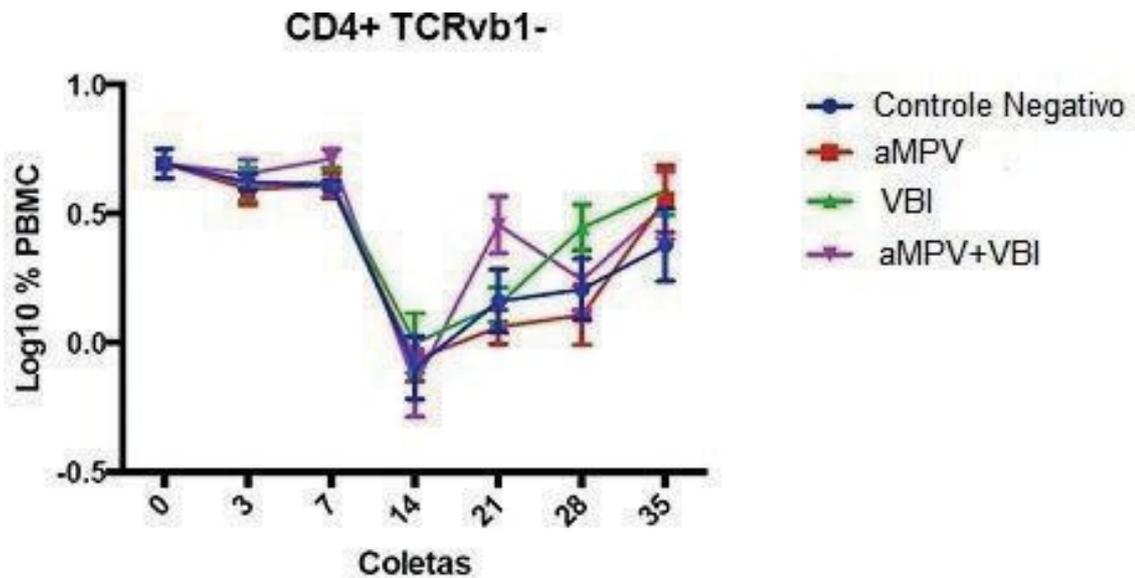


Figura 4 - Linfócitos T auxiliares (CD4+TCRvβ1-).

Tanto o linfócito T auxiliar ativado e não ativado apresentaram população de linfócitos semelhantes nos diferentes grupos até os 14 dpi, sendo que no 28º dpi o grupo VBI foi maior. Os linfócitos T auxiliares (CD4) no sangue periférico das aves são em grande parte células com o fenótipo CD4+TCRVβ1-. Estas células têm a função de organizar a resposta imune adaptativa e ativar linfócitos (Davison *et al.*, 2008). Linfócitos T CD4 que expressam a molécula TCRVβ1 (CD4+TCRVβ1+) têm tendência de migrarem para mucosas, onde são cruciais para a produção de IgA (Cihak *et al.*, 1991).

Na Figura 5 observa-se que todas as populações de linfócitos T auxiliares de mucosa também se mantiveram parecidas até os 14 dpi. Em seguida, ocorreu aumento no grupo coinfectado no 21º dpi e aos 28º dpi nas aves inoculadas com VBI em relação aos demais grupos. O grupo inoculado somente com aMPV foi menor em relação aos demais grupos.

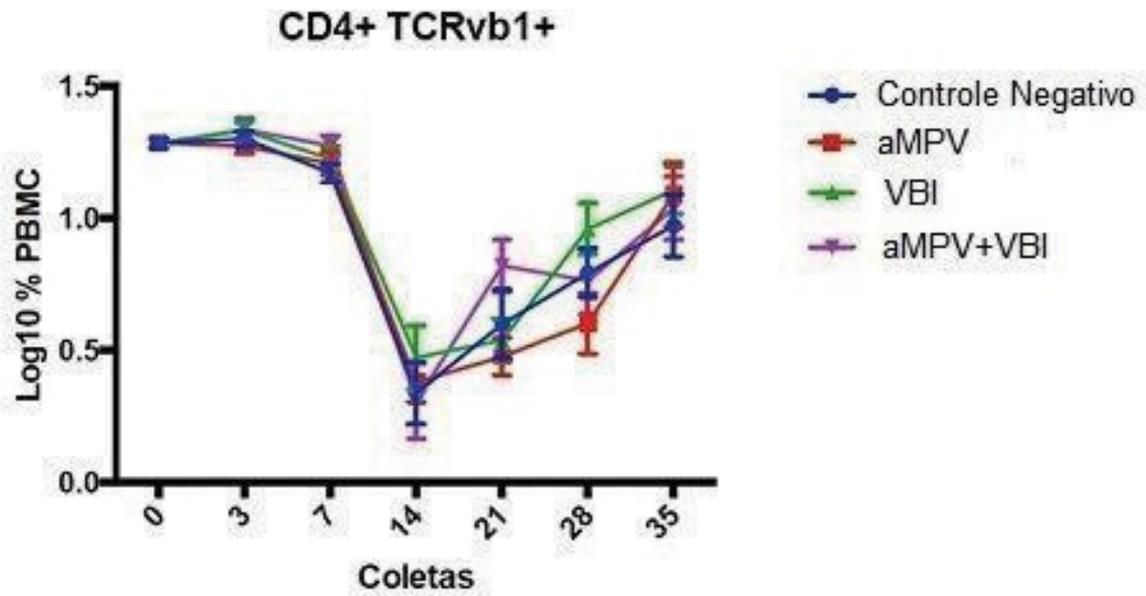


Figura 5 - Linfócitos T auxiliares de mucosa (CD4+TCRvβ1+).

As populações de linfócitos T citotóxicos (Figura 6) se mantiveram parecidas até os 14 dpi. Podemos observar que houve aumento das células aos 14 dpi.

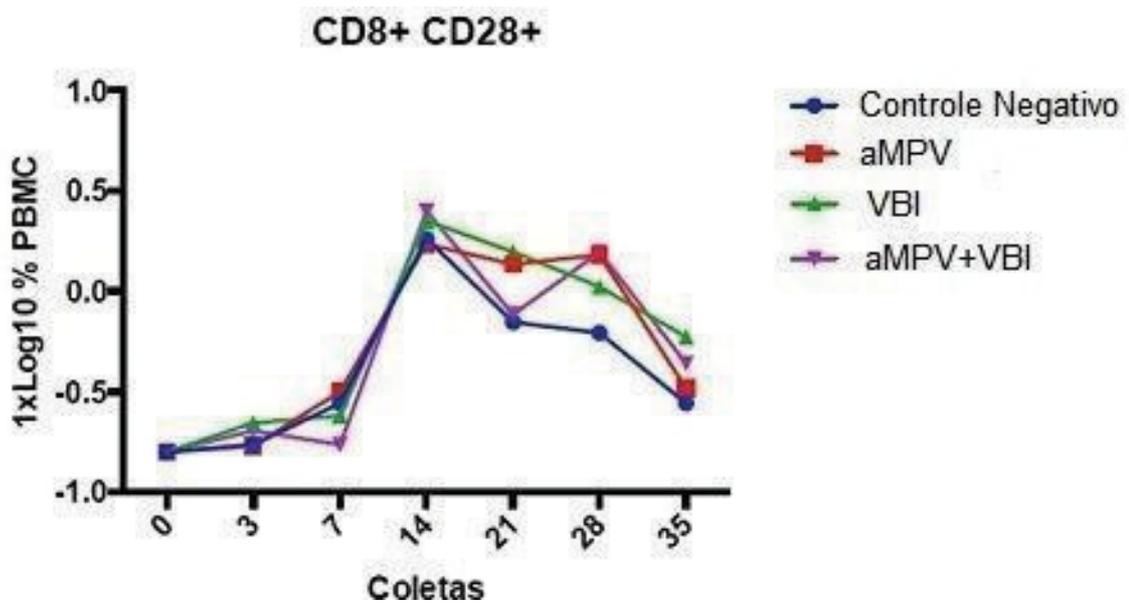


Figura 6 - Linfócitos T citotóxicos (CD8+CD28+).

Os linfócitos T citotóxicos (CD8) podem ser subdivididos de acordo com a expressão da molécula co-estimulatória CD28 em sua superfície. Os linfócitos T citotóxicos virgens, células de memória ou linfócitos em estado inicial de ativação apresentam o fenótipo CD8+CD28+, denominados linfócitos T citotóxicos. Outros linfócitos T também apresentam a molécula CD28 na sua superfície, sendo caracterizados pelo fenótipo CD8-CD28+ que são os linfócitos T auxiliares não ativados (Nabeshima *et al.*, 2002).

Nos linfócitos T citotóxicos de mucosas (Figura 7) houve diferenças mais precoces aos 7 dpi. Em seguida, houve redução das populações celulares aos 14 dpi.

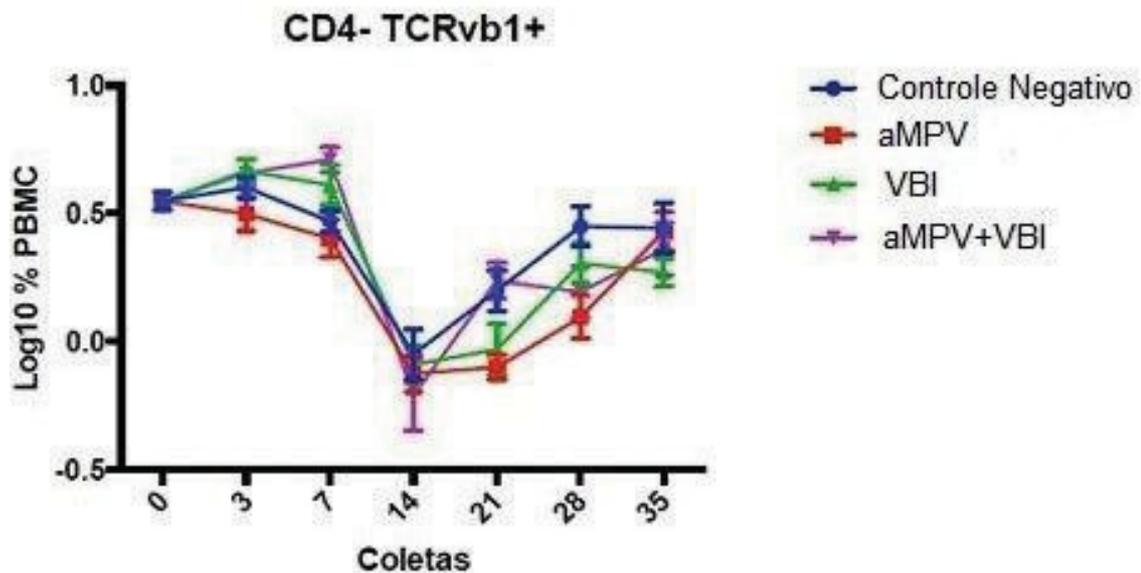


Figura 7 - Linfócitos T citotóxicos de mucosas (CD4-TCRV β 1+).

Outros linfócitos T, não-CD4, também apresentam a molécula TCRV β 1, sendo caracterizados pelo fenótipo CD4-TCRV β 1+, sendo denominados linfócitos T citotóxicos de mucosas. Estas células são também importantes para a imunidade de mucosa, principalmente com função de imunidade celular, ao invés de humoral (Lillehoj, 1994).

Observa-se na Figura 8, que os linfócitos T citotóxicos ativados apresentaram queda aos 14 dpi. O grupo infectado somente com VBI foi estatisticamente menor ($P=0,1$) em relação ao controle negativo aos 21 dpi.

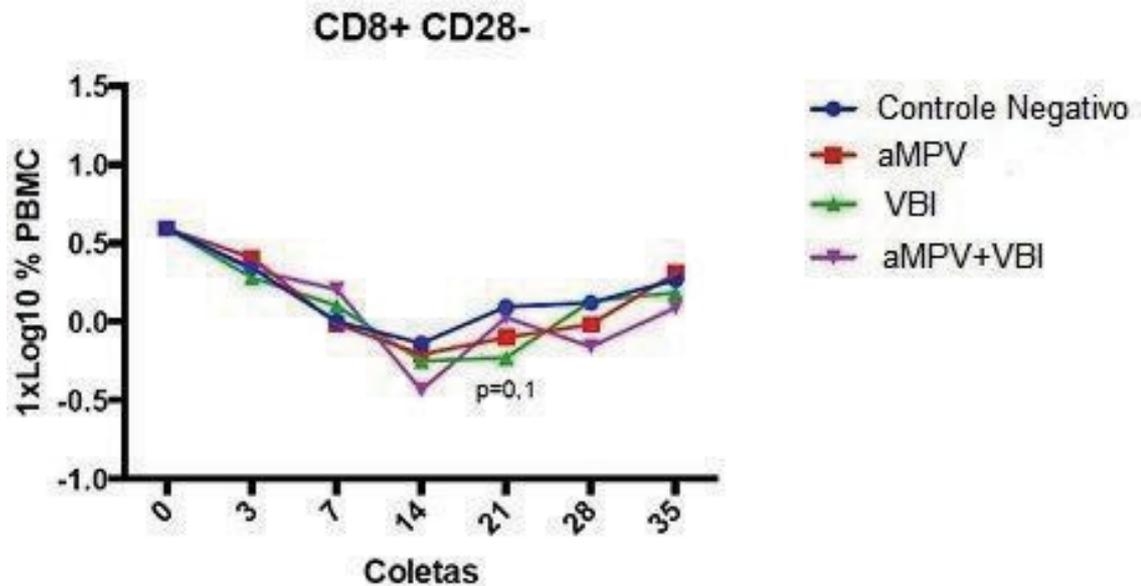


Figura 8 - Linfócitos T citotóxicos ativados (CD8+CD28-).

Os linfócitos T CD8 que passaram por processo prolongado de ativação perdem a expressão da molécula co-estimulatória CD28, sendo caracterizados pelo fenótipo CD8+CD28-. Estas células são chamadas de linfócitos T citotóxicos ativados. Estas células são terminalmente ativadas, sendo estritamente específicas para o antígeno-alvo (Nabeshima *et al.*, 2002; Pawelec *et al.*, 2004).

Os monócitos supressores apresentaram diferenças aos 7 dpi, principalmente o grupo infectado somente com VBI (Figura 9).

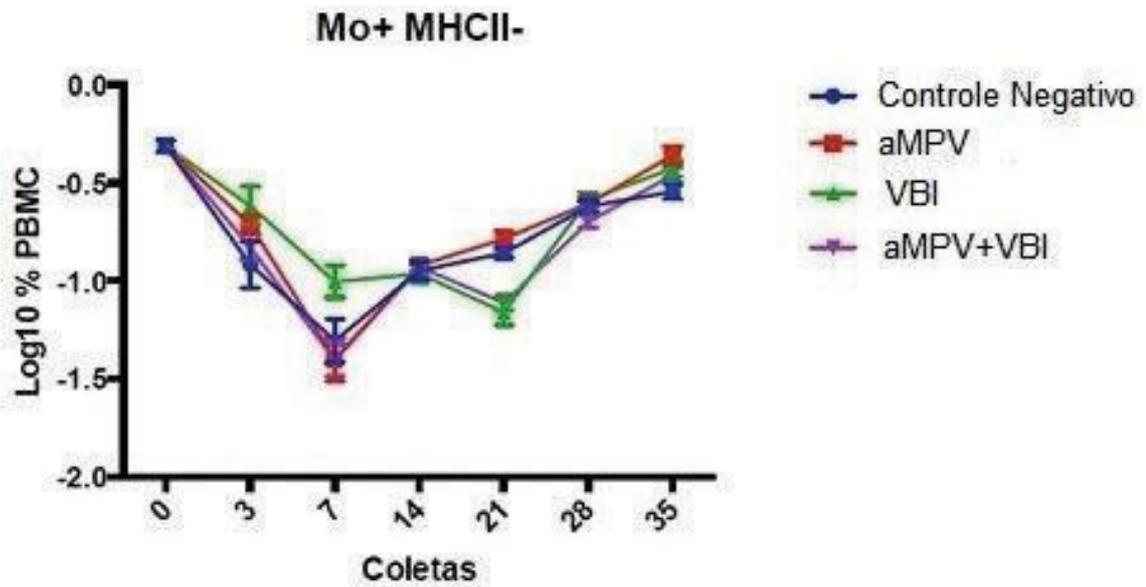


Figura 9 - Monócitos supressores (Mo+MHCII-).

