



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE
CAMPINAS
Instituto de Biologia

LEONARDO CARDIA CASERTA

ESTUDOS DA PATOGENICIDADE DE ESTIRPE VARIANTE BRASILEIRA (BR) DO
VÍRUS DA BRONQUITE INFECCIOSA DAS GALINHAS

PATHOGENICITY STUDIES OF THE BRAZILIAN VARIANT STRAIN (BR) OF
INFECTIOUS BRONCHITIS VIRUS

CAMPINAS

2015

LEONARDO CARDIA CASERTA

ESTUDOS DA PATOGENICIDADE DE ESTIRPE VARIANTE BRASILEIRA (BR) DO
VÍRUS DA BRONQUITE INFECCIOSA DAS GALINHAS

PATHOGENICITY STUDIES OF THE BRAZILIAN VARIANT STRAIN (BR) OF
INFECTIOUS BRONCHITIS VIRUS

*Dissertação apresentada ao Instituto de Biologia da
Universidade Estadual de Campinas como parte
dos requisitos exigidos para a obtenção do título de
Mestre em Genética e Biologia Molecular, na área
de Microbiologia*

Dissertation presented to the Institute of Biology of
the University of Campinas in partial fulfillment of
the requirements for the degree of Master in
Genetics and Molecular Biology, in the area of
Microbiology

Orientadora: CLARICE WEIS ARNS

Co-orientadora: HELENA LAGE FERREIRA

Este exemplar corresponde à versão
final da dissertação defendida pelo
aluno Leonardo Cardia Caserta e orientada pela
profa. Dra. Clarice Weis Arns.


Clarice Weis Arns

CAMPINAS

2015

Agência: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de SP (FAPESP)

Nº do processo: 2013/02058-6

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

C268e Caserta, Leonardo Cardia, 1988-
Estudos da patogenicidade de estirpe variante brasileira (BR) do vírus da
bronquite infecciosa das galinhas / Leonardo Cardia Caserta. – Campinas, SP :
[s.n.], 2015.

Orientador: Clarice Weis Arns.

Coorientador: Helena Lage Ferreira.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de
Biologia.

1. Vírus da bronquite infecciosa. 2. Infecção. I. Arns, Clarice Weis, 1956-. II.
Ferreira, Helena Lage. III. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de
Biologia. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Pathogenicity studies of the brazilian variant strain (BR) of infectious
bronchitis virus

Palavras-chave em inglês:

Infectious bronchitis virus

Infection

Área de concentração: Microbiologia

Titulação: Mestre em Genética e Biologia Molecular

Banca examinadora:

Clarice Weis Arns [Orientador]

Marco Aurélio Ramirez Vinolo

Luciano Kleber de Souza Luna

Data de defesa: 16-06-2015

Programa de Pós-Graduação: Genética e Biologia Molecular

Campinas, 16 de Junho de 2015.

Banca examinadora

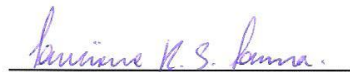
Profa. Dra. Clarice Weis Arns



Prof. Dr. Marco Aurélio Ramirez Vinolo



Prof. Dr. Luciano Kleber de Souza Luna



Prof. Dr. Paulo Anselmo Nunes Felipe



Profa. Dra. Luciana Maria de Hollanda



Agradecimentos

Aos meus pais Nelson e Norma e minha irmã Giovanna

Aos meus avós Nelson e Maria

Aos meus amigos da Unesp Araçatuba

Aos meus amigos de Campinas

À Clarice Arns, minha orientadora, pela oportunidade e apoio

A minha co-orientadora e ex co-orientadora, respectivamente, Helena e Márcia

À Fapesp pelo apoio financeiro do projeto

Resumo

Estudos recentes identificaram variantes do vírus da bronquite infecciosa das galinhas (Infectious Bronchitis Virus - IBV) exclusivamente brasileiras (BR), cujo genótipo não está relacionado com o grupo Massachusetts. As únicas vacinas vivas permitidas no Brasil são deste sorotipo, o que sugere uma proteção ineficiente contra os variantes presentes no país. Devido à carência de estudos de patogenicidade da variante BR do IBV, se faz necessário o conhecimento de seus efeitos na população avícola, elucidando seus sinais clínicos, lesões macroscópicas e microscópicas, além da produção de anticorpos induzida pela mesma. O presente estudo visa analisar a patogenicidade e o tropismo da variante BR do IBV para frangos de corte, através de um experimento *in vivo* utilizando aves SPF de um dia. Previamente, foram desenvolvidas 12 passagens em ovos embrionados com o objetivo de se aumentar a carga viral e realizar a titulação das amostras 801 e 810, obtendo os efeitos esperados nos embriões, de nanismo enrolamento e hemorragia. Quanto ao título viral, obteve-se um título de aproximadamente 10^5 EID, que quando inoculado nas aves, gerou sinais clínicos respiratórios e lesões macroscópicas esperadas nos trato respiratório e renal, principalmente. Ao teste da inibição da atividade ciliar, ou ciliostase, fragmentos de traqueia das aves foram coletados e observados em microscópio. Verificou-se maior inibição da atividade ciliar entre o 7º e 9º d.p.i. Os resultados obtidos com a técnica de qRT-PCR mostram os órgãos do trato respiratório como sítio de replicação primária, concordando com os sinais clínicos nos dias iniciais. Os níveis de RNA detectados nos órgãos do trato digestório foram os mais altos e apresentaram a maior persistência entre todos os órgãos coletados. Entretanto, o exame histopatológico confirmou o achado de outros estudos, nos quais apesar do alto nível de RNA detectado nos órgãos do trato digestório, houve poucas alterações microscópicas nestes órgãos. No trato respiratório, porém, as lesões microscópicas foram compatíveis com os sinais clínicos e a detecção de RNA. Ambos os grupos geraram uma baixa resposta de produção de anticorpos. Com este estudo, foi possível concluir que estas variantes brasileiras apresentam patogenicidade muito similar à de amostras pertencentes ao genótipo Massachusetts, no qual estão incluídas as vacinas mais utilizadas, com tropismo pelo trato respiratório e também sendo capaz de se replicar em grandes quantidades no trato digestório e urinário, porém com poucas ou nenhuma lesão.

Abstract

Recent studies identified variants of the Infectious bronchitis virus (IBV) exclusives from Brazil (BR), which genotype is not related to the Massachusetts serotype. In Brazil, alive vaccines for IBV are only allowed if belonging to this serotype, what suggests an inefficient protection against brazilian variants. Due to the lack of studies focusing the pathogenicity of the BR variant of IBV, the knowledge of its effects become necessary, elucidating clinical signs, macroscopic and microscopic lesions, besides the immunity against this virus. This study aims to analyse the pathogenicity and tropism of the BR variant of IBV for poultries through a in vivo experiment, using day old specific pathogen free (SPF) chicks. Previously, 12 serial passages in embryonated eggs were performed with the aim to increase the viral load and to perform the titration of strains 801 and 810, reaching the expected effects on the embryos (curling, dwarfing and hemorrhage). The viral titre obtained was around 10^5 EID. When inoculated in the chicks, produced respiratory clinical signs and macroscopic lesions in kidneys and trachea. In the ciliary activity test, tracheal fragments were collected and examined. A ciliary activity inhibition was observed between 7 and 9 d.p.i. (days post inoculation). The results obtained using the qRT-PCR technique showed the respiratory organs as a primary replication site, in consonance with the clinical signs observed in the first days of experiment. The highest RNA levels were detected in the digestory system, where the persistence was also the longest. Nevertheless, the histopathological examination confirmed the findings of others studies, that showed only a few microscopic lesions, despite the high RNA level detected. In the respiratory system, however, microscopic lesions were consistent with clinical signs and RNA detection. Both groups presented a low antibody response. With the results of this study, it is possible to conclude that these brazilian varianst presented a pathogenicity very similar to the Massachusetts strains, with respiratoty tropism and are also able to replicate in large quantitties in the digestory and urinary system, but causing only a few or no lesions.

Sumário

1. Introdução	9
2. Objetivos do projeto	15
3. Material e métodos	16
a. Amostras virais	16
b. Isolamento viral <i>in ovo</i>	16
c. Titulação	17
d. Experimento <i>in vivo</i>	17
e. Inibição da atividade ciliar	18
f. Sorologia	18
g. Extração de RNA	18
h. qRT-PCR	18
i. Histopatologia	20
j. Análises estatísticas	20
4. Resultados	20
a. Sinais clínicos	20
b. Lesões macroscópicas	21
c. Lesões microscópicas	22
d. Inibição da atividade ciliar (ciliostase)	24
e. qRT-PCR	26
f. Sorologia	29
5. Discussão	30
6. Conclusão	35
7. Referências bibliográficas	36
8. Anexo 1: Artigo submetido à revista <i>Avian Diseases</i>	46
9. Anexo 2: Aprovação no comitê de ética	73
10. Anexo 3: Declaração	74

1. Introdução

A avicultura brasileira ocupa um espaço expressivo na economia nacional, respondendo por cerca de 1,5% do Produto Interno Bruto (PIB) nacional. Os números da produção brasileira de carne de frango ao final de 2013 foram de 12,30 milhões de toneladas, abaixo de 2012, porém um dos maiores da história do setor. Com este desempenho, o Brasil se posiciona como o terceiro maior produtor e o maior exportador de frangos do mundo. A produção de carne e ovos se concentra no sudeste e sul do Brasil, principalmente nos estados do Paraná, Santa Catarina e São Paulo (ABPA, 2014).

As doenças infecciosas em geral e, em particular, as doenças respiratórias de etiologia viral exercem um impacto significativo em perdas econômicas na avicultura mundial. A introdução desses agentes em criações comerciais é frequentemente seguida de grandes prejuízos, pela sua rápida disseminação, morbidade e mortalidade consideráveis, além da imposição de barreiras comerciais. Um dos fatores que predispõe à fácil transmissão destas doenças é o sistema de criação intensivo das aves no qual uma grande população vive em alta densidade (Jones, 2010a). Assim, a necessidade de estudos sobre estas enfermidades é de grande valia considerando a crescente projeção da indústria avícola brasileira no comércio mundial.

O vírus da bronquite infecciosa das galinhas (infectious bronchitis virus-VBI), membro da família *Coronaviridae* e gênero *Gammacoronavírus* (ICTV, 2012), é agente causador de uma doença respiratória aguda, altamente infecciosa denominada bronquite infecciosa das galinhas (IB). As perdas relacionadas ao VBI, no abatedouro e na produção de ovos, chegam a U\$ 12.705.513,96 por ano em um sistema de integração, fazendo dessa doença a principal causadora de impacto econômico negativo na avicultura do Brasil (Assayag et al., 2012).

Embora o VBI tenha como local primário de replicação o trato respiratório superior, algumas variantes podem também afetar o trato urinário, reprodutor e digestório (Di Fábio & Rossini, 2000). Os sinais clínicos mais comumente observados são respiração ofegante, estertores traqueais, descarga nasal, tosse e

espirros. Além disso, o vírus pode provocar diminuição no ganho de peso, aumento da conversão alimentar, diarreia e queda na produção e qualidade dos ovos. A mortalidade pode ocorrer em aves jovens, devido às manifestações renais ou respiratórias da infecção (Cavanagh e Naqi, 2003; Cavanagh, 2005; Ignjatovic et al., 2006; Cavanagh, 2007).

Ao exame *post mortem* os achados macroscópicos mais frequentes são a presença de exsudato seroso, catarral ou caseoso na traqueia, fossas nasais, brônquios e, eventualmente, sacos aéreos. Em aves de postura, o rompimento dos ovos em formação no interior do oviduto pode provocar o aparecimento de seu conteúdo na cavidade celomática. Quando a cepa possui nefrotropismo, os rins podem apresentar-se pálidos e edemaciados, com deposição de uratos nos ureteres (Lovato, Dezengrini, 2007). Algumas cepas que causam doença respiratória e renal simultaneamente podem não apresentar diferenças quanto às lesões traqueais, quando em comparação com cepas somente respiratórias (Ignjatovic et al., 2002; Albassam et al., 1986; Siller & Cummin, 1974)

No histopatológico nota-se no trato respiratório diminuição dos cílios, com descamação do epitélio, presença de células inflamatórias e edema na mucosa e submucosa. O lúmen traqueal pode conter exsudato sero-mucoso, que pode ou não conter células inflamatórias. No trato urinário observam-se lesões características de nefrite intersticial e os ureteres associados aos rins lesados podem apresentar-se distendidos com uratos (urolitíase). A infecção dos ovidutos pode resultar em diminuição dos cílios das células epiteliais, fibroplasia e edema, presença de focos de infiltrado celular mononuclear. (Di Fábio & Buitrago, 2009).

O VBI é um vírus envelopado com um genoma composto por fita simples de RNA com sentido positivo e simetria helicoidal. Apresenta forma esférica a pleomórfica, envelope com tamanho aproximado de 120 nm de diâmetro e projeções glicoproteicas (espículas) de 20 nm. Seu genoma possui 27.600 nucleotídeos, e codifica três proteínas estruturais majoritárias: a glicoproteína de superfície (S - espícula), a proteína de membrana (M), a do nucleocapsídeo (N); Uma quarta proteína estrutural, denominada pequena proteína de membrana (E), pode estar associada ao envelope viral em pequenas quantidades. O gene do complexo replicase, situado próximo a extremidade 5', ocupa aproximadamente dois terços do

genoma (Cavanagh, 2005; Cavanagh, 2007; Lovato, Dezengrini, 2007). Os anticorpos ligados à inibição da hemaglutinação e a maioria daqueles associados com a neutralização viral (VN) são induzidos pela S1 (uma subunidade da glicoproteína S), tendo esta, papel fundamental no desenvolvimento da imunidade protetora (Ignjatovic et al., 1997).

A BI foi descrita pela primeira vez por Schalk e Hawn nos Estados Unidos em 1931 e teve o VBI estabelecido como seu agente causal em 1936. Hoje mais de 20 variantes dentro do VBI são reconhecidas em todo o mundo (Lee e Jackwood, 2000; Jackwood et al., 2012). A diversidade genética do VBI, resultado de seu curto tempo de geração aliado às altas taxas de mutação e recombinação, facilita sua adaptação em ambientes diversos, tornando o vírus extremamente difícil de ser controlado (Jackwood et al., 2012; Cook et al., 2012). A taxa de mutação do VBI foi calculada em 1,5% por ano. (Lee e Jackwood, 2000). As taxas de mutação de alguns genótipos foram determinadas a partir de cepas de vacinas atenuadas, tais como Massachusetts (1.9×10^3 substituições/sítio/ano), 4/91 (3×10^3 substituições/sítio/ano), DE072 ($1,5 \times 10^2$ substituições/sítio/ano) e Connecticut ($1,5 \times 10^4$ substituições/sítio/ano) (Moya et al., 2000; Jackwood et al., 2012). Algumas variantes tem uma distribuição global, enquanto outras estão restritas à alguns países ou mesmo a somente uma determinada região de um país. Muitas dessas variantes não apresentam importância em termos de doença causada e muitas também não persistem por muito tempo. (Cook et al., 2012)

No Brasil, o VBI detectado pela primeira vez em 1957 foi classificado como pertencente ao sorotipo Massachusetts (Mass). Até 1989 essa era a principal variante circulante no país, porém outros estudos mostram uma ampla diversidade de variantes, antes mesmo da introdução das vacinas vivas (Silva, 2010). Desde 1979 as únicas vacinas permitidas para o uso no país são derivadas do sorotipo Mass, embora ofereça proteção inadequada contra algumas variantes encontradas no Brasil (Cook et al., 1999 e Di Fabio et al., 2000). Ainda na década de 80, foi reportado o isolamento da primeira variante no Brasil (Arkansas) (Branden & Da Silva, 1986). Di Fábio et al., (2000) isolaram pelo menos cinco tipos antigenicamente diferentes de VBI em todo Brasil, principalmente nos grandes polos avícolas, com maior concentração de produtores, na região sul do país. Em 2007, Villareal

identificou isolados brasileiros inseridos em um cluster próximo ao genótipo D274, um vírus europeu não relacionado ao sorotipo Mass. A mesma autora, em 2010 (Villareal et al., 2010), caracterizou variantes provenientes de lotes vacinados contra VBI provenientes de diferentes regiões do Brasil. Além da variante acima mencionada, classificada como BRAZIL (BR), foi detectada a variante 4/91, já descrita na Europa porém até então inédita no Brasil. Devido às diferenças na sequência da glicoproteína S1 entre as variantes encontradas e a cepa vacinal, a autora sugere que o programa de vacinação utilizado no Brasil seja ineficiente para controlar a doença nos plantéis. Ainda, Felipe et al. (2010), ao investigar VBI em galinhas e pombos, demonstrou que a maioria dos isolados brasileiros se agruparam com os genótipos Massachusetts e D207. Também foram detectadas amostras que se agruparam com a variante Connecticut, até então não descrita no Brasil. Recentemente Chacón et al. (2011), em um estudo epidemiológico utilizando amostras das principais regiões produtoras do Brasil, demonstraram a mesma forma de prevalência de variantes brasileiras, denominadas BRAZIL ou BR. Os autores sugerem ainda que este genótipo pode estar presente em países vizinhos, como a Argentina (Rimondi et al., 2009). Esta variante possui grande similaridade com o genótipo D207, descrito primeiramente na Holanda em 1984. A origem desta variante é desconhecida, mas acredita-se que a pressão vacinal pode ter influenciado seu surgimento (Jones, 2010b).

Na Argentina, Chile, Colômbia e México, também foram isoladas e identificadas estirpes variantes do VBI e caracterizadas por análises moleculares e testes de neutralização, embora esses vírus não tenham sido submetidos aos testes de proteção vacinal (Rimondi et al. 2009; Alvarado et al., 2005; Escorcia et al., 2000; Callison et al., 2001; Gelb et al., 2001; Hidalgo et al., 1986).