Na figura 10, as populações de monócitos apresentaram diferenças aos 7 dpi, sendo o grupo coinfectado com maior número de células.

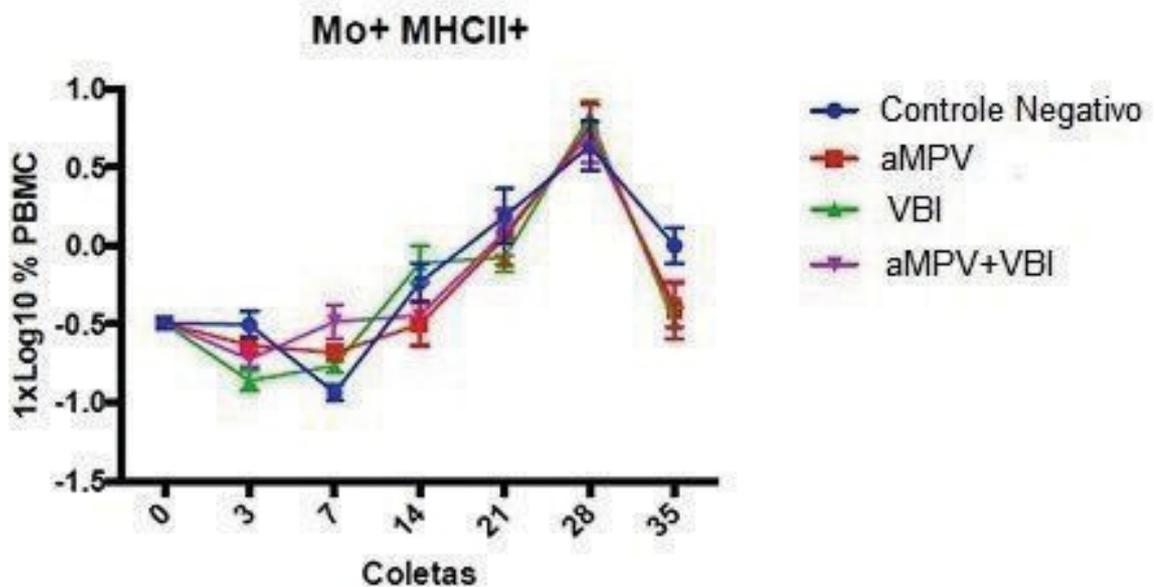


Figura 10 - Monócitos (Mo+MHCII+).

Os monócitos são células precursoras sanguíneas dos macrófagos, os quais são células fagocíticas e apresentadoras de antígenos. Estas células são

responsáveis por uma ligação entre a resposta imune inata e a resposta adaptativa. A capacidade de apresentar antígenos para os linfócitos não é exclusiva dos monócitos. Outras células como as células dendríticas e os linfócitos B podem também realizar esta função. Os monócitos que não expressam a molécula de MHCII na sua superfície apresentam atividade oposta à dos demais monócitos, inibindo atividade de linfócitos. Por esta razão, eles são denominados de monócitos supressores (Zuckermann & Husmann, 1996; Janeway *et al.*, 2001).

Observa-se na Figura 11, queda das populações de células apresentadoras de antígenos aos 14 dpi e aumento aos 28 dpi.

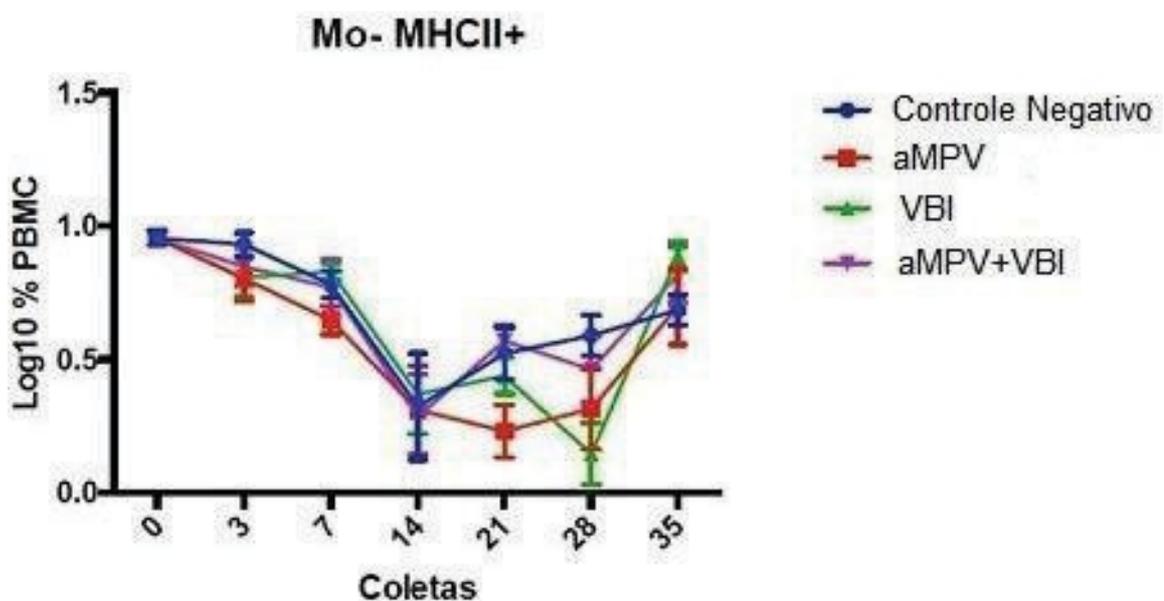


Figura 11 - Células apresentadoras de antígeno (Mo-MHCII+).

Todas as populações de células do sistema imunológico avaliadas no dia zero da infecção foram semelhantes nos quatro grupos experimentais. As populações de células linfoides em animais coinfectados se diferem das populações celulares nos animais infectados por apenas um patógeno (Beadling & Slifka, 2004; van der Sluijs *et al.*, 2006; Speschock *et al.*, 2007), o que foi comprovado neste presente estudo.

De acordo com a populações celulares analisadas neste estudo, a infecção por VBI causou maiores diferenças em relação aos demais grupos, incluindo o grupo coinfectado. De um modo geral, os grupos infectados por VBI

reduziram a população de células circulantes de forma mais acentuada que o grupo infectado por aMPV. Estes dados sugerem que a infecção por VBI provocou alterações nas populações celulares em momentos mais precoces, principalmente em monócitos supressores que são reguladores de resposta de linfócitos T, ou seja, as aves responderam mais intensamente à infecção.

Os desafios por agentes patogênicos são capazes de aumentar as células auxiliares e citotóxicas (Cebra, 1999; Kaneko *et al.*, 2004). Patógenos intracelulares como os vírus podem aumentar ou manter constantes os níveis de CD8+ enquanto CD4+ e as respostas por anticorpos podem ser aumentados por patógenos não-intracelulares (Corley & Giambone, 2002; Zekarias *et al.*, 2002). A redução da população de linfócitos nos grupos infectados por VBI podem caracterizar uma linfopenia nas aves (Feldman *et al.*, 2006). A redução de células TCRV β 1 no sangue se deve à saída das células para locais de infecção como a mucosa do sistema respiratório superior. Segundo Cihak *et al.*(1991) e van Ginkel *et al.*(2008), as infecções causadas por VBI causam aumento na secreção de IgA nos locais afetados com maior presença de linfócitos T auxiliares (CD4) no local de infecção, os quais são provavelmente portadores do receptor TCRV β 1. A infecção causada por aMPV também leva a aumento das populações de células CD8+ (Liman *et al.*, 2007; Cha, 2009; Rautenschlein *et al.*, 2011).

Os resultados encontrados no grupo coinfestado se justificam pela interferência viral do aMPV e do VBI. No hospedeiro infectado por dois vírus também podem ocorrer mudanças na permissividade ou no tropismo do vírus no tecido, alterações na replicação viral, alteração nos padrões de produção de progênie viral e alteração nas respostas imunológicas (Da Palma *et al.*, 2010). Em alguns casos, a multiplicação de ambos os vírus pode ser inibida (Wagner, 1960).

5.4. Avaliação da atividade ciliar traqueal (teste de ciliostase)

A replicação viral nas células do epitélio ciliado da traqueia causa ciliostase (perda dos movimentos ciliares). Por este motivo, o teste de ciliostase é utilizado para determinar os danos causados à traqueia pelos vírus.

Os resultados referentes ao teste de atividade ciliar nos diferentes grupos são apresentados no Quadro 7.

Quadro 7. Escores de ciliostase observados nos grupos experimentais aos três, sete, 14 e 21 dpi.

Dpi	aMPV	VBI	aMPV+VBI	Controle negativo
3	0	1	1	0
7	0	1	0	0
14	0	1	0	0
21	0	0	0	0

0 - 100% de atividade ciliar; 1 - 75 a <100% de atividade ciliar.

O grupo controle negativo e o grupo aMPV apresentaram escore zero, ou seja, houve a movimentação ciliar contínua em todos os quadrantes dos anéis traqueais. O grupo infectado somente com VBI apresentou escore 1, ou seja, cerca de 75 a <100% de atividade ciliar do 3^o ao 14^o dpi. Todavia, o grupo coinfectedo apresentou escore 1 somente aos 3 dpi.

Sabe-se que o VBI se replica na traqueia causando ciliostase nas aves. No entanto, nos grupos analisados as aves apresentaram escore baixo (1). O aMPV também causa ciliostase em aves no período de seis a dez dias pós inoculação (Cook *et al.*, 1991), porém isso não foi encontrado no grupo aMPV. Apesar das aves do grupo infectado apresentarem manifestações clínicas respiratórias, as amostras analisadas apresentaram movimentação ciliar em todas as idades.

Uma hipótese para estes resultados é o baixo número de aves analisadas (três) na ciliostase. Segundo De Wit *et al.*(2013) para se ter um resultado mais fidedigno o ideal que se faça a ciliostase de pelo menos 10 aves por grupo.

5.5. Quantificação relativa de RNA viral de aMPV e VBI em órgãos

Houve infecção das aves pelo VBI e aMPV como evidenciado pela sorologia e por qRT-PCR. Além disso, o RNA viral foi detectado em todos os órgãos

analisados. O grupo controle negativo não apresentou amostras positivas para os dois vírus estudados.

5.5.1. aMPV

Quando avaliado o seio nasal na qRT-PCR de aMPV, o grupo aMPV apresentou replicação viral até o 28º dpi. Todavia, o grupo coinfecado apresentou o vírus somente no 3º dpi (Figura 12).

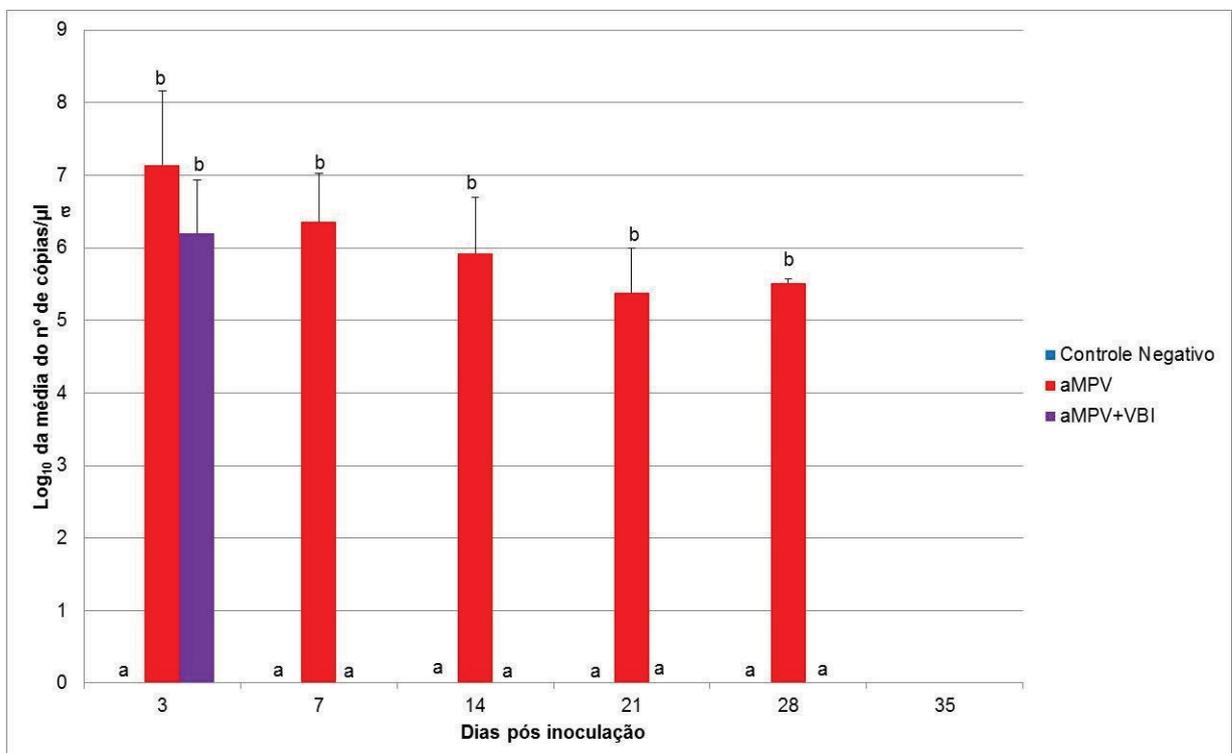


Figura 12. Quantificação relativa de aMPV por qRT-PCR em seio nasal.

Os principais locais de replicação do aMPV são o trato respiratório superior e a traqueia, sendo o seio nasal o local de maior replicação. O vírus pode ser detectado no seio nasal em 24 horas após a infecção (Cook *et al.*, 1991). Os dados referentes à replicação viral de aMPV na traqueia estão na Figura 13.