Na década de 1990, houve o surgimento da estirpe 4/91, de origem europeia e recombinada com a estirpe de referência Massachusetts. Se espalhou para várias partes do mundo, tendo sido detectada também no Brasil (Villareal et al., 2010), exigindo o desenvolvimento de vacinas atenuadas para o seu controle (Gough et al., 1992; Parsons et al., 1992; Le Gros, 1998). Diversas variantes foram reportadas no mundo a partir dos anos 1990, tais como California, DE072, Vic S, N2/75 e QX (Cook et al., 2012).

Na China, a variante mais conhecida e que tem despertado atenção mundial é a variante QX relatada por Yudong et al. (1998). Esta variante foi associada com proventriculite, porém, sem deixar claro se os problemas de proventriculite foram realmente causados pela infecção por este VBI ou por outro fator. Vacinas da estirpe Mass foram utilizadas com sucesso o que garantiu que variantes do VBI não causassem problemas até os anos 1980. Entretanto, em meados dos anos 1990, devido também ao desenvolvimento de novas ferramentas diagnósticas, estudos publicados demonstraram a diversidade de variantes altamente patogênicas do VBI, associadas tanto com patótipos respiratórios como nefropatogênicos, presente naquela região.

Em algumas regiões do mundo, acredita-se que as variantes do VBI evoluam de forma independente em relação ao resto do mundo, devido à sua posição geográfica isolada, como, por exemplo, Austrália e Nova Zelândia (Ignjatovic et al., 2006). Dessa forma, diversas variantes do VBI foram isoladas e caracterizadas desde o início dos anos 60 na Austrália (Cumming et al., 1963). A partir de então, testes de proteção *in vivo* foram realizados com estas variantes (Klieve & Cumming, 1988). Em dois estudos, Ignjatovic et al. (1997; 2006) ao utilizarem dois anticorpos monoclonais dirigidos contra as principais proteínas do VBI juntamente com a análise por sequenciamento, reconheceram diversas linhagens distintas de todas aquelas encontrados em outros lugares do mundo. Pode-se concluir que, existe um grande número de variantes do VBI espalhados pelo mundo, algumas variantes comuns em diversas regiões e outras exclusivas de regiões geográficas específicas (Ignjatovic et al., 2002).

Outros estudos mostram a ocorrência de cepas de VBI pertencentes a outras variantes (Conn e 4/91) no Brasil. Uma explicação proposta é o uso de vacinas vivas importadas contendo vírus desses grupos (Felippe et al., 2010).

McKinley et al. (2008), compararam a glicoproteína S de 12 vacinas diferentes, e em seguida compararam a sequência com vírus isolados de aves vacinadas. Foram encontradas diferenças na sequência da proteína S1 do mesmo sorotipo vacinal de fabricantes diferentes, diferenças na S1 entre amostras vacinais do mesmo fabricante e diferenças intra-vacinais ou quasispecies.

Fraga et al. (2013) comparou as sequências obtidas das amostras variantes brasileiras com sequências de amostras vacinais H120 e obteve valores de similaridade que variaram entre 56,8% a 63,2%. Neste estudo, a maioria das amostras variantes detectadas (89,5%) agruparam junto ao cluster BR-I, mostrando que esse genótipo se espalhou mais do que qualquer outro no Brasil recentemente. O autor também sugere a emergência de um subgrupo denominado BR-II, que aparentemente possui a mesma origem que o grupo BR-I e a divergência relatada provavelmente é relacionada com a disseminação regional deste genótipo no centro-oeste do Brasil, uma região que está distante da grande concentração de granjas no sul do Brasil. Este trabalho ressalta ainda que esta variante não é tão estável como descrito anteriormente por Chacón et al. (2011).

A baixa similaridade genética encontrada entre o genótipo brasileiro e os genótipos de outros países e continentes indica que esta variante evoluiu separadamente dos vírus de outras áreas geográficas.

É demonstrado ainda que ambos os grupos BR-I e BR-II apresentaram inserções de nucleotídeos no gene S1 em comparação com cepas vacinais Mass, que poderiam estar associadas com a ocorrência de doença clínica em lotes vacinados.

A imunidade local apresenta um papel muito importante, como demonstrado por Raj e Jones (1997), que detectaram uma produção local de anticorpos contra VBI no oviduto, e também que esses anticorpos geram menos proteção do que os produzidos na traquéia. Esse mesmo grupo também demonstrou a produção local de anticorpos no duodeno e tonsila cecal. Apesar de existirem grandes diferenças na proteína S1, há epítomos em comum entre as diferentes variantes do VBI, o que confere um certo grau de proteção cruzada (Cavanagh et al., 1997).

A distribuição do vírus, a intensidade dos sintomas, o estabelecimento da resposta imune, a velocidade de distribuição, a persistência do vírus e os tipos de sequelas podem variar de acordo com o hospedeiro, a patogenicidade do vírus e a interação com o meio ambiente, incluindo outros patógenos. Outros fatores podem modificar a susceptibilidade do hospedeiro, como a linhagem, sexo da ave (machos são mais sensíveis que fêmeas), idade e imunidade passiva. Portanto, devido à

diversidade de fatores que alteram a resposta do hospedeiro, é necessário efetuar provas de patogenicidade utilizando aves SPF e em condições controladas (Ito et al., 2006)

Algumas variantes têm uma distribuição global, enquanto outras estão restritas à alguns países ou mesmo à somente uma determinada região de um país. Muitas dessas variantes não apresentam importância em termos de doença causada e muitas também não persistem por muito tempo. (Cook et al., 2012).

Na indústria avícola, as aves normalmente são vacinadas com um dia de vida, no incubatório, via spray. As razões para isso são econômicas, logísticas e também devido à grande prevalência do VBI em diversas partes do mundo. As consequências de uma infecção por VBI são maiores para aves jovens do que aves mais velhas (Cavanagh, 2003). Por essas razões, um estudo experimental visa simular a infecção em aves com um dia de vida, assim como os possíveis efeitos de uma reação vacinal.

2. Objetivos do projeto

A) Gerais

Investigação da patogenicidade de amostras variantes brasileiras (BR) do VBI em frangos de corte.

B) Específicos

- 1) investigar a capacidade da variante BR do VBI em causar lesões utilizando a técnica de histopatologia.
- 2) Investigar o tropismo tecidual da variante BR e quantificar o RNA viral nos diferentes órgãos através da técnica de RT-PCR em tempo real.
- 3) Analisar a produção de anticorpos induzida pela variante BR em frangos de corte.

3. Material e métodos

a. Amostras virais

Os isolados virais utilizados neste estudo foram obtidos por Felipe et al., (2010) no Laboratório de Virologia Animal do Instituto de Biologia da Unicamp. Representam as amostras IBV/BRAZIL/2007/UNICAMP801, isolada de uma amostra coletada na região sul do Brasil e IBV/BRAZIL/2007/UNICAMP810, proveniente da região sudeste. Ambas foram obtidas a partir de aves sintomáticas e se agrupam junto ao genótipo BR-I do VBI. Apesar de pertencerem ao mesmo subgrupo, estes isolados encontram-se em pontos opostos do *cluster*, critério que foi utilizado, juntamente com a diferença geográfica, para a escolha destes dois isolados.

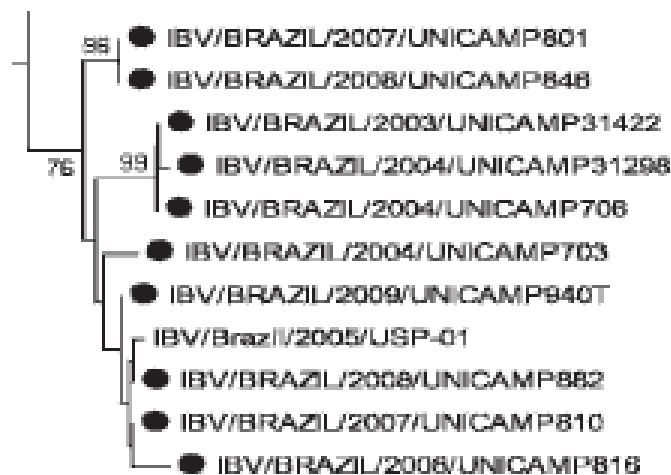


Figura 1: Detalhe de uma árvore filogenética exibindo as amostras 801 e 810

b. Isolamento viral *in ovo*

Para o isolamento viral *in ovo*, as amostras 801 e 810 foram inoculadas via cavidade alantóide na quantidade de 200µl em 5 ovos embrionados SPF com 9 dias de vida e mantidos em estufa a 37°C, sendo observados diariamente em um ovoscópio para verificar sua viabilidade. Após 48 horas da inoculação, 2 ovos foram retirados da estufa e mantidos em refrigerados a 4°C por 12 horas para causar a morte embrionária, e seu líquido alantóide coletado. Os ovos restantes foram mantidos na estufa até o 5º dia pós inoculação, quando então foram retirados para serem refrigerados por 12 horas e em seguida abertos e as lesões características

observadas (nanismo, enrolamento e hemorragia). As passagens em ovos foram repetidas 12 vezes.