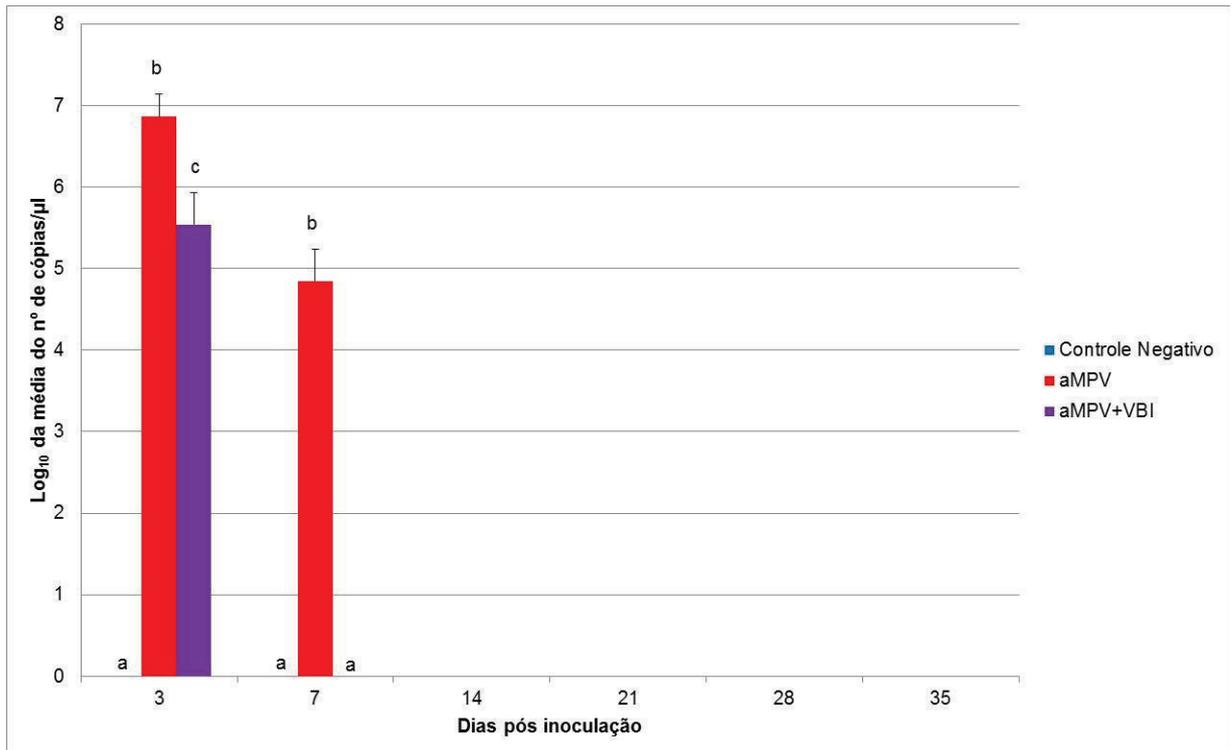


Figura 13. Quantificação relativa de aMPV por qRT-PCR em traqueia.

Podemos observar que houve replicação na fase inicial da doença, com detecção aos três e sete dpi, sendo que o vírus foi detectado no grupo coinfestado somente aos três dpi com diferença significativa ($P < 0,05$) em relação ao grupo aMPV. A replicação viral do aMPV também ocorre no citoplasma das células epiteliais ciliadas da traqueia das aves (Arns & Zuanaze, 2009). Na Figura 14 encontram-se os resultados de quantificação de aMPV em pulmão.

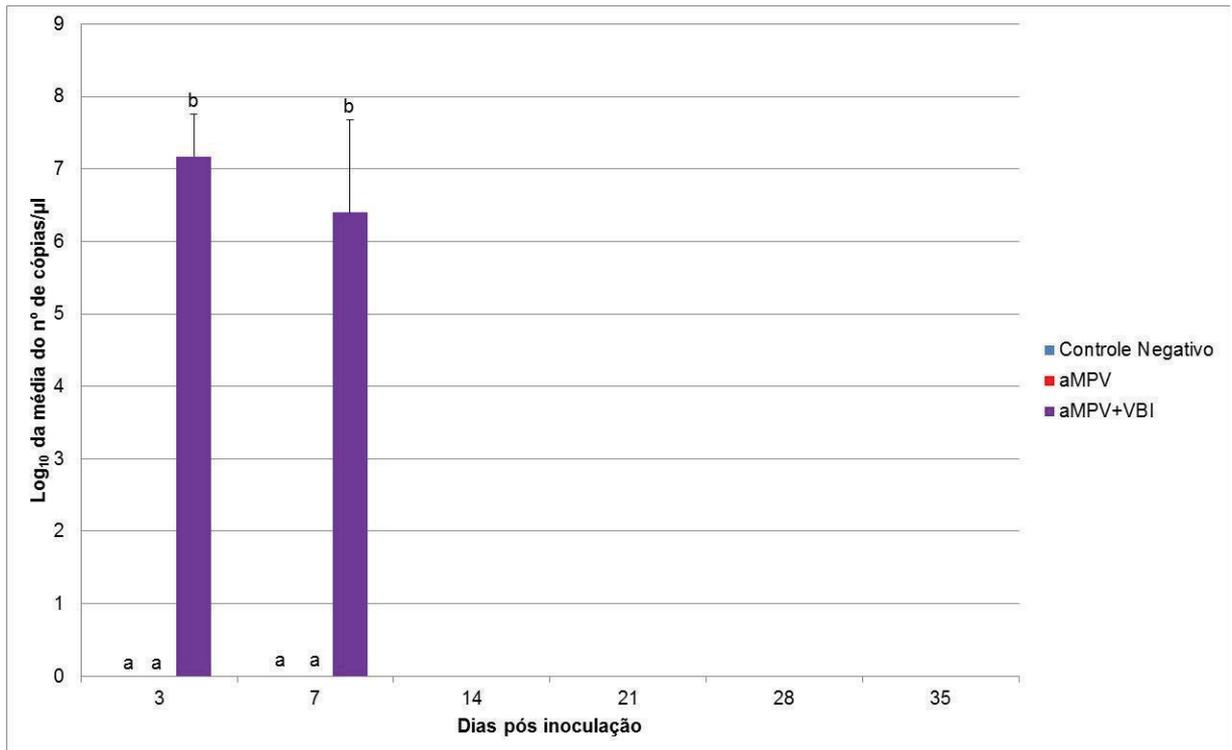


Figura 14. Quantificação relativa de aMPV por qRT-PCR em pulmão.

Detectou-se aMPV no pulmão somente do grupo coinfestado aos três e sete dpi. Este achado se difere dos demais no qual o grupo coinfestado apresentou menor número de cópias virais quando comparado aos grupos com infecção simples. A replicação viral do aMPV no pulmão ocorre por um período muito curto e, muitas das vezes, são encontradas baixas quantidades do vírus neste órgão (Cook, 2009).

Detectou-se cópias virais de aMPV na cloaca somente aos três dpi como mostra a Figura 15. Não houve diferença significativa ($P < 0,05$) entre o grupo aMPV e o grupo coinfestado. As aves infectadas por aMPV eliminam o vírus pelas excretas (Hess *et al.*, 2004), como foi demonstrado no 3º dpi.

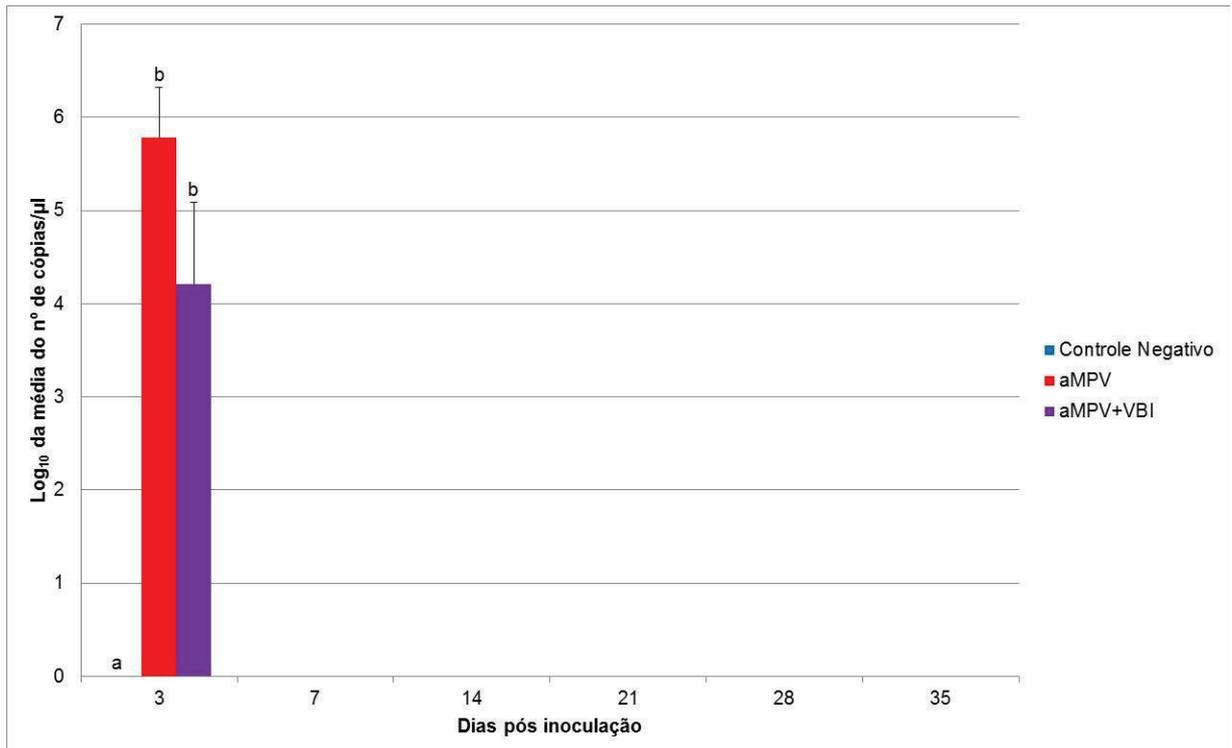


Figura 15. Quantificação relativa de aMPV por qRT-PCR em suabe cloacal.

Os órgãos do sistema respiratório apresentaram maior número de cópias virais de aMPV em relação à cloaca, sendo que no seio nasal foi possível detectar o vírus por mais dias. Isto está de acordo com a literatura, pois o aMPV tem como local de eleição para a replicação viral o sistema respiratório superior, principalmente o seio nasal (Jones & Rautenschlein, 2013). Sabe-se que a infecção pelo aMPV é mais severa quando há o envolvimento de agentes secundários, demonstrando que existe um sinergismo entre o aMPV e outros patógenos respiratórios (Alkhalaf *et al.*, 2002), o que não aconteceu neste estudo quando o vírus foi inoculado simultaneamente com VBI.

O grupo coinfectado apresentou em todos os órgãos, exceto no pulmão, quantidade de vírus inferior ao grupo infectado somente com aMPV, o que está de acordo com os resultados de ELISA, reforçando a hipótese que houve interferência viral entre os vírus. Resultados semelhantes foram encontrados por Costa-Hurtado *et al.* (2014) que coinfetaram galinhas e perus com vírus da influenza aviária de baixa patogenicidade e vírus de Newcastle lentogênico e observaram redução significativa na replicação do vírus em suabes cloacais nas aves coinfetadas pelos dois vírus em relação às aves infectadas com um único vírus.

Nos grupos experimentais inoculados com aMPV detectou-se anticorpos até o 35° dpi. Contudo, a detecção viral não ocorreu até os 35 dpi nos órgãos analisados. É possível que se detecte anticorpos para aMPV em aves que sejam negativas para o vírus na detecção viral por qRT-PCR. Isto ocorre pelo curto período de tempo que o vírus se replica na ave (Catelli *et al.*, 1998).

5.5.2. VBI

Os resultados referentes à quantificação relativa da replicação viral de VBI no seio nasal estão apresentados na Figura 16.

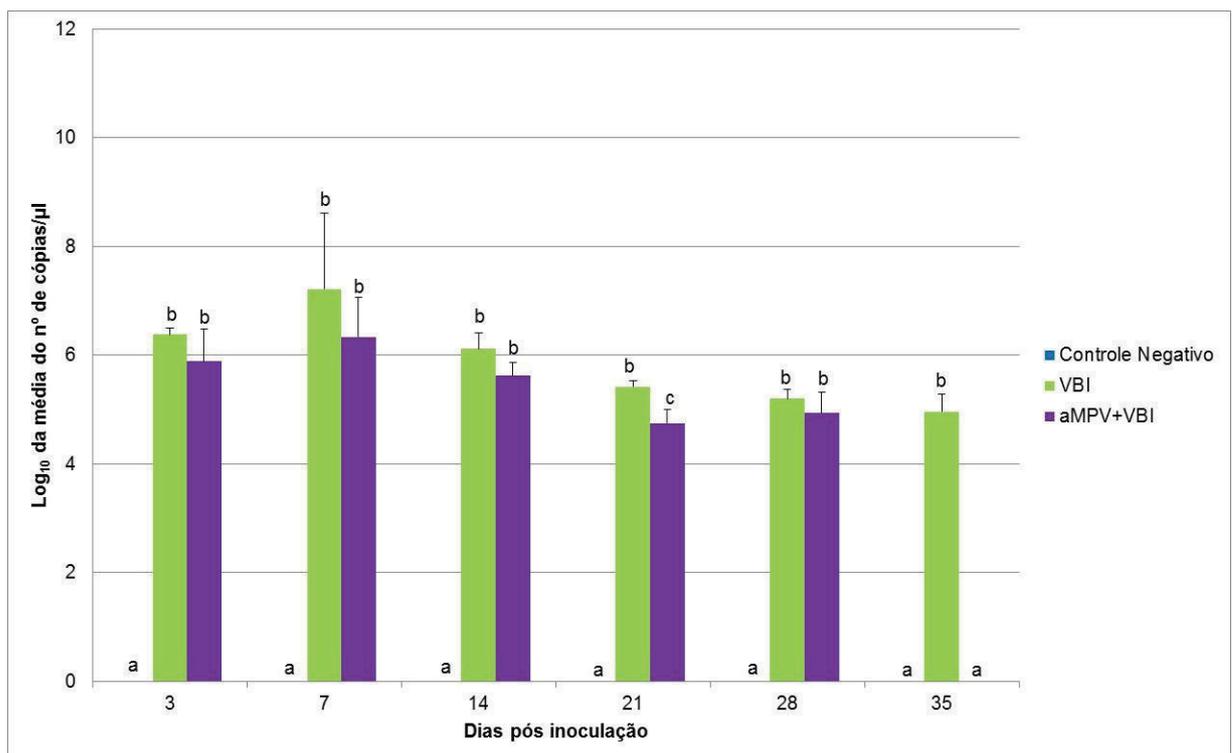


Figura 16. Quantificação relativa de VBI por qRT-PCR em seio nasal.

Houve detecção do vírus no seio nasal dos grupo VBI e coinfectado até os 28 dpi, ocorrendo diferença significativa ($P < 0,05$) entre eles somente aos 21 dpi. No grupo VBI foi detectado cópias virais aos 35 dpi. Apesar do VBI apresentar tropismo por diferentes órgãos na ave, a via de transmissão pode influenciar a replicação tecidual do vírus (Uenaka *et al.*, 1998). No caso deste experimento, a via

de inoculação foi a óculo-nasal, o que justifica a detecção viral no seio nasal das aves. A Figura 17 apresenta os dados referentes ao número de cópias virais de VBI na traqueia.