c. Titulação

Para a realização da titulação das amostras virais, 6 ovos SPF foram utilizados para cada diluição das amostras, inoculando-se 100µl de suspensão viral por ovo. Foram feitas 7 diluições seriadas graduais, aumentado 0,7 log a cada diluição. Primeiramente foi realizada uma titulação com diluições de 10^{-1} até $10^{-4,8}$, porém foi observado que o maior número de embriões com lesões características ficou situado muito próximo da ultima diluição ($10^{-4,8}$) e devido a isso, foi realizada outra titulação, variando de $10^{-4,1}$ até $10^{-8,3}$. Nesta segunda titulação, observou-se que o título resultante foi próximo de $10^{5,5}$ EID, calculado pelo método de Reed-Muench (1938).

d. Experimento *in vivo*

O experimento *in vivo* foi realizado nas dependências do centro de pesquisas da empresa Biovet. Contando com 3 isoladores, 85 aves nos grupos 801 e 810 foram inoculadas via nasal e ocular com 200µl de suspensão viral no dia zero. O grupo controle, com 34 aves, não foi inoculado. Sendo assim, neste experimento foram utilizadas 204 aves. Os sinais clínicos foram observados diariamente. As necropsias foram realizadas nos dias 2, 4, 5, 7, 9, 11, 14, 21, 28, 35 e 42 pós-inoculação (d.p.i.) As coletas de sangue foram realizadas em todos os dias de necropsia, via punção cardíaca. Os órgãos coletados foram: suabe de seio nasal, suabe cloacal, traqueia, pulmão, rim, íleo, tonsila cecal (coletada a partir do 4º d.p.i.), testículo (coletado a partir do 5º d.p.i.) e pró-ventrículo (coletado entre o 7º e 21º d.p.i.). Todos os órgãos foram imediatamente armazenados em ultrafreezer na temperatura de -80°C e fragmentos do mesmo órgão foram separados para fixação em formol a 8% com o objetivo de confeccionar lâminas histológicas. O sangue, após a retração do coágulo, foi centrifugado para a coleta do soro.

e. Inibição da atividade ciliar

A traquéia inteira de cada ave necropsiada foi removida imediatamente após o sacrifício aos 4, 7, 11, 14 e 21 d.p.i. Da parte superior, mediana e inferior da traquéia, três, quatro e três anéis, respectivamente foram separados e colocados em MEM (Minimal Essential medium) em uma microplaca de 24 poços. Os anéis foram examinados sob o aumento de 100X e foi feito um score para a inibição da atividade ciliar, em uma escala de 0 (100% de atividade) a 4 (sem atividade).

f. Sorologia

Para análise das concentrações de anticorpos da classe IgG específicos contra o VBI secretados nos animais infectados, a partir de amostras de soro coletadas no dia da infecção e no sacrifício dos animais, foi utilizado um ensaio imunoenzimático (ELISA) indireto para a detecção de anticorpos anti-VBI. O método foi realizado conforme as instruções do fabricante (ID Screen®, ID.vet). A leitura dos resultados foi obtida com base na densidade ótica (DO) determinada em espectrofotômetro com comprimento de onda de 450 nm, e os resultados plotados em planilha eletrônica, para posterior confecção de gráfico sobre a dinâmica de produção de IgG anti-VBI nos animais infectados.

g. Extração de RNA

O protocolo utilizado para extração de RNA segue as orientações do fabricante (QIAamp® Viral RNA minikit, Qiagen). Ao *pool* dos mesmos órgãos de cinco aves, coletados de cada grupo, foram adicionados 500µl de meio MEM e em seguida macerado e homogeneizado, seguindo-se a extração. O produto final foi armazenado à temperatura de -80°C.

h. qRT-PCR

A reação de qRT-PCR foi baseada em sondas marcadas com fluorescência VIC. As sequências dos oligonucleotídeos e sondas (tabela 1), foram baseados em

um estudo anterior para a amplificação de um fragmento de 143 pares de base do gene 5'-UTR (Callison et al., 2006). A reação foi realizada com o kit QuantitecProbe RT-PCR (Qiagen) em volume de 25µL contendo 12.5 µl de Master Mix, 0.25 µl de enzima RT, 0.125 µl of cada oligo (500nM de cada oligonucleotídeo), 0.025µl de sonda (100nM de sonda) e 5 µl de RNA. O ciclo utilizado compreende 30 minutos à 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 (denaturação), 1 min a 60°C (extensão e anelamento). As reações foram realizadas no termociclador ABI 7500 (Applied Biosystems, Foster City, USA).

As reações foram realizadas como descrito nos métodos, com o objetivo de gerar a curva padrão e determinar o limite de detecção. A partir destes parâmetros é possível quantificar a carga viral das amostras. Realizando 12 diluições da amostra padrão (H120), é possível garantir que mesmo amostras com baixa carga viral sejam quantificadas. 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 de RNA, obtido após as reação, foi transformado em valores de $\log_{10}$ e representado em gráficos separados por órgãos, possibilitando avaliar a persistência do vírus ao longo dos dias pós infecção e comparar sua distribuição nos diferentes órgãos.

Tabela 1. Primers e sonda que foram utilizados na detecção do VBI.

Primers e sonda	Sequência	Referência
IBV5'GU391	5'-GCT TTT GAG CCT AGC GTT-3'	Callison et al., 2006
IBV5'GL533	5'-GCC ATG TTG TCA CTG TCT ATT G-3'	
IBV5'G probe	5'-VIC-CAC CAC CAG AAC CTG TCA CCT C-MGB-3'	Callison et al., 2006

i. Histopatologia

Após o teste de qRT-PCR, foram selecionados os órgãos coletados nos dias em que houve o pico de replicação viral, sendo avaliados pela técnica de histologia, confeccionando-se lâminas para observação em microscópio. Após a coleta, os órgãos foram imersos em solução tampão PBS para a limpeza do mesmo, sendo logo em seguida colocado em solução de formol tamponado na concentração de 8% por 48 horas. Após esta etapa, os órgãos foram colocados em álcool 70%, aonde podem permanecer indefinidamente até a inclusão em parafina. Após, cortes de 5 µm de espessura serão obtidos através de micrótomo manual (Zeiss) e fixados a lâminas previamente recobertas por poli-lisina. As lâminas foram coradas pela técnica de coloração Hematoxilina-eosina.

j. Análises estatísticas

A análise de variância ANOVA e o teste-t de Student foram utilizados para comparar a quantidade de RNA viral detectada nos grupos inoculados com o grupo controle, assim como entre os grupos inoculados entre si. As diferenças foram consideradas significantes com $P < 0,05$.

4. Resultados

a. Sinais clínicos

Aos 4 dias pós inoculação, os sinais clínicos se tornaram claros, com ruídos respiratórios, acompanhando o aumento de muco traqueal observado na necropsia, além de diarreia, que possivelmente foi causada devido aos efeitos nefropatogênicos desta variante. No 5º d.p.i. foi observado um aumento no número de aves com dispneia, apáticas e com penas arrepiadas e asas abaixadas, em ambos os grupos inoculados (figura 2). Foi notável a diferença de tamanho das aves dos grupos inoculados em relação ao grupo controle. No 7º d.p.i. houve diminuição dos sinais clínicos, permanecendo apenas poucas aves com leve dificuldade respiratória,

porém se alimentando e locomovendo normalmente. Aos 14 d.p.i. os sinais clínicos cessaram completamente.



Figura 2: Aves do grupo 810, 5 d.p.i. apáticas e prostradas

b. Lesões macroscópicas

No trato respiratório, as alterações foram notadas principalmente na forma de hiperemia e exsudato mucoso na traqueia. Não foi possível perceber alterações nos pulmões e sacos aéreos. Os rins, entre o 4º e 7º d.p.i., tornaram-se pálidos, com aumento de volume e ureteres brancos, distendidos com uratos (imagem 2). Nos dias subseqüentes, não se notou mais alterações nos rins. Em algumas aves dos grupos inoculados, os testículos estavam pequenos ou possivelmente atrofiados, acompanhando sinais fenotípicos característicos de aves com desenvolvimento sexual imaturo. Alguns autores associam a miopatia peitoral ao VBI, porém, neste experimento não foram notadas lesões na musculatura peitoral.