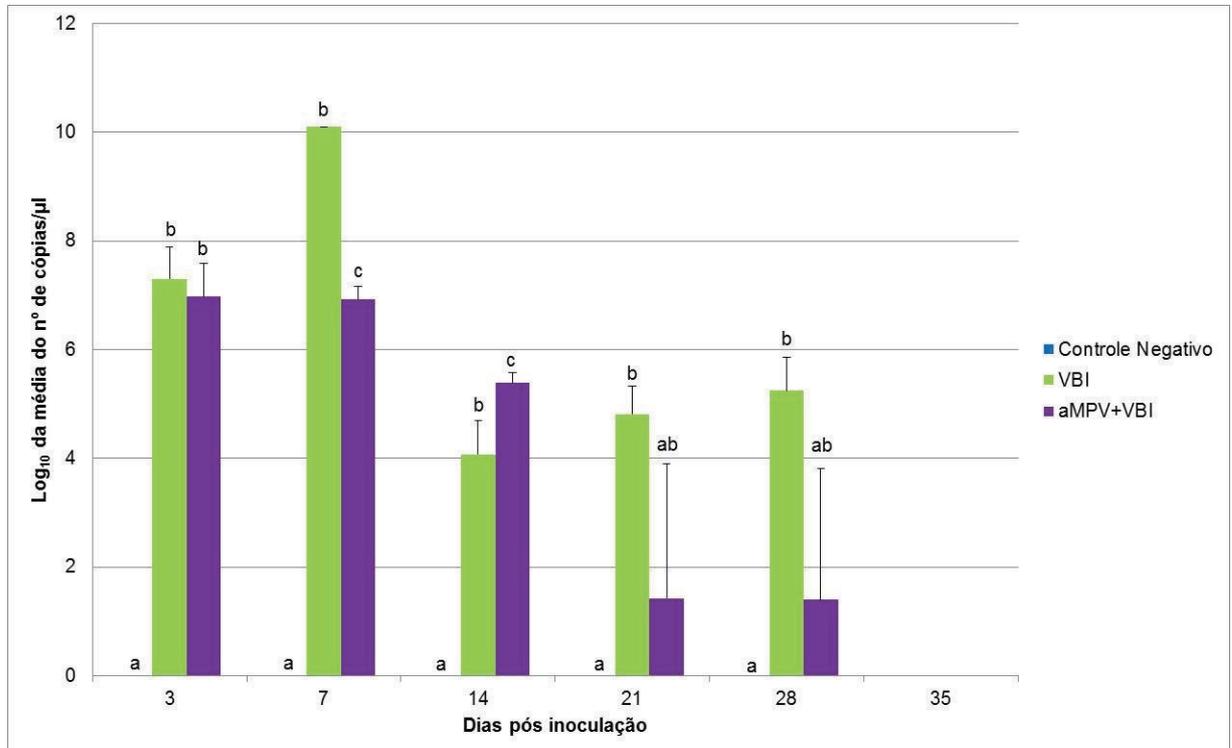


Figura 17. Quantificação relativa de VBI por qRT-PCR em traqueia.

Na traqueia houve maior quantidade de vírus nas aves infectadas somente com VBI na fase inicial da doença quando comparado ao grupo coinfestado. Também nota-se que somente aos 7 dpi houve diferença significativa entre os grupos ($P < 0,05$). A traqueia é o órgão de eleição para a replicação viral do VBI (Fan *et al.*, 2012). Observa-se na Figura 18 que a detecção de VBI no pulmão ocorreu aos três, sete e 14 dpi.

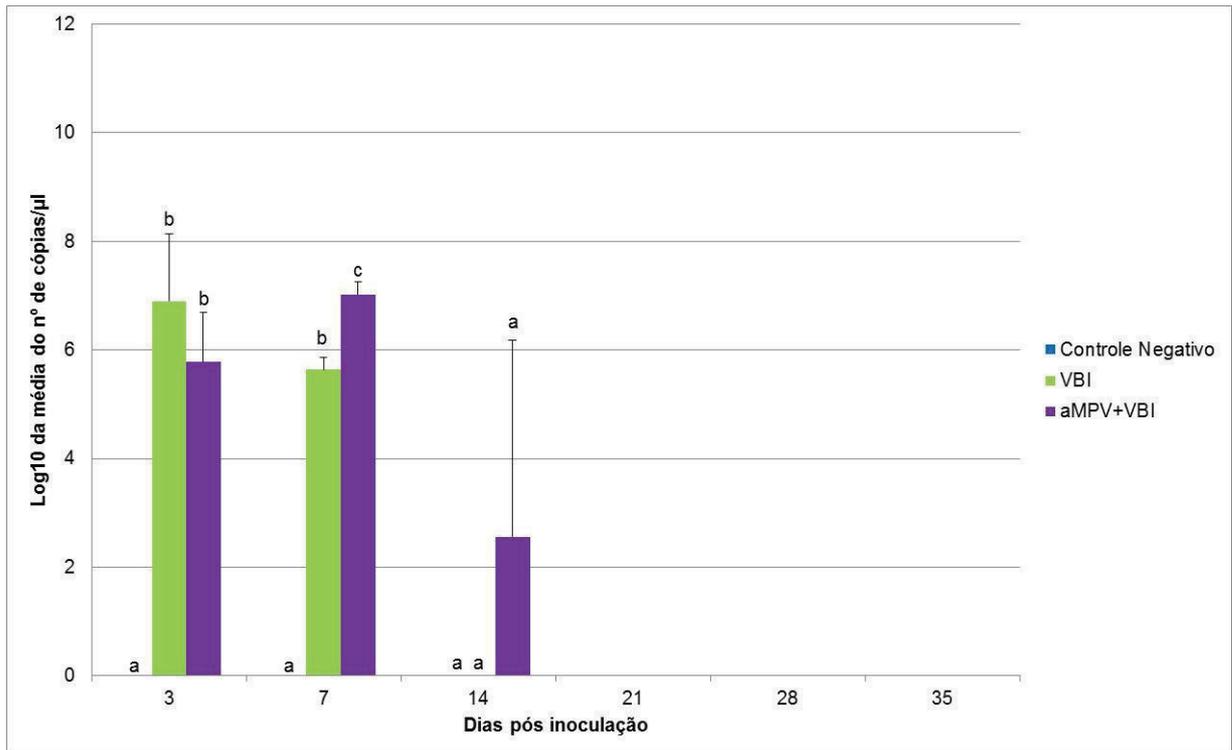


Figura 18. Quantificação relativa de VBI por qRT-PCR em pulmão.

Observa-se a presença do vírus no grupo VBI durante o 3º e o 7º dpi, sendo que no 7º houve diferença significativa ($P < 0,05$) em relação ao grupo coinfestado. O grupo aMPV+VBI apresentou maior número de cópias virais no pulmão em relação ao grupo somente com VBI. Resultados similares foram verificados no qRT-PCR de aMPV. Aos 14 dpi ocorreu uma variação grande na detecção do vírus no grupo coinfestado e isso explica a não ocorrência de diferenças significativas nesta data.

O VBI também tem como órgão de replicação o pulmão das aves infectadas (Benyeda *et al.*, 2009; Cavanagh, 2003). Em um estudo realizado por Caserta (2015) também se detectou VBI até o 14º dpi em pulmões de aves infectadas experimentalmente.

Os resultados de quantificação viral na cloaca (Figura 19) demonstram a presença do vírus nas excretas das aves do grupo VBI e aMPV+VBI, persistindo até o 35º dpi.

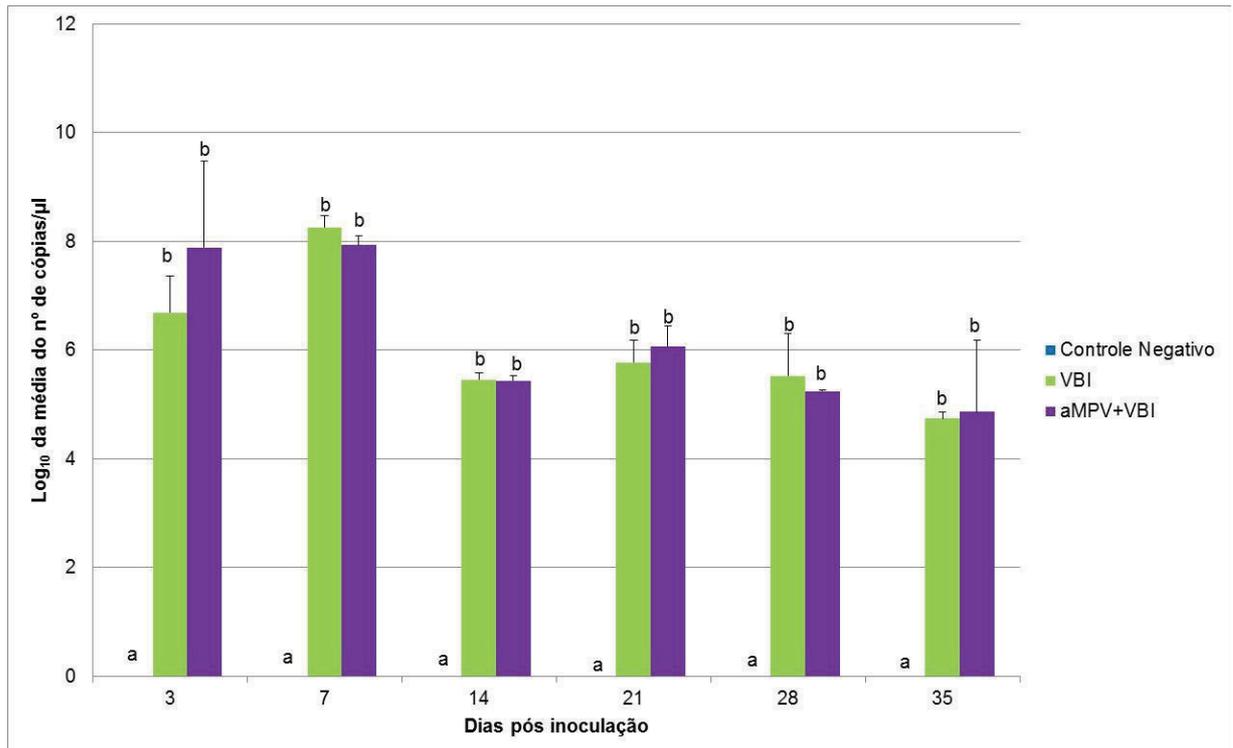


Figura 19. Quantificação relativa de VBI por qRT-PCR suabe cloacal.

As excretas apresentam uma quantidade significativa de vírus da bronquite infecciosa durante um período prolongado de tempo. Isto ocorre principalmente em infecções crônicas ou na fase de persistência do vírus no organismo hospedeiro (Cook, 1968). A excreção do vírus pode ocorrer mesmo na presença de altos títulos de anticorpos (Jones & Ambali, 1987). Neste experimento, a infecção dos tecidos entéricos também se manifestou clinicamente como diarreia nos grupos infectados com VBI.

O RNA viral de VBI foi detectado em órgãos analisados do sistema respiratório como seio nasal, traqueia e pulmão, em concordância com as manifestações clínicas respiratórias, indicando replicação viral nesses tecidos.

Durante a interferência viral ocorre competição dos vírus pelo hospedeiro. Além disso, é conhecido que o vírus com maior taxa de replicação supera o vírus com menor taxa, uma vez que o vírus que se replica mais rapidamente consumirá mais células alvo no início da infecção, portanto a taxa de replicação do vírus determina qual vírus dominará a coinfeção (Pinky & Dobrovlny, 2016). O VBI é conhecido por replicar rapidamente e ser presente em grandes quantidades nos tecidos em poucas horas do início da infecção, enquanto a replicação de aMPV é mais devagar. Este fato explica porque na detecção de VBI por qRT-PCR não houve

grandes diferenças entre o número de cópias virais do grupo VBI e do coinfectado. O mesmo resultado não foi encontrado na detecção de aMPV. Isto está de acordo com resultados de estudos com VBI e aMPV em TOCs no qual mostrou-se que quando os dois vírus são inoculados simultaneamente o VBI replica de forma mais eficiente do que o aMPV, ao menos que a infecção por aMPV ocorra bem mais cedo e com quantidade viral mais alta (Jones *et al.*, 1998; Khehra, 1998 apud Cook *et al.*, 2001). Sabe-se, ainda, que a interferência viral pode ser prejudicial para a detecção de vírus em aves coinfectadas, pois os títulos virais podem ficar mais baixos ou até mesmo indetectáveis (El Zowalaty *et al.*, 2011).

5.6. Avaliação de lesões macroscópicas

Aos sete dpi, observou-se congestão na traqueia dos grupos infectados por aMPV, VBI e aMPV+VBI. Estes achados corroboram com os resultados de qRT-PCR no qual houve detecção viral na traqueia destes grupos aos sete dpi. Nenhuma outra alteração macroscópica foi encontrada no seio nasal e no pulmão.

O VBI se replica em células epiteliais de diversos órgãos, mas a traqueia é o sítio de replicação primária do vírus (Raj & Jones, 1997; Fan *et al.*, 2012). A infecção por aMPV quando ocorre associada à patógenos secundários, induzem manifestações clínicas como exsudato purulento e lesões macroscópicas como necrose do baço, aerossaculite fibrinosa e peri-hepatite (Majó *et al.*, 1997; Nakamura *et al.*, 1998). No entanto estes achados não foram encontrados no grupo coinfectado nas condições experimentais deste trabalho.

5.7. Histopatologia

Aos três, 14 e 28 dpi foi realizada a avaliação microscópica do seio nasal, traqueia e pulmão. Os órgãos que nestes períodos não tiveram detecção viral não foram avaliados. O grupo controle negativo não apresentou nenhuma alteração histopatológica nas datas analisadas.

No Quadro 8, encontra-se os resultados de escores de lesões histopatológicas encontradas no seio nasal aos três, 14 e 28 dias pós inoculação.

Quadro 8. Escore histopatológico observado no seio nasal dos grupos inoculados aos três, 14 e 28 dpi.

Lesões histopatológicas	Grupos		
	aMPV	VBI	aMPV+VBI
	3 dpi		
Congestão	++	++	++
Descamação epitelial	+	++	+
Presença de cílios nas células epiteliais	++	++	+++
Infiltrado inflamatório mononuclear	+	+	-
	14 dpi		
Congestão	++	+++	+
Descamação epitelial	+	++	+
Presença de cílios nas células epiteliais	+	-	++
Infiltrado inflamatório mononuclear	++	++	-
	28 dpi		
Congestão	+	+	+
Descamação epitelial	+	+	-
Presença de cílios nas células epiteliais	+++	++	+
Infiltrado inflamatório mononuclear	-	-	-

na: não avaliado, -: ausente, +: leve, ++: moderado, +++: severo.

O aMPV e o VBI são vírus que não apresentam lesões microscópicas patognomônicas. No entanto, a infecção causada pelos dois vírus apresenta lesões semelhantes no sistema respiratório superior como a diminuição dos cílios epiteliais seguida de descamação do epitélio. Observa-se também a presença de infiltrado inflamatório e congestão (Jackwood & De Wit, 2013). Todos estes achados foram encontrados nos grupos aMPV, VBI e aMPV+VBI. A perda de cílios e a descamação do epitélio ocorrem devido à replicação viral nas células epiteliais (Jones & Rautenschlein, 2013).

As lesões microscópicas encontradas no seio nasal estão de acordo com os resultados de quantificação viral no seio nasal por aMPV e por VBI, no qual houve detecção aos três, 14 e 28 dpi. O grupo infectado somente com VBI apresentou maiores escores de lesões em relação aos demais grupos. A recuperação do epitélio traqueal ocorre naturalmente pela ave, o que podemos observar nas lesões (Raj & Jones, 1997)

No Quadro 9, verifica-se o escore histopatológico observado na traqueia dos grupos inoculados.

Quadro 9. Escore histopatológico observado na traqueia dos grupos inoculados aos três, 14 e 28 dpi.

Lesões histopatológicas	Grupos		
	aMPV	VBI	aMPV+VBI
	3 dpi		
Congestão	++	++	++
Descamação epitelial	+	++	++++
Presença de cílios nas células epiteliais	++	-	-
Infiltrado inflamatório mononuclear	++	++	+
	14 dpi		
Congestão	na	++	+
Descamação epitelial	na	++	-
Presença de cílios nas células epiteliais	na	+	+++
Infiltrado inflamatório mononuclear	na	++	-
	28 dpi		
Congestão	na	+	+
Descamação epitelial	na	+	-
Presença de cílios nas células epiteliais	na	+++	+++
Infiltrado inflamatório mononuclear	na	-	-

na: não avaliado, -: ausente, +: leve, ++: moderado, +++: severo.

A ausência de cílios epiteliais e a descamação do epitélio traqueal ocorrem no início do processo infeccioso (Di Fabio & Buitrago, 2009), como podemos observar aos três dpi nos grupos inoculados com VBI e coinfectados. As

lesões microscópicas foram diminuindo com o passar do tempo, como podemos observar aos 14 e 28 dpi.

Quadro 10. Escore histopatológico observado no pulmão dos grupos inoculados aos três, 14 e 28 dpi.

Lesões histopatológicas	Grupos		
	aMPV	VBI	aMPV+VBI
	3 dpi		
Congestão	na	++	+++
Edema	na	-	-
Broncopneumonia intersticial	na	-	-
	14 dpi		
Congestão	na	++	+++
Edema	na	-	+
Broncopneumonia intersticial	na	-	++
	28 dpi		
Congestão	na	na	na
Edema	na	na	na
Broncopneumonia intersticial	na	na	na

na: não avaliado, -: ausente, +: leve, ++: moderado, +++: severo.

Observa-se maior lesão no pulmão no grupo coinfectado aos 14 dpi, quando comparado ao grupo inoculado somente com VBI. Esses dados estão de acordo com a quantificação viral no qual se notou maior número de cópias virais de aMPV e VBI no grupo coinfectado.

As lesões encontradas no grupo coinfectado foram broncopneumonia intersticial seguida de edema e congestão do órgão. Segundo Raj & Jones (1997) o VBI causa pequenas áreas de pneumonia nos pulmões, o que neste estudo foi encontrado no grupo coinfectado.

O pulmão apresentou comportamento diferente comparado ao seio nasal e traqueia. Em um estudo realizado por Aberle *et al.*(2005) os autores perceberam que a coinfecção do hRSV com outros vírus respiratórios está associada à respostas imunes reduzidas resultado em um quadro clínico mais grave nas infecções do sistema respiratório inferior, como o pulmão. Os resultados deste estudo sugeriram que o interferon γ pode diferir significativamente em infecções respiratórias simples

das duplas. No entanto, este fato não pode ser comprovado neste estudo, pois não foi feita a avaliação de interferon nas aves.

De um modo geral, nas amostras histológicas de seio nasal e traqueia durante todos os períodos analisados (3, 14 e 28 dpi) o grupo inoculado somente com VBI apresentou maiores lesões quando comparado ao grupo coinfestado. Esses resultados corroboram com os encontrados nas análises de citometria de fluxo e quantificação dos vírus nos tecidos. A provável causa desses resultados é a interferência viral entre os vírus inoculados.

6. CONCLUSÕES

No geral, este estudo reproduziu experimentalmente a coinfeção de VBI do genótipo BR-I e aMPV do subtipo B. Em conclusão, o presente estudo mostrou que:

- A coinfeção causada pelos dois vírus estudados provocou menos danos às aves em relação ao grupo infectado somente com o VBI como foi observado na citometria de fluxo, sorologia e qRT-PCR de seio nasal e traqueia;
- Nas aves inoculadas com VBI, tanto o grupo VBI quanto o aMPV+VBI, ocorreu diarreia corroborando com a detecção do vírus no suabe cloacal até 35 dpi;
- A avaliação da ciliostase traqueal não demonstrou grandes diferenças entre os grupos experimentais;
- O pulmão do grupo coinfectado apresentou maiores números de cópias virais e maiores lesões microscópicas em relação aos demais grupos, se diferindo dos demais órgãos analisados;
- A coinfeção pode afetar a replicação dos vírus diminuindo os títulos virais para os níveis de detecção através de técnicas moleculares e também afetando os resultados sorológicos. Este fato leva à adoção tardia de medidas de controle e prevenção, favorecendo a sua transmissão prolongada e aumentando o tempo de exposição do vírus no plantel.

REFERENCIAS

ABDEL-AZEEM, A. A.; FRANZO, G.; DALLE ZOTTE, A.; DRIGO, M.; CATELLI, E.; LUPINI, C.; MARTINI, M.; CECCHINATO, M. First evidence of avian metapneumovirus subtype A infection in turkeys in Egypt. **Tropical Animal Health and Production**, v. 46, n. 6, p. 1093-1097, 2014.

ABERLE, J. H.; ABERLE, S. W.; PRACHER, E.; HUTTER, H. P.; KUNDI, M.; POPOW-KRAUPP, T. Single versus dual respiratory virus infectious in hospitalized infants impact on clinical course of disease and interferon γ response. **The Pediatric Infectious Disease Journal**, v. 24, n. 7, p. 605-610, 2005.

ABPA - Associação Brasileira de Proteína Animal. **Relatório Anual ABPA 2017**. Disponível em: <http://abpa-br.com.br/storage/files/3678c_final_abpa_relatorio_anual_2016_portugues_web_reduzido.pdf>. Acesso em: 06 set. 2017.

AL-ANKARI, A. R.; BRADBURY, J. M.; NAYLOR, C. J.; WORTHINGTON, K. J.; PAYNE-JOHNSON, C.; JONES, R. C. Avian pneumovirus infection in broiler chicks inoculated with Escherichia coli at different time intervals. **Avian Pathology**, v. 30, n. 3, p. 257-267, 2001.

ALKAHALAF, A. N.; HALVORSON, D. A.; SAIF, Y. M. Comparison of enzyme-linked immunosorbent assays and virus neutralization test for detection of antibodies to avian pneumovirus. **Avian Diseases**, v. 46, n. 3, p. 700-703, 2002.

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

ANON. Turkey rhinotracheitis of unknown etiology in England and Wales. **Veterinary Record**, v. 117, p. 653-654, 1985.

ARNS, C. W.; HAFEZ, H. M. Isolation and identification of avian pneumovirus from broiler breeders flocks in Brazil. 44th West Poultry Diseases Conference, **Proceedings...** Sacramento, Estados Unidos, p. 124-125, 1995.

ARNS, C. W.; ZUANAZE, M. Metapneumovírus aviário. In: JÚNIOR, A. B.; SILVA, E. N.; FÁBIO, J.; SESTI, L.; ZUANAZE, M. A. F. **Doenças das aves**. Ed, FACTA, Campinas, p. 777-783, 2009.

ASSAYAG JR., M. S.; CHACÓN, J. L. V.; FERREIRA, A. P. Economical impact of infectious bronchitis in a poultry integration system. VII International Symposium on Avian Corona- and Pneumoviruses and complicating pathogens. **Proceedings...** Rauschholzhausen, Alemanha, 2012.

AUNG, Y. **Comparison of the pathogenesis and immune responses following avian Metapneumovirus subtype A and B infection in broiler-type chickens**. 117 f. Dissertação - Tierärztliche Hochschule Hannover. 2007.

AUNG, Y. H.; LIMAN, M.; NEUMANN, U.; RAUTENSCHLEIN, S. Reproducibility of swollen sinuses in broilers by experimental infection with avian metapneumovirus subtypes A and B turkey origin and their comparative pathogenesis. **Avian Pathology**, v. 37, n.1, p. 65-74, 2008.

AWAD , F. **Studies on the immunopathogenesis, diagnosis and control of infectious bronchitis and avian metapneumoviruses in chicken**. 278 f. University of Liverpool. 2004.

AWAD, F.; CHHABRA, R.; BAYLIS, M.; GANAPATHY, K. An overview of infectious bronchitis virus in chickens. **World's Poultry Science Journal**, v. 70, p. 375-384, 2014.

AWAD, F.; HUTTON, S.; FORRESTER, A.; BAYLIS, M.; GANAPATTHY, K. Heterologous live infectious bronchitis virus vaccination in day-old commercial broiler

chicks: clinical signs, ciliary health, immune responses and protection against variant infectious bronchitis viruses. **Avian Pathology**, v. 45, n. 2, p. 169-177, 2016.

BANDE, F.; ARSHAD, S. S.; OMAR, A. R.; BEJO, M. H.; ABUBAKAR, M. S.; ABBA, Y. Pathogenesis and diagnostic approaches of avian infectious bronchitis. **Advances in Virology**, p.1-11, 2016.

BANDE, F.; ARSHAD, S. S.; OMAR, A. R.; HAIR-BEJO, M.; MOEINI, H.; OMAR, A. R. Progress and challenges toward the development of vaccines against avian infectious bronchitis. **Journal of Immunology Research**, v. 2015, p. 1-12, 2015.

BANDE, F.; ARSHAD, S. S.; OMAR, A. R.; HAIR-BEJO, M.; MAHMUDA, A.; NAIR, V. Global distributions and strain diversity of avian infectious bronchitis virus: a review. **Animal Health Research Reviews**, v. 18, n. 1, p. 70-83, 2017.

BANET-NOACH, C.; SIMANOV, L.; PERK, S. Characterization of Israeli avian metapneumovirus strains in turkeys and chickens. **Avian Pathology**, v. 34, n. 3, p. 220-226, 2005.

BAXTER-JONES, C.; GRANT, M.; JONES, R. C.; WILDING, G. P. A comparison of three methods for detecting antibodies to turkey rhinotracheitis virus. **Avian Pathology**, v. 18, n. 1, p. 91-98, 1989.

BÄYON-AUBOYER, M. H.; ARNAULD, C.; TOQUIN, D.; ETERRADOSSI, N. Nucleotide sequences of the F, L and G protein genes of two non-A/non-B avian pneumoviruses (APV) reveal a novel APV subgroup. **Journal of General Virology**, v. 81, p. 2723-2733, 2000.

BEACH, J. R.; SCHALM, O. W. A filterable virus, distinct from that of laryngotracheitis, the cause of a respiratory disease of chicks. **Poultry Science**, v. 1, p. 199-206, 1936.

BEADLING, C.; SLIFKA, M. K. How do viral infections predispose patients to bacterial infections? **Current Opinion in Infectious Diseases**, v. 17, p. 185-191, 2004.

BENNETT, R. S.; MCCOMB, B.; SHIN, H. J.; NJENGA, M. K.; NAGARAJA, K. V.; HALVORSON, D. A. Detection of avian pneumovirus in wild Canada (*Branta canadensis*) and blue-winged teal (*Anas discors*) geese. **Avian Diseases**, v. 46, n. 4, p. 1025-1029, 2002.

BENNETT, R. S.; NEZWORSKI, J.; VELAYUDHAN, B. T.; NAGARAJA, K. V.; ZEMAN, D. H.; DYER, N.; GRAHAM, T.; LAUER, D. C.; NJENGA, M. K.; HALVORSON, D. A. Evidence of avian pneumovirus spread beyond Minnesota among wild and domestic birds in central North America. **Avian Diseases**, v. 48, n. 4, p. 902-908, 2004.

BENYEDA, Z.; MATÓ, T.; SÜVEGES, T.; SZABÓ, É.; KARDI, V.; ABONYI-TÓTH, Z.; RUSVAI, M.; PALYA, V. Comparison of the pathogenicity of QX-like, M41 and 793/B infectious bronchitis strains from different pathological condition. **Avian Pathology**, v. 38, n. 6, p. 449-456, 2009.

BEUADETTE, F. R.; HUDSON, C. B. Cultivation of the virus of infectious bronchitis. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 90, p. 51-58, 1937.

BIJLENGA, G. **Investigations on the activity of a living vaccine against infectious bronchitis of chickens with an embryonated egg-adapted autogenous virus strain applied in the drinking water.** Tese. Faculty of Veterinary Medicine. 1960.

BIJLENGA, G.; COOK, J. K. A.; GELB JR, J.; DE WIT, J. J. Development and use of the H strain of avian infectious bronchitis virus from the Netherlands as a vaccine: a review. **Avian Pathology**, v. 33, n.6, p. 550-557, 2004.

BOCHKOV, Y. A.; TOSI, G.; MASSI, P.; DRYGIN, V. V. Phylogenetic analysis of partial S1 and N gene sequences of infectious bronchitis virus isolates from Italy

revealed genetic diversity and recombination. **Virus Genes**, v. 35, n. 1, p. 65-71, 2007.

BOURSNELL, M. E.; BROWN, T. D.; FOULDS, I. J.; GREEN, P. F.; TOMLEY, F. M.; BINNS, M. M. Completion of the sequence of the genome of the coronavirus avian infectious bronchitis virus. **The Journal of General Virology**, v. 68, p. 57-77, 1987.

BRANDÃO, P. E.; RICHTZENHAIN, L. J.; BUITRAGO, L. Y. V. On the evolution of avian infectious bronchitis virus in VERO cells. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 49, n. 5, p. 386-390, 2012.

BRANDÃO, P. E.; LOVATO, L. T.; DEZENGRINI, R. Coronaviridae. In: FLORES, E. F. **Virologia Veterinária**. 3 Ed. Editora UFSM, Santa Maria, p. 737-765, 2017.

BRANDEN, R. C.; DA SILVA, E. N. Ocorrência de “nuevos” serotipos de bronquites infecciosa en Brasil. In **Proceedings of VI Seminario Internacional de Patologia Aviar**, 6., 1986, Athens, GA, USA.

BROWN, P.; RICCHIZZI, E.; BONCI, M.; JONES, R.; NAYLOR, C. Towards the development of novel ELISAs for avian pneumovirus (APV) serology. V International Symposium on Avian Corona- and Pneumoviruses and Complicating Pathogens, 2006. Rauschholzhausen, Germany, **Proceedings...** Giessen: VVB Laufersweiler Verlag, 2006. p. 48-55.

BROWN, P. A.; LEMAITRE, E.; BRIAND, F. X.; COURTILLON, C.; GUIONIE O.; ALLÉE, C.; TOQUIN, D.; BAYON-AUBOYER, M. H.; JESTIN, V.; ETERRADOSSI, N. Molecular comparisons of full length metapneumovirus (MPV) genomes, including newly determined French AMPV-C and -D isolates, further supports possible subclassification within the MPV Genus. **Plos One**, v. 9, n. 7, p. 1-14, 2004

BUYS, S. B.; DU PREEZ, J. H. A preliminary report on the isolation of a virus causing sinusitis in turkeys in South African and attempts attenuate the virus. **Turkeys**, v. 28, p. 36-46, 1980.

BUYS, S. B.; DU PREEZ, J. H.; ELS, H. J. Swollen head syndrome in chickens: a preliminary report on the isolation of a possible aetiological agent. **Journal of the South African Veterinary Association**, v. 60, n. 4, p. 221-222, 1989.

CALLISON, S. A.; HILT, D. A.; BOYNTON, T. O.; SAMPLE, B. F.; ROBISON, R.; SAWAYNE, 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.

CARDOSO, T. C.; TEIXEIRA, M. C.; GOMES, D. E.; JEREZ, A. J. Genetically diverse coronaviruses in captive bird populations in a Brazilian zoological park. **Vector Borne and Zoonotic Diseases**, v. 11, n. 2, p. 165-168, 2011.