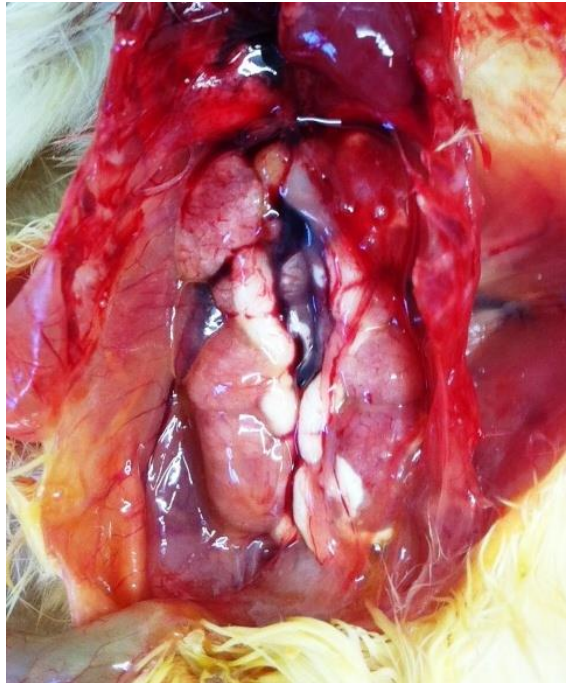


Figura 3: Ave do grupo 810, 4 d.p.i., apresentou rins aumentados, pálidos e ureteres distendidos com uratos.

c. Lesões microscópicas

Congestão moderada, degeneração das células ciliadas pseudoestratificadas e perda dos cílios foram as alterações observadas nos seios nasais de ambos os grupos. As lesões na traquéia foram perda dos cílios nas células ciliadas pseudoestratificadas e congestão moderada. Quando comparados os pulmões, no grupo 801 a alteração observada foi congestão severa difusa, enquanto no grupo 810 houve o mesmo tipo de alteração porém moderada

Nos rins das aves do grupo 801, foram observados infiltrado inflamatório misto na pelve renal, edema moderado, e presença discreta de cilindros hialinos nos túbulos, enquanto nenhuma lesão característica foi observada nas aves do grupo 810.

As lesões observadas no íleo foram discretas, com edema leve na lâmina própria das aves infectadas com a amostra 801, enquanto nenhuma lesão característica foi observada nas aves infectadas pela amostra 810. Nenhuma lesão

característica foi observada no pró-ventrículo, testículo e tonsila cecal em ambos os grupos inoculados e em nenhum órgão do grupo controle.

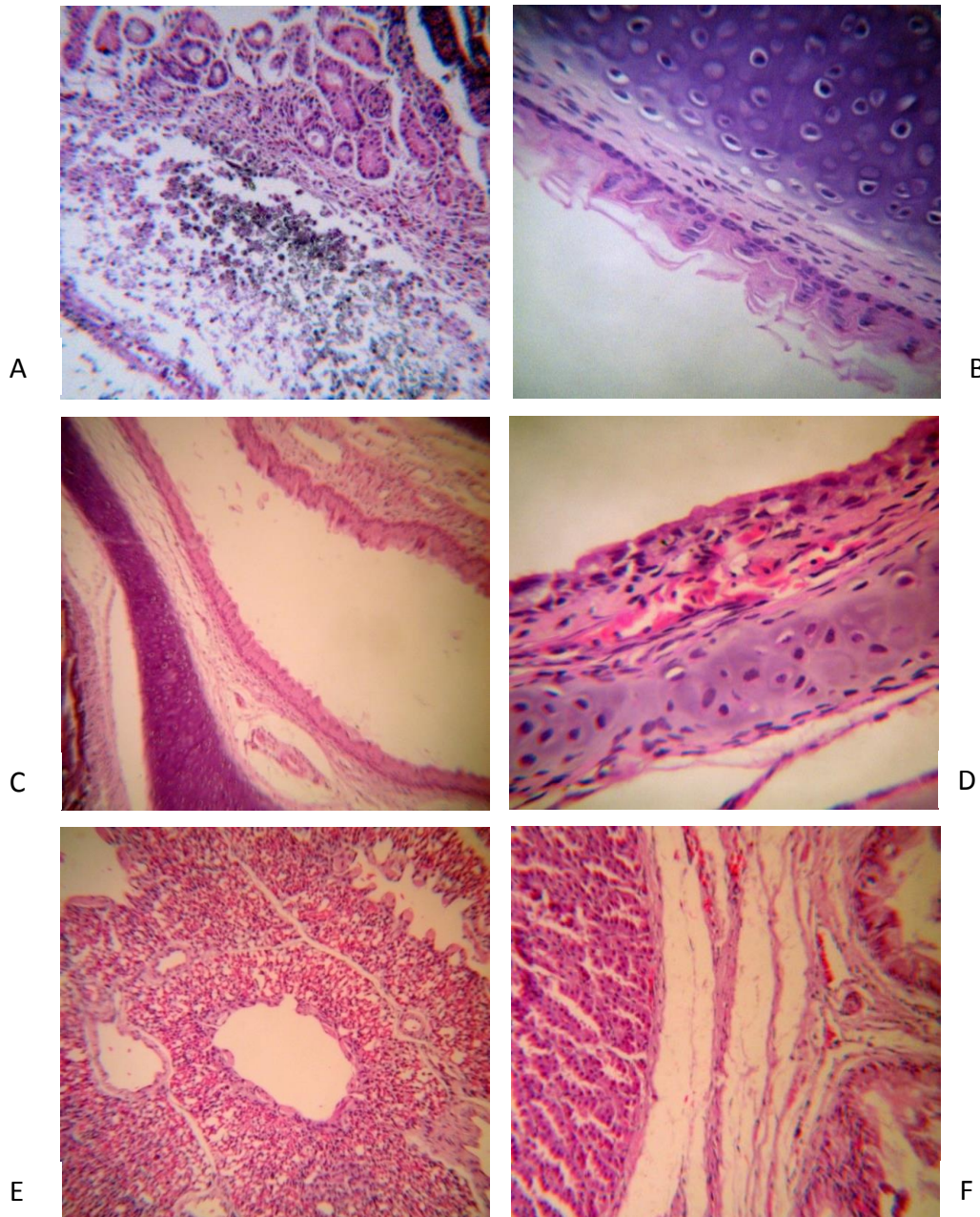


figura 4: Lesões microscópicas. A) Rim, 5 d.p.i.: Infiltrado inflamatório misto na pelve renal; Edema moderado intertubular, discretos cilindros hialinos intratubulares e congestão moderada. B) Seio nasal, 5 d.p.i.: Congestão discreta; Descamação do epitélio pseudoestratificado cilíndrico ciliado e ausência de cílios. C) Seio nasal, 2 d.p.i.: Congestão discreta; Descamação do epitélio pseudoestratificado cilíndrico ciliado e ausência de cílios. D) Traquéia, 7 d.p.i.: Ausência de cílios no epitélio pseudoestratificado cilíndrico ciliado e

congestão moderada. E) Pulmão, 7 d.p.i.: Congestão severa difusa. F) Íleo, 11 d.p.i.: Congestão moderada.

d. Inibição da atividade ciliar (ciliostase)

Este teste é realizado com o objetivo de se representar a patogenicidade de uma amostra em anéis de traquéia. Conforme a porcentagem da atividade ciliar observada nos dias posteriores à inoculação (tabela 1), foram atribuídos *scores* para a inibição causada pelo vírus (figura 5). Na tabela 1, 0% significa nenhuma atividade ciliar, enquanto 100% significa atividade ciliar normal. A partir destas porcentagens, foram definidos os scores, em uma escala de 0 (100% de atividade ciliar) a 4 (nenhuma atividade ciliar). Em ambos os grupos, houve uma alta porcentagem de inibição nos primeiros dias, seguida de um reestabelecimento gradual na atividade ciliar, observado principalmente no 21^o d.p.i. No entanto, pela somatória dos *scores*, e a análise do gráfico, é possível observar que o grupo 801 apresentou ciliostase completa durante dois dias de coleta de anéis de traquéia, enquanto que no grupo 810 a inibição da atividade ciliar não ultrapassou os 50%. Considerando os dois grupos, o pico de inibição da atividade ciliar se deu entre o 7 e 9 d.p.i.

Tabela 2. Atividade ciliar. 0% significa nenhuma atividade ciliar. 100% significa atividade ciliar normal.

	801	810	Controle
4 d.p.i.	25%	50%	100%
7 d.p.i.	0%	50%	100%
9 d.p.i.	0%	25%	100%
11 d.p.i.	25%	25%	100%
14 d.p.i.	50%	50%	100%
21 d.p.i.	100%	100%	100%