CARON, L. F. Etiology and Immunology of Infectious Bronchitis Virus. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, v. 12, n. 2, p. 115-119, 2010.

CARRANZA, C.; ASTOLFI-FERREIRA, C. S.; PARRA, S. H. S.; NUÑEZ, L. F. N.; PENZES, Z.; CHACÓN, J. L.; SESTI, L.; CHACÓN, R. D.; FERREIRA, A. J. P. Genetic characterisation and analysis of infectious bronchitis virus isolated from Brazilian flocks between 2010 and 2015. **British Poultry Science**, p. 1-14, 2017.

CASERTA, L. C. **Estudos de patogenicidade de estirpe variante brasileira (BR) do vírus da bronquite infecciosa das galinhas**. 74 f. Dissertação. Universidade Estadual de Campinas, Campinas. 2015.

CATELLI, E.; COOK, J. K. A.; CHESHER, J.; ORBELL, S. B.; WOODS, M. A.; BAXENDALE, W.; HUGGINS, M. B. The use of virus isolation, histopathology and immunoperoxidase techniques to study the dissemination of a chicken isolate of avian pneumovirus in chickens. **Avian Pathology**, v. 27, n. 6, p. 632-640, 1998.

CATELLI, E.; TERREGINO, C.; DE MARCO, M. A.; DELOGU, M.; GUBERTI, V. Serological evidence of avian pneumovirus infection in reared and free-living pheasants. **Veterinary Record**, v. 149, n. 2, p. 56-58, 2001.

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

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

CAVANAGH, D.; MAWDITT, K.; BRITTON, P.; NAYLOR, C. J. Longitudinal field studies of infectious bronchitis virus and avian pneumovirus in broilers using type-specific polymerase chain reactions. **Avian Pathology**, v. 28, n. 6, p. 593-605, 2010.

CEBRA, J. J. Influences of microbiota on intestinal immune system development. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 69, n. 5, p. 1046-1051, 1999.

CECCHINATO, M.; CATELLI, E.; LUPINI, C.; RIXXHIXI, E.; BROWN, P.; NAYLOR, C. J. Field avian metapneumovirus evolution avoiding vaccine induced immunity. In 7th International Symposium on turkey diseases, **Proceedings...** Berlin, Germany, p. 176-179, 2008.

CECCHINATO, M.; CATELLI, E.; LUPINI, C.; RICCHIZZI, E.; CLUBBE, J.; BATTILANI, M.; NAYLOR, C. J. Avian metapneumovirus (AMPV) attachment protein involvement in probable virus evolution concurrent with mass live vaccine introduction. **Veterinary Microbiology**, v. 146, p. 24-34, 2010.

CHA, R. M. **Immunopathogenesis of avian Metapneumovirus in the turkeys**. 132 f. Tese. University of Minnesota. 2009.

CHACÓN, J. L.; BRANDÃO, P. E.; BUIM, M.; VILLARREAL, L.; FERREIRA, A. J. P. Detection by reverse transcriptase-polymerase chain reaction and molecular characterization of subtype B avian metapneumovirus isolated in Brazil. **Avian Pathology**, v. 36, n. 5, p. 383-387, 2007.

CHACÓN, J. L.; MIZUMA, M.; VEJARANO, M. P.; TOQUÍN, D.; ETERRADOSSI, N.; PATNAYAK, D. P.; GOYAL, S. M.; FERREIRA, A. J. P. Avian metapneumovirus subtypes circulating in brazilian vaccinated and nonvaccinated chicken and turkey farms. **Avian Diseases**, v. 55, n. 1, p. 82-89, 2011a.

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, 2011b.

CHACÓN, J. L.; ASSAYAG JR, M. S.; REVOLLEDO, L.; ASTOLFI-FERREIRA, C. S.; VEJARANO, M. P.; JONES, R. C.; PIANTINO FERREIRA, A. J. Pathogenicity and molecular characteristics of infectious bronchitis virus (IBV) strains isolated from broilers showing diarrhoea and respiratory disease. **British Poultry Science**, v. 55, n. 3, p. 271-283, 2014.

CHEN, H. Y.; GUO, A. Z.; PENG, B.; ZHANG, M. F.; GUO, H. Y.; CHEN, H. C. Infection of HeLa cells by avian infectious bronchitis virus is dependent on cell status. **Avian Pathology**, v. 36, n. 4, p. 269-274, 2007.

CHHABRA, R.; CHANTREY, J.; GANAPATHY, K. Immune responses to virulent and vaccine strains of infectious bronchitis viroses in chickens. **Viral Immunology**, v. 28, n. 9, p. 478-488, 2015.

CIHAK, J; HOFFMAN-FEZER, G; ZIEGLER-HEIBROCK, H. W; STEIN, H; KASPERS, B; CHEN, C. H; COOPER, M. D; LÖSCH, U. T cells expressing the V beta 1 T-cell receptor are required for IgA production in the chicken. **Proceedings...**, v. 88, p. 10951-10955, 1991.

COLLINS, M. S.; GOUGH, R. E. Characterization of a virus associated with turkey rhinotracheitis. **The Journal of General Virology**, v. 69, p. 909-916, 1988.

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

COOK, J. K.; ELLIS, M. M.; HUGGINS, M. B. The pathogenesis of Turkey Rhinotracheitis virus in turkey poultlets inoculated with the virus alone or together with two strains of bacteria. **Avian Pathology**, v. 20, p. 155-166, 1991.

COOK, J. K.; JONES, B. V.; ELLIS, M. M.; JING, L.; CAVANAGH, D. Antigenic differentiation of strains of turkey rhinotracheitis virus using monoclonal antibodies. **Avian Pathology**, v. 22, n. 2, p. 257-273, 1993a.

COOK, J. K.; KINLOCH, S.; ELLIS, M. M. *In vitro* and *in vivo* studies in chickens and turkeys on strains of turkey rhinotracheitis virus isolated from the two species. **Avian Pathology**, v. 22, n. 1, p. 157-170, 1993b.

COOK, J. K.; HUGGINS, M. B.; ORBELL, S. J.; SENNE, D. A. Preliminary antigenic characterization of an avian pneumovirus isolated from commercial turkeys in Colorado, USA. **Avian Pathology**, v. 28, n. 6, p. 607-617, 1999a.

COOK, J. K.; ORBELL, S. J.; WOODS, M. A.; MICHAEL, 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, 1999b.

COOK, J. K.; CHESHER, J.; ORTHEL, F.; WOODS, M. A.; ORBELL, S. J.; BAXENDALE, W.; HUGGINS, M. B. Avian pneumovirus infection of laying hens: experimental studies. **Avian Pathology**, v. 29, v. 6, p. 545-556, 2000.

COOK, J. K. A. Avian Pneumovirus Infections of Turkeys and Chickens. **The Veterinary Journal**, v. 160, p. 118-125, 2000.

COOK, J. K. A. Avian rhinotracheitis. **Revue Scientifique et Technique**, v. 19, n 2, 602-613, 2000.

COOK, J. K. A.; HUGGINS, M. B.; ORBELL, S. J.; MAWDITT, K.; CAVANAGH, D. Infectious bronchitis virus vaccine interferes with the replication of avian pneumovirus vaccine in domestic fowl. **Avian Pathology**, v. 30, n. 3, p. 233-242, 2001.

COOK, J. K. A. Avian metapneumovirus - nearly 30 years of vaccination. In: VI International Symposium on Avian Corona- and Pneumoviruses and Complicating Pathogens, 2009. Rauschholzhausen, Germany, **Proceedings...** Giessen: VVB Laufersweiler Verlag, p. 326-333, 2009.

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

CORLEY, M. M.; GIAMBRONE, J. J. Immunosuppression in specific- pathogen-free broilers administered infectious bursal disease virus vaccines by in ovo route. **Avian Diseases**, v. 46, n. 4, p. 810-815, 2002.

COSTA-HURTADO, M.; AFONSO, C. L.; MILLER, P. J.; SPACKMAN, E.; KAPCZYNSKI, D. R.; SWAYNE, D. E.; SHEPHERD, E.; SMITH, D.; ZSAK, A.; JACKWOOD, M. P. Virus interference between H7N2 low pathogenic avian influenza virus and lentogenic Newcastle disease virus in experimental co-infections in chickens and turkeys. **Veterinary Research**, v. 25, n. 1, 2014.

COSWIG, L. T.; SANTOS, M. B.; HAFEZ, H. M.; FERREIRA, H. L.; ARNS, C. W. Propagation of avian metapneumovirus subtypes A and B using chicken embryo related and other cell systems. **Journal of Virological Methods**, v. 167, n. 1, p. 1-4, 2010.

CRINION, R. A.; HOFSTAD, M. S. Pathogenicity of four serotypes of avian infectious bronchitis virus for the oviduct of young chickens of various ages. **Avian Diseases**, v. 16, n. 2, p. 351-363.

CUBILLOS, A. Bronquite infecciosa aviária. In: REVOLLEDO, L.; FERREIRA, A. J. P. **Patologia Aviária**. 1 Ed, Manole, Barueri, p. 158-171, 2009.

DA PALMA, T.; DOONAN, B. P.; TRAGER, N. M.; KASMAN, L. M. A systematic approach to virus-virus interactions. **Virus Research**, v. 149, p. 1-9, 2010.

DANI, M. A. C.; ARNS, C. W.; DURIGON, E. L. Molecular characterization of Brazilian avian pneumovirus isolates using reverse transcriptionpolymerase chain

reaction, restriction endonuclease analysis and sequencing of a G gene fragment. **Avian Pathology**, v. 28, n. 5, p. 473-476, 1999.

DARBYSHIRE, J. H.; PETERS, R. W. Humoral antibody response and assessment of protection following primary vaccination of chickens with maternally derived antibody against avian infectious bronchitis virus. **Research Veterinary Science**, v.38, p.14-21, 1985.

DE WIT, J. J.; DE JONG, M. C.; PIJPERS, A.; VERHEIJDEN, J. H. Transmission of infectious bronchitis virus within vaccinated and unvaccinated groups of chickens. **Avian Pathology**, v. 27, n. 5, p. 464-471, 1998.

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

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

DE WIT, J. J.; BOELM, G. J.; VAN GERWE, T. J. W. M.; SWART, W.A. J. M. The required sample size in vaccination-challenge experiments with infectious bronchitis virus, a meta-analysis. **Avian Pathology**, v. 24, n. 1, p. 9-16, 2013.

DHAMA, K.; SINGH, S. D.; BARATHIDASAN, R.; DESINGU, P. A.; CHAKRABORTY, S.; TIWARI, R.; KUMAR, M. A. Emergence of avian infectious bronchitis virus and its variants need better diagnosis, prevention and control strategies: A global perspective. **Pakistan Journal of Biological Sciences**, v. 17, n. 6, p. 751-767, 2014.

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

DI FABIO, J.; BUITRAGO, L. Y. V. Bronquite infecciosa das galinhas. In: BERCHIERI JÚNIOR, A.; SILVA, E. N.; DI FABIO, J.; SESTI, L.; ZUANAZE, M. A. F. **Doenças das Aves**. 2 Ed, FACTA, Campinas, p. 631-648, 2009.

DIANZANI, F. Viral interference and interferon. **La Ricerca in Clinica e in Laboratorio**, v. 5, p. 196-213, 1975.

DOMANSKA-BLICHARZ, K.; JACUKOWICZ, A.; LISOWSKA, A.; WYROSTEK, K.; MINTA, Z. Detection and molecular characterization of infectious bronchitis-like viruses in wild bird populations. **Avian Pathology**, v. 43, n. 5, p. 406-413, 2014.

DROUAL, R.; WOOLCOCK, P. R. Swollen head syndrome associated with *E. coli* and infectious bronchitis virus in the Central Valley of California. **Avian Pathology**, v. 23, n. 4, p. 733-742, 1994.

EL ZOWALATY, M. E.; CHANDER, Y.; REDIG, P. T.; ABD EL LATIF, H. K.; EL SAYED, M. A.; GOYAL, S. M. Selective isolation of Avian influenza virus (AIV) from cloacal samples containing AIV and Newcastle disease virus. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 23, n. 2, p. 330-332, 2011.

EASTON, A. J.; DOMACHWSKE, J. B.; ROSENBERG, H. F. Animal pneumoviruses: molecular genetics and pathogenesis. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 17, n. 2, p. 390-412, 2004.

FAN, W. Q.; WANG, H. N.; ZHANG, Y.; GUAN, Z. B.; WANG, T.; XU, C. W.; ZHANG, A. Y.; YANG, X. Comparative dynamic distribution of avian infectious bronchitis virus M41, H120, and SAIBK strains by quantitative real-time RT-PCR in SPF chickens. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 76, p. 2255-2260, 2012.

FEHR, A. R.; PERLMAN, S. Coronaviruses: An overview of their replication and pathogenesis. **Methods in Molecular Biology**, v. 1282, p. 1-23, 2015.

FELDMAN, B. F.; ZINKL, J. G.; SCHALM, O. W. **Schalm's veterinary hematology**. 5. Iowa:Wiley-Blackwell, 2006.

FELIPPE, P. A.; SILVA, L. H. A.; SANTOS, M. 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, n. 4, p. 1191-1196, 2010.

FELIPPE, P. A.; SILVA, L. H. A.; SANTOS, M. B.; SAKATA, S. T.; ARNS, C. W.
Detection of and phylogenetic studies with avian metapneumovirus recovered from feral pigeons and wild birds in Brazil. **Avian Pathology**, v. 40, n. 5, p. 445-452, 2011.

FERREIRA, H. L.; PILZ, D.; MESQUITA, L. G.; CARDOSO, T. Infectious bronchitis virus replication in the chicken embryo related cell line. **Avian Pathology**, v.32, n. 4, p. 413-417, 2003.

FERREIRA, H. L.; ARNS, C. W.; SPILKI, F. R.; ALMEIDA, R. S.; SANTOS, M. B.
Pneumoviridae. In: FLORES, E. F. **Virologia Veterinária**. 3 Ed. Editora UFSM, Santa Maria, p. 823-841, 2017.

FRAGA, A.P.; BALESTRIN, E.; IKUTA, N.; FONSECA, A. S. K.; SPILKI, F. R.;
CANAL, C. W.; LUNGE, V. R. Emergence of a New Genotype of Avian Infectious Bronchitis Virus in Brazil. **Avian Diseases**, v. 57, n. 2, p. 225-232, 2013.

GANAPATHY, K.; BUFTTON, A.; PEARSON, A.; LEMIERE, S.; JONES, R. C.
Vaccination of commercial broiler chicks against avian metapneumovirus infection: a comparison of drinking-water, spray and oculo-oral delivery methods. **Vaccine**, v. 28, n. 23, p. 3944-3948, 2010.

GARMYN, A.; MARTEL, A.; FROYMAN, R.; LUDWIG, C.; NAUWYNCK, H.;
HAESEBROUCK, F.; PASMANS, F. The effect of reduced treatment time and dosage of enrofloxacin on the course of respiratory disease caused by avian metapneumovirus and *Ornithobacterium rhinotracheale*. **Poultry Science**, v. 88, n. 11, p.2315-2323, 2009.

GELB JR, J.; LADMAN, B. S.; LICATA, M. J.; SHAPIRO, M. H.; CAMPION, L. R. Evaluating viral interference between infectious bronchitis virus and newcastle disease virus vaccine strains using quantitative reverse transcription–polymerase chain reaction. **Avian Diseases**, v. 51, n. 4, p. 924-934, 2007.