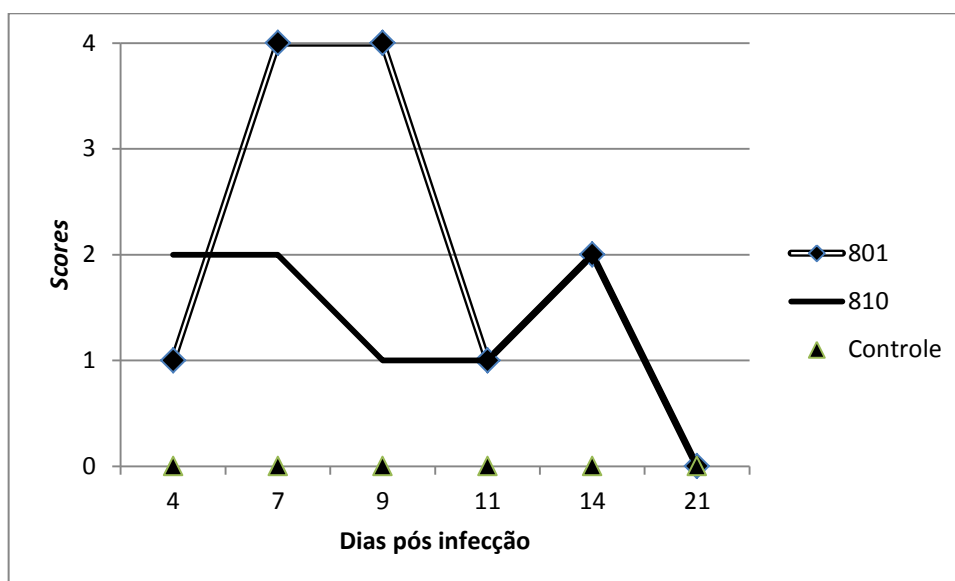
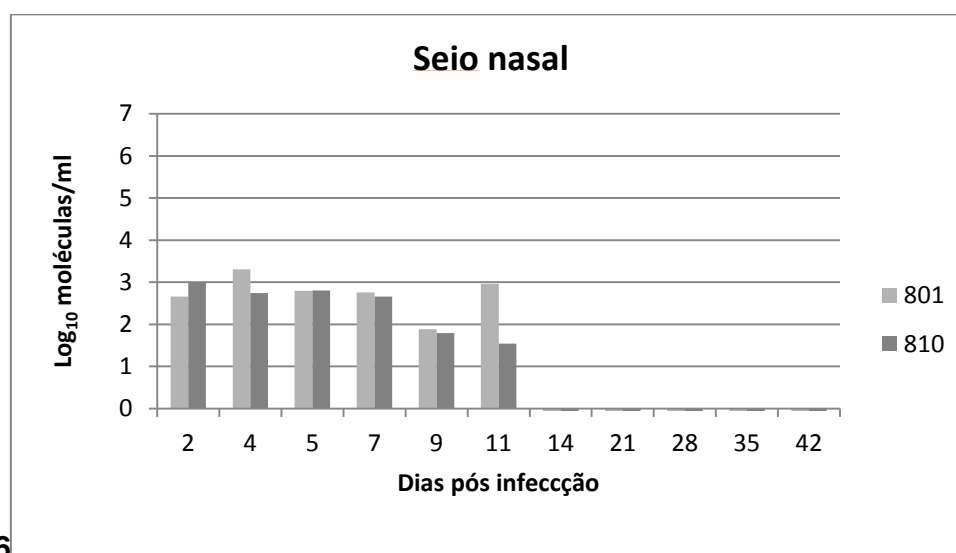
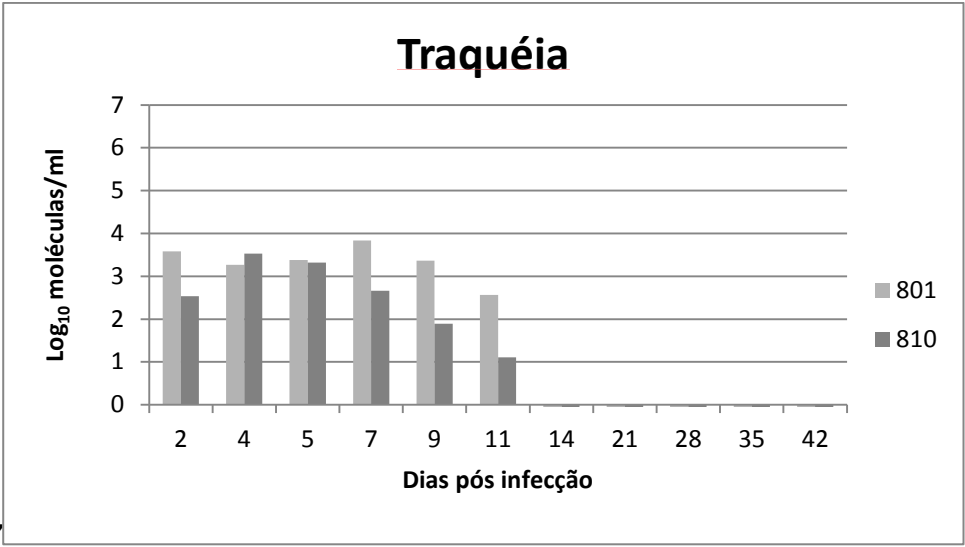


Figura 5: Scores das amostras no teste da ciliostase, em uma escala de 0 (100% de atividade ciliar) a 4 (nenhuma atividade ciliar)

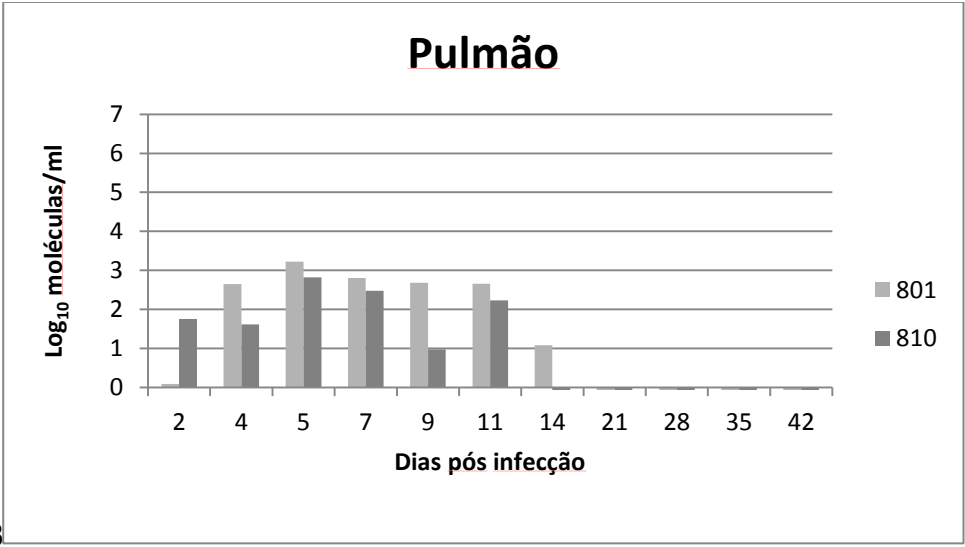
e. qRT-PCR

Os órgãos do trato respiratório foram os sítios de replicação primária. Mesmo não havendo diferença estatística significativa entre as duas amostras, o grupo 801 apresentou em alguns órgãos, valores de log maiores em comparação com a amostra 810. O pico de replicação se deu entre os dias 2 e 4 d.p.i. para seio nasal e traquéia, enquanto que no pulmão, o pico de replicação se deu no 5º d.p.i. para ambas as amostras. Foi possível detectar RNA viral até 11 d.p.i. no seio nasal e traquéia e até o 14º dia no pulmão. A detecção de RNA nos rins obteve os resultados mais altos no 5º dpi para o grupo 801 e no 7º dpi para o grupo 810. Os maiores valores foram detectados na cloaca e tonsila cecal e íleo, sendo que nesses órgãos houve persistência viral até 42 dpi. A detecção no íleo ocorreu de maneira irregular em comparação com os outros órgãos, oscilando entre altas e baixas quantidades de RNA ao longo dos dias de experimento. O pró-ventrículo, junto com pulmão e seio nasal, foram os órgãos que obtiveram os menores valores de RNA detectado (figuras de 6 a 14)