GOUGH, R. E.; COLLINS, M. S. Antigenic relationships of three turkey rhinotracheitis viruses. **Avian Pathology**, v. 18, n. 2, p. 227-238, 1989.

GOUGH, R. E.; COX, W. J.; WINKLER, C. E.; SHARP, M. W.; SPACKMAN D. Isolation and identification of infectious bronchitis virus from pheasants. **Veterinary Record**, v. 138, n. 9, p. 208-209, 1996.

GOVINDARAJAN, D.; SAMAL, S. K. Sequence analysis of the large polymerase (L) protein of the US strain of avian metapneumovirus indicates a close resemblance to that of the human metapneumovirus. **Virus Research**, v. 105, n. 1, p. 59-66, 2004.

GOYAL, S. M.; CHIANG, S. J.; DAR, A. M.; NAGARAJA, K. V.; SHAW, D. P. HALVORSON, D. A.; KAPUR, V. Isolation of avian pneumovirus from an outbreak of respiratory illness in Minnesota turkeys. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 12, n. 2, p. 166-168, 2000.

GUIONIE, O.; TOQUIN, D.; SELLAL, E.; BOULEY, S.; ZWINGELSTEIN, F.; ALLÉE, C.; BOUGEARD, S.; LEMIÈRE, S.; ETERRADOSSI, N. Laboratory evaluation of a quantitative real-time reverse transcription PCR assay for the detection and identification of the four subgroups of avian metapneumovirus. **Journal of Virological Methods**, v. 139, p. 150-158, 2007.

HABIBI, M.; KARIMI, V.; LANGEROUDI, A. G.; GHAFOURI, S. A.; HASHEMZADEH, M.; FARAHANI, R. K.; MAGHSOUDLOO, H.; ABDOLLAHI, H.; SEIFOURI, P. Combination of H120 and 1/96 avian infectious bronchitis virus vaccine strains protect chickens against challenge with IS/1494/06 (variant 2)-like infectious bronchitis virus. **Acta Virologica**, v. 61, n. 2, p. 150-160, 2017.

HAFEZ, H. M.; LÖHREN, U. Swollen head syndrome: clinical observations and serological examinations in West Germany. **Deutsche Tierärztliche Wochenschrift**, v. 97, p. 322-324, 1990.

HAFEZ, H. M.; HESS, M.; PRUSAS, C.; NAYLOR, C. J.; CAVANAGH, D. Presence of avian pneumovirus type A in continental Europe during the 1980s. **Journal of Veterinary Medicine. B, Infectious diseases and Veterinary Public Health**, v. 47, n. 8, p. 629-633, 2000.

HESS, M.; HUGGINS, M. B.; MUDZAMIRI, R.; HEINCZ, U. Avian metapneumovirus excretion in vaccinated and non-vaccinated specified pathogen free laying chickens. **Avian Pathology**, v. 33, n. 1, p. 35-40, 2004.

HIPÓLITO, O. Isolamento e identificação do vírus da bronquite infecciosa das galinhas no Brasil. **Arquivos da Escola Superior de Veterinária da Universidade Rural do Estado de Minas Gerais**, v. 10, p. 131-150, 1957.

HUGHES, L. A.; SAVAGE, C.; NAYLOR, C.; BENNETT, M.; CHANTREY, J.; JONES, R. Genetically diverse coronaviruses in wild bird populations of Northern England. **Emerging Infectious Diseases**, v. 15, n. 7, p. 1091-1094, 2009.

HUTTON, D.; BETTRIDGE, J.; CHRISTLEY, R.; HABTE, T.; GANAPATHY, K. Detection of infectious bronchitis virus 793B, avian metapneumovirus, *Mycoplasma gallisepticum* and *Mycoplasma synoviae* in poultry in Ethiopia. **Tropical Animal Health and Production**, v. 49, n. 2, p. 317-322, 2017.

IGNJATOVIC, J.; GOULD, G.; SAPATS, S. Isolation of a variant infectious bronchitis virus in Australia that further illustrates diversity among emerging strains. **Archives of Virology**, v. 151, n. 8, p. 1567-1585, 2006.

INOUE, A. Y.; CASTRO, A. G. M. Fisiopatologia do sistema respiratório. In: BERCHIERI JÚNIOR, A.; SILVA, E. N.; DI FABIO, J.; SESTI, L.; ZUANAZE, M. A. F. **Doenças das Aves**. 2 Ed, FACTA, Campinas, p. 281-302, 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. DE WIT, S. Infectious Bronchitis. In: SWAYNE, D. E.; GLISSON, J. R.; MCDOUGALD, L. R.; NOLAN, L. K.; SUAREZ, D. L.; NAIR, V. **Diseases of Poultry**. 13 Ed.: John Wiley and Sons, p. 139-159, 2013.

JANEWAY, C. A.; TRAVERS, P.; WALPORT, M.; SHLOMCHICK, M. J. Innate immunity. In **Immunobiology - The Immune System in Health and Disease**, Garland, New York, p. 35-92, 2001.

JONASSEN, C. M.; KOFSTAD, T.; LARSEN, I. L.; LØVLAND, A.; HANDELAND, K.; FOLLESTAD, A.; LILLEHAUG, A. Molecular identification and characterization of novel coronaviruses infecting graylag geese (*Anser anser*), feral pigeons (*Columbia livia*) and mallards (*Anas platyrhynchos*). **Journal of General Virology**, v. 86, p. 1597-1607, 2005.

JONES, R. 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, n. 26, p. 617-618, 1987.

JONES, R. C. Avian pneumovirus infection: Questions still unanswered. **Avian Pathology**, v. 25, n. 4, p. 639-648, 1996.

JIRJIS, F. F.; NOLL, S. L.; HALVORSON, D. A.; NAGARAJA, K. V.; MARTIN, F.; SHAW, D. P. Effects of bacterial coinfection on the pathogenesis of avian pneumovirus infection in turkeys. **Avian Diseases**, v. 28, n. 1, p. 34-49, 2004.

JONES, R. C.; KHEHRA, R. S.; NAYLOR, C. J.; CAVANAGH D. Dual infection of tracheal organ cultures and chicks with infectious bronchitis virus and avian pneumovirus. Proceedings of an International Symposium on Infectious Bronchitis and Pneumovirus Infections in Poultry Rauschholzhausen, Germany, **Proceedings...** p. 97-105, 1998.

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

JONES, R. C.; RAUTENSCHLEIN, S. Avian metapneumovirus. In: SWAYNE, D. E.; GLISSON, J. R.; MCDOUGALD, L. R.; NOLAN, L. K.; SUAREZ, D. L.; NAIR, V. **Diseases of Poultry**.. 13 Ed.:John Wiley and Sons, p. 112-138, 2013.

JORDAN, B. Vaccination against infectious bronchitis virus: a continuous challenge. **Veterinary Microbiology**, v. 206, p. 137-143, 2017.

JUHASZ, K.; EASTON, A. J. Extensive sequence variation in the attachment (G) protein gene of avian pneumovirus: evidence for two distinct subgroups. **Journal of General Virology**, v. 75, p. 2873-2880, 1994.

JUNGHERR, E. I.; CHOMIAK, T. W.; LUGINBUHL, R. E. Immunologic differences in strains of infectious bronchitis virus. Proceedings 60th Annual Meeting USA Livestock As nitary Association. 1956. Chicago, Illinois, EUA. **Proceedings...** p. 203-209, 1956.

KANEKO, M.; MIZUNUMA, T.; TAKIMOTO, H.; KUMAZAWA, Y. Development of TCR alpha beta CD8 alpha alpha intestinal intraepithelial lymphocytes is promoted by interleukin-15-producing epithelial cells constitutively stimulated by gram-negative bacteria via TLR4. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 27, n. 6, p. 883-889, 2004.

KIMURA, Y.; NORRBY, E.; NAGATA, I.; ITO, Y.; SHIMOKATA, K. Homologous interference induced by a temperature-sensitive mutant derived from an HVJ (Sendai virus) carrier culture. **Journal of General Virology**, v.33, p. 333-343, 1976.

KHEHRA, R. S. **Avian pneumovirus infection in chickens and turkey: studies on some aspects of immunity and pathogenesis**. Tese. University of Liverpool. 1998.

KHEHRA, R. S.; JONES, R. C. In vitro and in vivo studies on the pathogenicity of avian pneumovirus for the chicken oviduct. **Avian Pathology**, v. 28, n. 3, p. 257-262, 1999.

LAI, M. M.; CAVANAGH, D. The molecular biology of coronaviruses. **Advances in Virus Research**, v. 48, p. 1-100, 1997.

LEE, E.; SONG, M. S.; SHIN, J. Y.; LEE, Y. M.; KIM, C. J.; LEE, Y. S.; KIM, H.; CHOI, Y. K. Genetic characterization of avian metapneumovirus subtype C isolated from pheasants in a live bird market. **Virus Research**, v. 128, n. 1-2, p. 18-25, 2007.

LILLEHOJ, H. S. Analysis of Eimeria acervulina-induced changes in the intestinal T lymphocyte subpopulations in two chicken strains showing different levels of susceptibility to coccidiosis. **Research in Veterinary Science**, v. 56, p. 1-7, 1994.

LIMAN, M.; RAUTENSCHLEIN, S. Induction of local and systemic immune reactions following infection of turkeys with avian Metapneumovirus (aMPV) subtypes A and B. **Veterinary Immunology Immunopathology**, v. 115, p. 273-285, 2007.

LITJENS, J. B.; VAN WILLIGEN, F. C. K.; SINKE, M. A case of swollen head syndrome in a flock of guinea fowl. **Tijdschr voor Diergeneeskd**, v. 114, n. 13, p. 719-720, 1980.

LIU, C.; XU, H. Y.; LIU, D. X. Induction of caspase-dependent apoptosis in cultured cells by the avian coronavirus infectious bronchitis virus. **Journal of Virology**, v. 75, n. 14, p. 6402-6409, 2001.

LUNA, L. G. **Manual of Histologic Staining Methods of the Armed Forces**. Institute of Pathology. 3ed. New York: McGraw-Hill, 1968. 258p.

LUO, L.; KRISTA, N.; LIU, L.; SABARA, M. I.; LI Y. Characterization on the biosynthesis and cell surface expression of avian metapneumovirus attachment glycoprotein. **Virus Research**, v. 147, p. 189-194, 2010.

MAJÓ, N.; GIBERT, X.; VILAFRANCA, M.; O'LOAN, C. J.; ALLAN, G. M.; COSTA, L.; PAGES, A.; RAMIS, A. Turkey rhinotracheitis virus and *Escherichia coli* experimental infection in chickens: histopathological, immunocytochemical and microbiological study. **Veterinary Microbiology**, v. 57, p. 29-40, 1997.

MARTINI, M. C.; GAMEIRO, J.; CARDOSO, T. C.; CASERTA, L. C.; GUALBERTO, A. C.; KEID, L. B.; OLIVEIRA, T. M.; DOS SANTOS, M. M.; ARNS, C. W.; FERREIRA, H. L. Experimental infection of inbred BALB/c and A/J mice with Massachusetts and Brazilian strains of infectious bronchitis virus (IBV). **Archives of Virology**, v. 160, n. 7, p. 1785-1790, 2015.

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

MIHINDUKULASURIYA, K. A.; WU, G.; LEGER, J. S.; NORDHAUSEN, R. W.; WANG, D. Identification of a Novel Coronavirus from a Beluga Whale by using a panviral microarray. **Journal of Virology**, v. 82, n. 10, p. 5084-5088, 2008.

MILLER, L. T.; YATES, V. J. Neutralization of infectious bronchitis virus human sera. **American Journal of Epidemiology**, v. 88, n. 3, p. 406-409, 1968.

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 gene1. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 28, n. 3, p. 190-194, 2008.

MUTURI, E. J.; BARA, J. Sindbis virus interferes with dengue 4 virus replication and its potential transmission by *Aedes albopictus*. **Parasites & Vectors**, v. 8, n. 1, p. 65-75, 2015.

NABESHIMA S., MURATA M., KIKUCHI K., IKEMATSU H., KASHIWAGI S.; HAYASHI J.A. Reduction in the number of peripheral CD28+CD8+ T cells in the

acute phase of influenza. **Clinical & Experimental Immunology**, v. 128, p. 339-356, 2002.

NAKAMURA, K.; MASE, M.; TANIMURA, N.; YAMAGUCHI, S.; YUASA, N. Attempts to reproduce swollen head syndrome in specific pathogen free chickens by inoculating with *Escherichia coli* and/or turkey rhinotracheitis virus. **Avian Pathology**, v. 27, p. 21-27, 1998.

NAYLOR, C. J.; AL-ANKARI, A. R.; AL-AFALEQ, A. I.; BRADBURY, J. M.; JONES, R. C. Exacerbation of *Mycoplasma gallisepticum* infection in turkeys by rhinotracheitis virus. **Avian Pathology**, v. 21, n. 2, p. 295-305, 1992.

NAYLOR, C.; SHAW, K.; BRITTON, P.; CAVANAGH, D. Appearance of type B avian pneumovirus in Great Britain. **Avian Pathology**, v. 26, n.2, p. 327-338, 1997.

NJENGA, M. K.; LWAMBA, H. M.; SEAL, B. S. Metapneumoviruses in birds and humans. **Virus Research**, v. 91, n. 2, p. 163-169, 2003.

OGAWA, A.; MURAKAMI, S.; NAKANE, T. Field cases of swollen-head syndrome in pheasants. **Journal of the Japan Veterinary Medical Association**, v. 54, n. 2, p. 87-91, 2001.

OTSUKI, K.; NORO, K.; YAMAMOTO, H.; TSUBOKURA, M. Studies on avian infectious bronchitis virus (IBV). II. Propagation of IBV in several cultured cells. **Archives of Virology**, v. 60, n. 2, p. 115-122, 1979.

OWOADE, A. A.; DUCATEZ, M. F.; HÜBSCHEN, J. M.; SAUSY, A.; CHEN, H.; GUAN, Y.; MULLER, C. P. Avian metapneumovirus subtype A in China and subtypes A and B in Nigeria. **Avian Diseases**, v. 52, n. 3, p. 502-506, 2008.

PANIGRAHY, B.; SENNE, D. A.; PEDERSEN, J. C.; GIDLEWSKI, T.; EDSON, R. K. Experimental and serologic observations on avian pneumovirus (APV/turkey/Colorado/97) infection in turkeys. **Avian Diseases**, v. 44, n. 1, p. 17-22, 2000.

PAWELEC, G.; AKBAR, A.; CARUSO, C.; EFFROS, R.; GRUBECK-LOEBENSTEIN, B.; WIKBY, A. Is immunosenescence infectious? **Trends in Immunology**, v. 25, n. 8, p. 406-410, 2004.

PINKY, L.; DOBROVOLNY, H. M. Coinfections of the respiratory tract: viral competition for resources. **Plos One**, v. 11, n. 5, p. 1-19, 2016.

RAHIMI, M. Seroprevalence of avian metapneumovirus infection in broiler and broiler breeder chickens in Iran. **Veterinarni Medicina**, v. 56, n. 8, p. 395-399, 2011.

RAJ, G. D.; JONES, R. C. Immunopathogenesis of infection in SPF chicks and commercial broiler chickens of a variant infectious bronchitis virus of economic importance. **Avian Pathology**, v. 25, n. 3, p. 481-501, 1996.