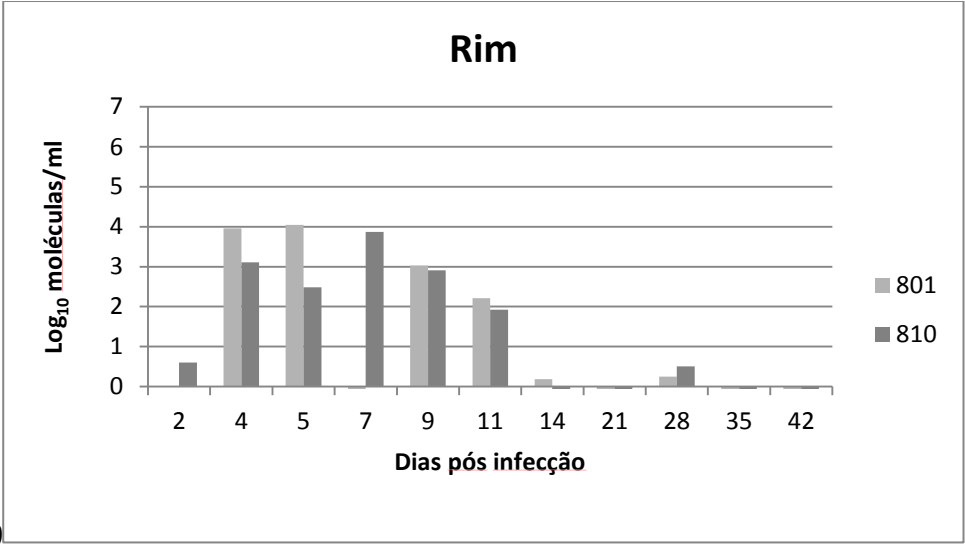




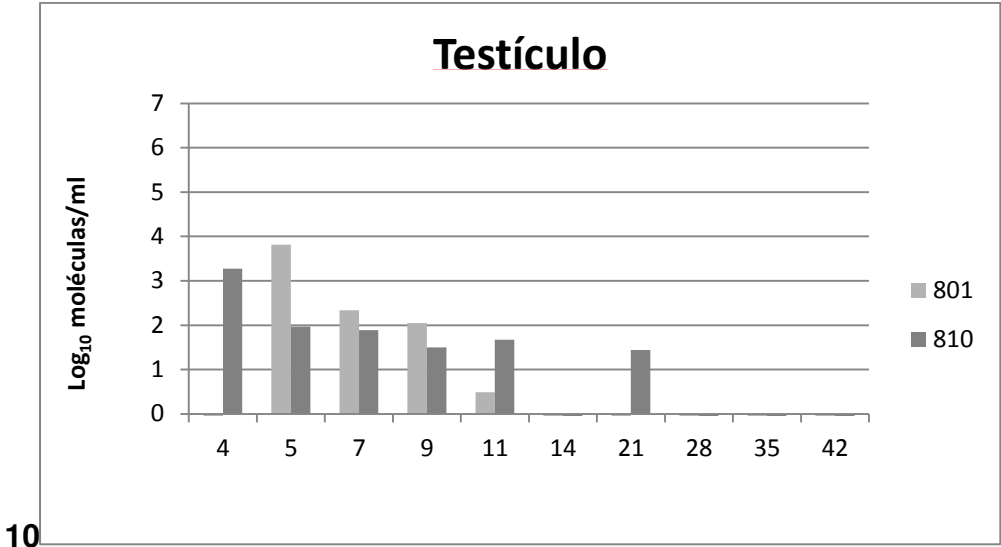
7



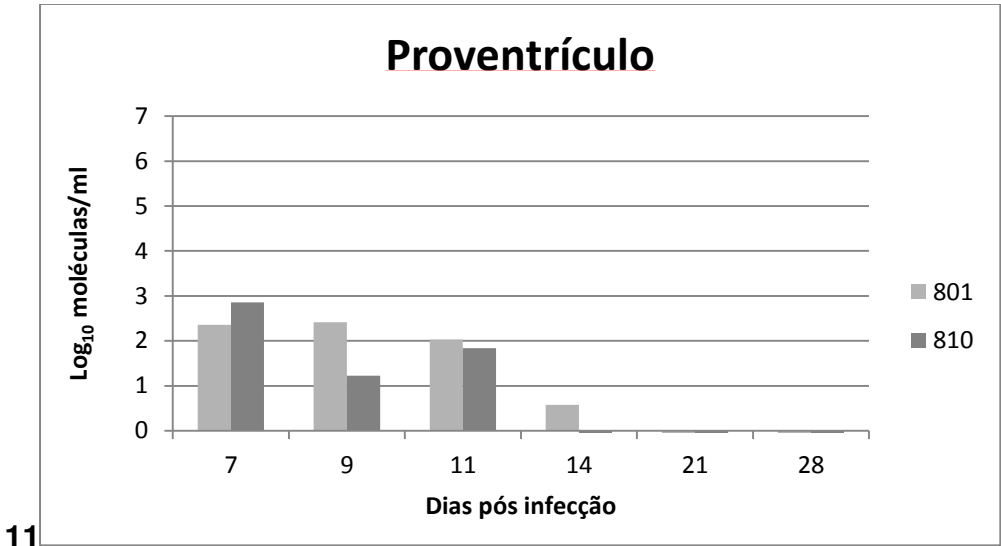
8



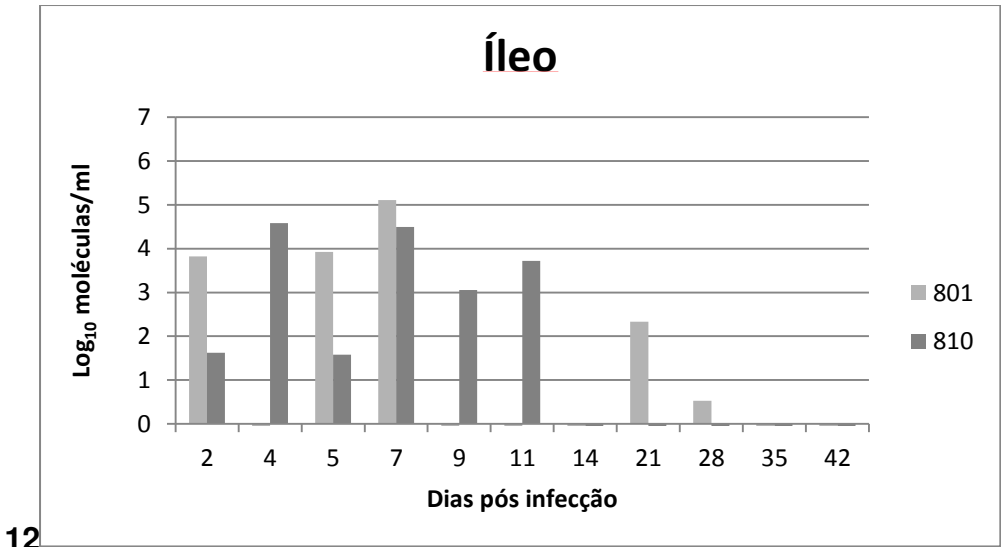
9



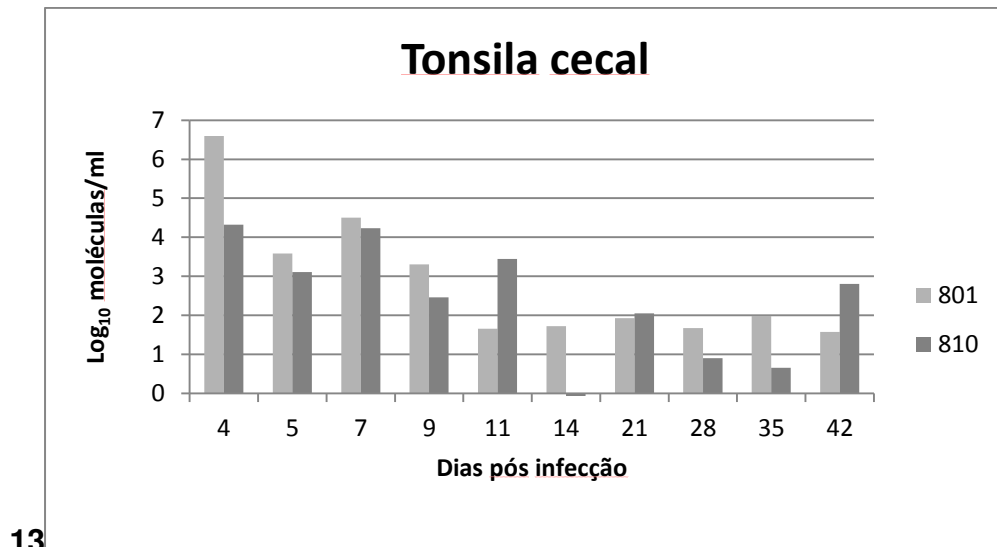
10



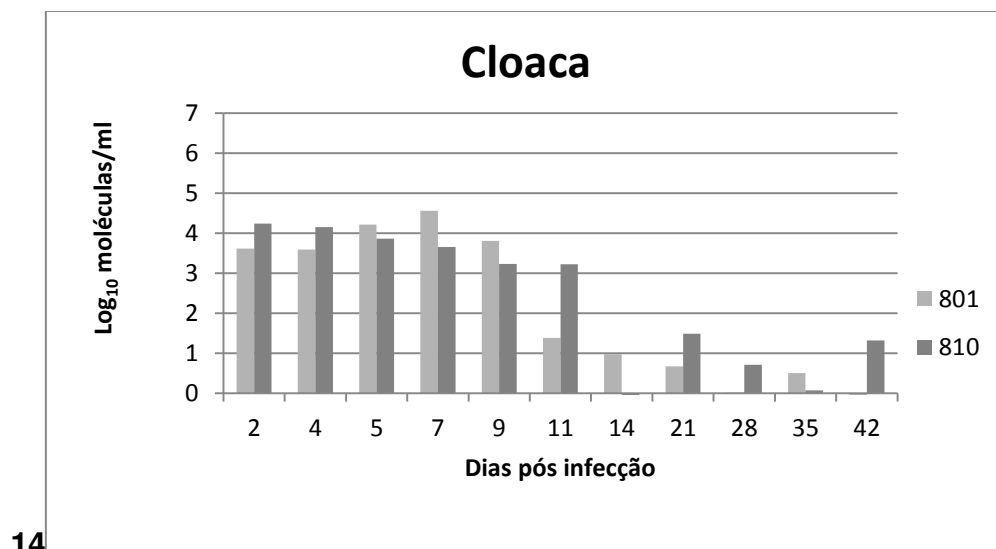
11



12



13



14

Figuras de 6 a 14: Detecção de RNA viral por RT-PCR em tempo real. Não houve detecção de RNA em nenhuma amostra do grupo controle.