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

RAUTENSCHLEIN, S.; AUNG, Y. H; HAASE, C. Local and systemic immune responses following infection of broiler-type chickens with avian metapneumovirus subtypes A and B. **Veterinary Immunology Immunopathology**, v. 140, p. 10-22, 2011.

REED, J.; MUENCH, H. A simple method for estimating fifty percent end points. **The American Journal of Hygiene**, v. 27, p. 49, 1938.

RIVERA-BENITEZ, J. F.; MARTÍNEZ-BAUTISTA, R.; RÍOS-CAMBRE, F.; RAMÍREZ-MENDOZA, H. Molecular detection and isolation of avian metapneumovirus in Mexico. **Avian Pathology**, v. 43, n. 3, p. 217-223, 2014.

RIZOTTO, L. S. **Metapneumovírus aviários em aves silvestres**. 76 f. Dissertação. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo. 2017.

SABARA, M. I.; LARENCE, J. E. Evaluation of a Japanese quail fibrosarcoma cell line (QT-35) for use in the propagation and detection of metapneumovirus. **Journal of Virological Methods**, v. 102, n. 1-2, p. 73-81, 2002.

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

SCHALK, A. F.; HAWN, M. C. An apparently new respiratory disease of baby chicks. **Journal of the American Veterinary Medicine Association**, v. 78, p. 413-416, 1931.

SHIN, H. J.; NJENGA, M. K.; MCCOMB, B.; HALVORSON, D. A.; NAGARAJA, K. V. Nagaraja, K. V. Avian pneumovirus (APV) RNA from wild and sentinel birds in the United States has genetic homology with RNA from APV isolates from domestic turkeys. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, n.11, p. 4282-4284, 2000a.

SHIN, H. J.; MCCOMB, B.; BACK, A.; SHAW, D. P.; HALVORSON, D. A.; NAGARAJA, K. V. Susceptibility of broiler chicks to infection by avian pneumovirus of turkey origin. **Avian Diseases**, v. 44, n. 4, p. 797-802, 2000b.

SHIN, H. J.; CAMERON, K. T.; JACOBS, J. A.; TURPIN, E. A.; HALVORSON, D. A.; GOYAL, S. M.; NAGARAJA, K. V.; KUMAR, M. C.; LAUER, D. C.; SEAL, B. S.; NJENGA, M. K. Molecular epidemiology of subgroup C avian pneumoviruses isolated in the United States and comparison with subgroup A and B viruses. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, n. 5, p. 1687-1693, 2002a.

SHIN, H. J.; JIRJIS, F. F.; KUMAR, M. C.; NJENGA, M. K.; SHAW, D. P.; NOLL, S. L.; NAGARAJA, K. V.; HALVORSON, D. A. Neonatal avian pneumovirus infection in commercial turkeys. **Avian Diseases**, v. 46, n. 1, p. 239-244, 2002b.

SIMAS, P. V. M.; BARNABÉ, A. C. S.; CASERTA, L. C.; MARTINI, M. C.; LIMA NETO, D. F.; DURÃES-CARVALHO, R.; MORAES, A. P.; NAGEL, N. E.; LIERZ, M.; HAFEZ, H. M.; FELIPPE, P. A. N.; ARNS, C. W. A. Avian Metapneumovirus (aMPV) and Infectious Bronchitis Virus (IBV) in wildlife psittacidae. In: XXV Brazilian Congress

of Virology & IX Mercosur Meeting of Virology, 2014, Ribeirão Preto - SP.
Proceedings..., 2014.

SPESCHOCK, J. L.; DOYON-REALE, N.; RABAH, R.; NEELY, M. N.; ROBERTS, P. Filamentous Influenza A virus infection predisposes mice to fatal septicaemia following superinfection with *Streptococcus pneumoniae* serotype 3. **Infection and Immunity**, v. 75, p. 3102-3111, 2007.

STABEL, T. J.; BOLIN, S. R.; PESCH, B. A.; RAHNER, T. E. A simple and rapid flow cytometric method for detection of porcine cell surface markers. **Journal of Immunological Methods**, v. 245, n. 1-2, p. 147-152, 2000.

STUART, J. C. Rhinotracheitis: turkey rhinotracheitis (TRT) in Great Britain. In: Recent advances in turkey science. Poultry Science Symposium Series, London: Butterworth & Co Publishers Ltd. **Proceedings...**, p. 217-224, 1989.

SUGIYAMA, M.; KOIMARU, H.; SHIBA, M.; ONO, E.; NAGATA, T.; ITO, T. Drop of egg production in chickens by experimental infection with an avian metapneumovirus strain PLE8T1 derived from swollen head syndrome and the application to evaluate vaccine. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 68, n. 8, p. 783-787, 2006.

TARNAGDA, Z.; YOUNGBARE, I.; KAM, A.; TAHITA, M. C.; OUEDRAOGO, J. B. Prevalence of infectious bronchitis and Newcastle disease virus among domestic and wild birds in H5N1 outbreaks areas. **Journal of Infection in Developing Countries**, v. 5, n. 8, p. 565-570.

TATÁR-KIS, T. K. T. Evaluation of cross-protection against IBV 793B strain after combined vaccination with Massachusetts type and Brazilian variant vaccines at one-day-old. In: IX International Symposium on Avian Corona- and Pneumoviruses, 2016. Utrecht, The Netherlands, **Proceedings...** COST Action FA1207, p. 26-33, 2016.

THORNTON, D. H.; MUSKETT, J. C. Effect of infectious bronchitis vaccination on the performance of live Newcastle disease vaccine. **Veterinary Record**, v. 96, p. 467-468, 1975.

TOQUIN, D.; ETERRADOSSI, N.; GUITTET, M. Use of a related ELISA antigen for efficient TRT serological testing following live vaccination. **Veterinary Record**, v. 139, n. 3, p. 71-72, 1996.

TOQUIN, D.; GUIONIE, O.; JESTIN, V.; ZWINGELSTEIN, F.; ALLE, C.; ETERRADOSSI, N. European and american subgroup C isolates of avian metapneumovirus belong to different genetic lineages. **Virus Genes**, v. 32, n. 1, p. 97-103, 2006.

TREVISOL, I. M. Bronquite infecciosa: soluções para os problemas atuais. In: Conferência FACTA, 2014. Atibaia. **Anais...** 2014.

TURPIN, E. A.; PERKINS, L. E. L.; SWAYNE, D. E. Experimental infection of turkeys with avian pneumovirus and either Newcastle disease virus or Escherichia coli. **Avian Diseases**, v. 46, n. 2, p. 412-422, 2002.

TURPIN, E. A.; STALLKNECHT, D. E.; SLEMONS, R. D.; ZSAK, L.; SWAYNE D. E. Evidence of avian metapneumovirus subtype C infection of wild birds in Georgia, South Carolina, Arkansas and Ohio, USA. **Avian Pathology**, v. 37, n. 3, p. 343-351, 2008.

UENAKA, T.; KISHIMOTO, I.; SATO, S.; ANIMAS, S. B.; ITO, T.; OTSUKI, K.; COOK, J. K. A. Intracloacal infection with avian infectious bronchitis virus. **Avian Pathology**, v. 27, n. 3, p. 309-312, 1998.

UMAR, S.; SABIR, H.; AHMED, A.; SUBHAN, S. Avian metapneumovirus infection in poultry. **World's Poultry Science Journal**, v. 72, n. 4, p. 833-846, 2016.

VAN DE ZANDE, S.; NAUWYNCK, H.; DE JONGHE, S.; PENSAERT, M. Comparative pathogenesis of a subtype A with a subtype B avian pneumovirus in turkeys. **Avian Pathology**, v. 28, n. 3, p. 239-244, 1999.

VAN DER SLUIJS, J. L.; DOYON-REALE, N.; RABAH, R.; NEELY, M. N.; ROBERTS, P. Influenza-induced expression of indoleamine 2,3- dioxygenase enhances interleukin-10 production and bacterial outgrowth during secondary pneumococcal pneumonia. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 193, p. 214-222, 2006.

VAN GINKEL, F. W.; VAN SANTEN, V. L.; GULLEY, S. L.; TORO, H. Infectious bronchitis virus in the chicken Harderian gland and lachrymal fluid: viral load, infectivity, immune cell responses, and effects of viral immunodeficiency. **Avian Diseases**, v. 52, n. 4, p. 608-617, 2008

VILLARREAL, L. Y. B.; BRANDÃO, P. E.; CHACÓN, J. L.; ASSAYAG, M. S.; MAIORKA, P. C.; RAFFI, P.; SAIDENBERG, A. S.; JONES, R. C.; FERREIRA, A. J. P. Orchitis in roosters with reduced fertility associated with avian infectious. **Avian Diseases**, v. 51, n. 4, p. 900-904, 2007a.

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

VILLARREAL, L. Y. B.; SANDRI, T. L.; ASSAYAG, L. J.; RICHTZENHAIN L. J.; MALO, A.; BRANDÃO, P. E. Field observations after natural infection of Brazilian layer chickens with a phylogenetically divergent lineage of subtype B aMPV. In: VI International Symposium on Avian Corona- and Pneumoviruses and Complicating Pathogens, 2009. Rauschholzhausen, Germany, **Proceedings...** Giessen: VVB Laufersweiler Verlag, p.255-259, 2009.

VILLARREAL, L. Y. B.; SANDRI, T. L.; SOUZA, S. P.; RICHTZENHAIN, L. J.; DE 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, n. 2, p. 894-898, 2010a.

VILLARREAL, L. Y. B. Diagnosis of infectious bronchitis: an overview of concepts and tools. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, v. 12, n. 2, p. 111-114, 2010b.

WAGNER, R. R. Viral interference. Some considerations of basic mechanisms and their potential relationship to host resistance. **Bacteriological Reviews**, v. 24, n. 1, p. 151-166, 1960.

WEI, L.; ZHU, S.; YAN, X.; WANG, J.; ZHANG, C.; LIU, S.; SHE, R.; HU, F.; QUAN, R.; LIU, J. Avian metapneumovirus subgroup C infection in chickens, China. **Emerging Infectious Diseases**, v. 19, n. 7, p. 1092-1094, 2013.

WELCHMAN, D. B.; BRADBURY, J. M.; CAVANAGH, D.; AEBISCHER, N. J. Infectious agentes associated with respiratory disease in pheasants. **Veterinary Record**, v. 150, v. 21, p. 658-664, 2002.

WERTZ, G. W.; COLLINS, P. L.; HUANG, Y.; GRUBER, C.; LEVINE, S.; BALL, A. Nucleotide sequence of the G protein gene of human respiratory syncytial virus reveals an unusual type of viral membrane protein. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 82, p. 4075-4079, 1985.

WILLIAMS, R. A.; SAVAGE, C. E.; JONES, R. C. Development of a live attenuated vaccine against turkey rhinotracheitis. **Avian Pathology**, v. 20, n. 1, p. 45-55, 1991.

WINTER, C.; SCHWEGMANN-WESSELS, C.; NEUMANN, U.; HERRLER, G. The spike protein of infectious bronchitis virus is retained intracellularly by a tyrosine motif. **Journal of Virology**, v. 82, n. 2, p. 2765-2771, 2008.

WOO, P. C. Y.; HUANG, Y.; LAU, S. K. P.; YUEN, K. Y. Coronavirus genomics and bioinformatics analysis. **Viruses**, v. 2, n. 8, p. 1804-1820, 2010.

WOO, P. C. Y.; LAU, S. K. P.; LAM, C. S. F.; LAU, C. Y.; TSANG, A. K. L.; NAU, J. H. N.; BAI, R.; TEND, J. L. L.; TSANG, C. C. C.; WANG, M.; ZHENG, B. J.; CHAN, K. H.; YUEN, K. Y. Discovery of seven novel Mammalian and avian coronaviruses in the genus deltacoronavirus supports bat coronaviruses as the gene source of

alphacoronavirus and betacoronavirus and avian coronaviruses as the gene source of gammacoronavirus and deltacoronavirus. **Journal of Virology**, v. 86, n. 7, p. 3995-4008, 2012.

WORTHINGTON, K. J.; SARGENT, B. A.; DAVELAAR, F. G.; JONES, R. C.
Immunity to avian pneumovirus infection in turkeys following in ovo vaccination with an attenuated vaccine. **Vaccine**, v. 21, n. 13-14, p. 1355-1362, 2003.

ZEGPI, R. A.; BREEDLOVE, C.; VAN SANTEN, V. L.; RASMUSSEN-IVEY, C. R.;
TORO, H. Kidney cell–adapted infectious bronchitis ArkDPI vaccine is stable and protective. **Avian Diseases**, v. 61, n. 2, p. 221-228, 2017.

ZEKARIAS, B.; HUURNE, A. A. H. M. T.; LANDMAN, W. J. M.; REBEL, J. M. J.;
POL, J. M. A.; GRUYS, E. Immunological basis of differences in disease resistance in the chicken. **Veterinary Research**, v. 33, n. 2, p. 109-125, 2002.

ZUCKERMANN, F. A.; HUSMANN, R. J. Functional and phenotypic analysis of porcine peripheral blood CD4/CD8 double-positive T cells. **Immunology**, v. 87, n. 3, p. 500-512, 1996.



Laboratório Biovet
Departamento Técnico

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

14. TERMO DE RESPONSABILIDADE (Leia cuidadosamente antes de assinar)

Eu, Alexandra Rosa da Silva, certifico que:

- a) Li o disposto na Lei Federal 11.794 de 8 de outubro de 2008, e as demais normas aplicáveis à utilização de animais para o ensino e pesquisa, especialmente as resoluções do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal – CONCEA;
- b) Este estudo não é desnecessariamente duplicativo, tem mérito científico e que a equipe participante deste projeto foi treinada e é competente para executar os procedimentos descritos neste protocolo;
- c) Não existe método substitutivo que possa ser utilizado como uma alternativa ao projeto.

Assinatura: 

Data: 15/06/13

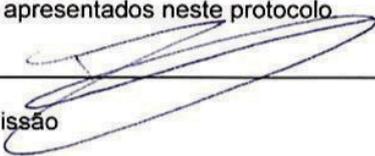
Observações: encaminhar 2 vias.

A critério da CEUA, poderá ser solicitado o projeto, respeitando confidencialidade e conflito de interesses.

Quando cabível, anexar o termo de consentimento livre e esclarecido do proprietário ou responsável pelo animal.

15. RESOLUÇÃO DA COMISSÃO

A Comissão de Ética no Uso de Animais, na sua reunião de 24/06/13 APROVOU os procedimentos éticos apresentados neste protocolo.

Assinatura: 

Coordenador da Comissão

A Comissão de Ética no Uso de Animais, na sua reunião de ___/___/___ emitiu o parecer em anexo e retorna o Protocolo para a sua revisão.

Assinatura: _____

Coordenador da Comissão

DECLARAÇÃO

As cópias de artigos de minha autoria ou de minha co-autoria, já publicados ou submetidos para publicação em revistas científicas ou anais de congressos sujeitos a arbitragem, que constam da minha Dissertação/Tese de Mestrado/Doutorado, intitulada Coinfecção experimental do metapneumovírus aviário e do vírus da bronquite infecciosa das galinhas em aves SPF, não infringem os dispositivos da Lei n.º 9.610/98, nem o direito autoral de qualquer editora.

Campinas, 23 de março de 2018.

Assinatura: Ana Caroline de Souza Barnabé
Nome do(a) autor(a): **Ana Caroline de Souza Barnabé**
RG n.º 4907852

Assinatura : 
Nome do(a) orientador(a): **Clarice Weis Arns**
RG n.º 500.336.600-1