f. Sorologia

Ambos os grupos geraram uma baixa resposta de produção de anticorpos. O grupo inoculado com a amostra 810 obteve valores maiores de título de anticorpos em comparação com o grupo 801, que mostrou valor positivo somente após o 28º d.p.i. Ambos os grupos mantiveram títulos detectáveis até o 42º dpi e atingiram o título máximo de aproximadamente $3 \times 10^2 \log_{10}$ aos 35 dpi (grupo 801) e 21 dpi (grupo 810). As análises estatísticas mostraram que o aumento no título de

anticorpos não foi significativa, para ambos os grupos em relação ao grupo controle e quando comparados os dois grupos inoculados. Os resultados mostraram ausência de anticorpos no grupo não inoculado. (Figura 15)

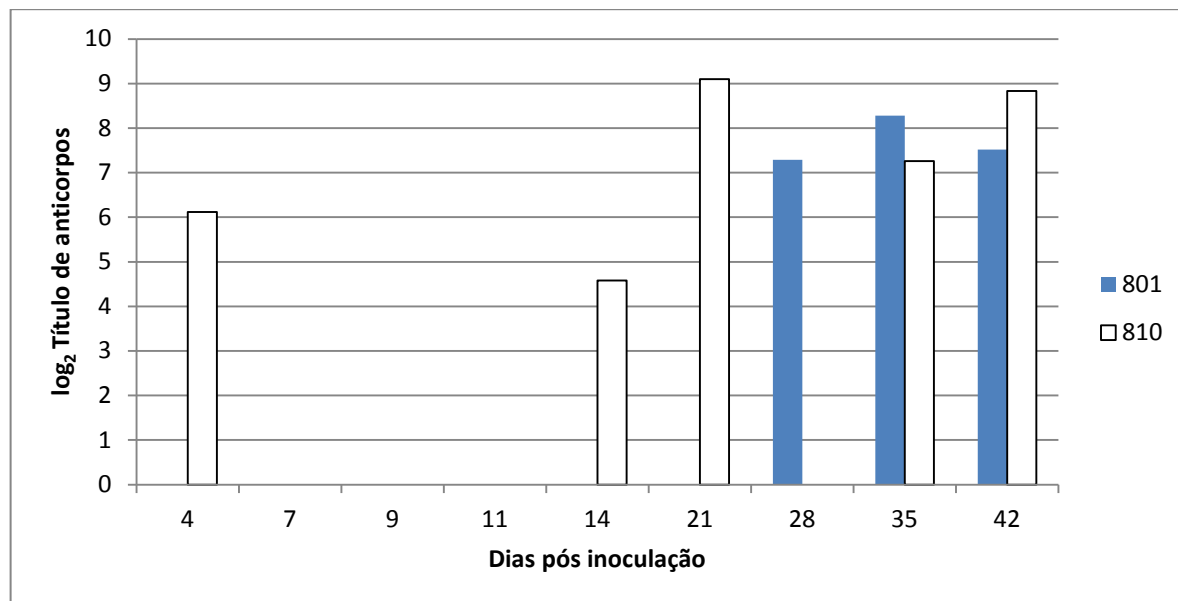


Figura 15: Resposta imune humoral induzida pelas amostras 801 e 810 inoculadas nas aves de 1 dia.

Tabela 3. Absorbância do teste de ELISA (média+/-desvio padrão)

D.p.i.	4	7	9	11	14	21	28	35	42
801							0,107+/- 0,086	0,128+/- 0,057	0,111+/- 0,036
810	0,094+/- 0,003				0,087+/- 0,019	0,158+/- 0,004		0,106+/- 0,024	0,146+/- 0,059

5. Discussão

A susceptibilidade e os sinais clínicos observados foram semelhantes aos já relatados sobre outras variantes quando replicadas em tecidos dos órgãos

respiratórios, com duração de 5 a 7 dias e desaparecimento entre 10 a 14 dias, com baixa mortalidade (Dhinaker et al., 1997, Otsuki *et al*, 1990). No presente experimento, os sinais duraram aproximadamente 8 dias e desapareceram totalmente aos 14 dpi em ambos os grupos inoculados. No experimento conduzido por Fan et al. (2012), os sintomas respiratórios se tornaram óbvios no 4º d.p.i. e duraram até o 8º d.p.i. Aos 11 d.p.i apenas sinais respiratórios leves foram observados. No entanto, a dinâmica da distribuição do vírus nos órgãos ao longo dos dias foi diferente, no que se refere ao pico de replicação e persistência.

Em algumas aves dos grupos inoculados, os testículos estavam pequenos ou possivelmente atrofiados, acompanhando sinais fenotípicos característicos de aves com desenvolvimento sexual imaturo. Porém, ao exame histopatológico, compatível com aves de até 40 dias.

No presente experimento, os achados histológicos e de detecção viral estão de acordo com um estudo recente que relatou doença respiratória similar em galinhas infectadas com duas amostras variantes brasileiras do subgrupo BR-I, uma de origem entérica e outra de origem respiratória (Chacón et al., 2014). No experimento citado, os sinais foram predominantemente respiratórios e se manifestaram entre 4 e 8 d.p.i nas aves SPF.

Somente algumas variantes de VBI causam lesões no pró-ventrículo. No presente estudo, não foram encontradas lesões microscópicas nesse órgão. Yu et al. (2001), como exemplo, estudou a patogênese de três isolados de pró-ventrículo e a infecção experimental resultou em lesões neste órgão e mortalidade, principalmente com duas semanas de idade.

Chacón et al. (2014) encontraram lesões microscópicas com mais severidade e frequência na traquéia do que em qualquer outro tecido. Neste órgão, edema de mucosa e submucosa, hiperplasia e vacuolização do epitélio traquéia são as alterações mais comumente observadas ao exame histopatológico. (Cubillos et al., 2007)

Confirmando outros relatos que mostram a habilidade do VBI em se replicar em células epiteliais de diversos órgãos mas indicando a traquéia como sítio de replicação primária (Chousalkar et al., 2007, Fan et al., 2012; Raj and Jones, 1997),

este estudo apresenta duas amostras de variante brasileira que causaram lesões microscópicas severas somente no trato respiratório e moderadas a leve nos outros órgãos. Deve ser ressaltado, porém, que o RNA viral foi detectado em todos os outros tecidos coletados. As diferenças na patogenicidade entre as amostras não foram perceptíveis na análise visual, compreensível por pertencerem ao mesmo subgrupo, chamado de BR-I. Contudo, analisando os gráficos dos teste de qRT-PCR e ciliostase, percebe-se maiores quantidades de RNA detectado e maior inibição da atividade ciliar resultante da infecção pela amostra 801. Nenhuma diferença significativa entre as amostras foi encontrada na análise estatística, tanto na avaliação dos resultados do Real time PCR quanto na avaliação dos títulos de anticorpos

Naqi et al. (apud por Cook et al., 2012) demonstrou que o VBI pode persistir na traquéia e cloaca por até 77 dias, assim como na tonsila cecal, já descrita por outros autores como um importante sítio de persistência (Raj e Jones, 1996). Em pequenos grupos experimentais, é comum encontrar o vírus somente até poucas semanas após a infecção, enquanto que em lotes comerciais, pode haver uma constante eliminação e reinfecção. Não deve ser descartada a idéia de que um lote clinicamente normal pode ser uma fonte de infecção, ao continuar excretando o vírus. A excreção do vírus pode ocorrer mesmo na presença de altos títulos de anticorpos (Jones e Ambau, 1987). Lucio e Fabricant (1990) obtiveram isolamento por períodos mais prolongados no rim e tonsila cecal e o isolamento mais tardio na porção distal do trato alimentar.

O tropismo tecidual e a persistência da infecção podem variar dependendo da idade das aves (Raj e Jones, 1996). Naqi sugere que para a cepa Mass, a persistência da infecção não resulta em mudanças na sequência de nucleotídeos do gene S1 ou no tropismo tecidual. Para a variante BR, ainda são necessários estudos acerca dessa hipótese.

A presença de RNA viral no intestino foi detectada nesse estudo, mas a falta de lesões microscópicas indica que estas cepas não são patogênicas para o trato gastrointestinal. Além de Chacón et al (2014), estes resultados também são consistentes com Benyeda et al. (2009) e Benyeda et al. (2010), que encontraram

replicação viral, mas não lesões macroscópicas e microscópicas no intestino e pró-ventrículo após infecção com as cepas M41, 793B e QX.

A infecção por VBI em frangos jovens pode causar danos irreversíveis e severos no ovário e ovidutos imaturos (Cavanagh e Gelb, 2008), mas aparentemente, o trato reprodutor dos machos é menos susceptível do que os das fêmeas. A ausência de lesões microscópicas no testículo pode ser explicada pela idade jovem das aves. A mitose intensiva do epitélio ciliado nos machos adultos poderia favorecer uma intensa multiplicação viral e consequentemente alterações histopatológicas (Chacón et al., 2014). No estudo experimental conduzido por Terregino et al., (2008) com a variante QX, não houve lesões microscópicas nos ovários e ovidutos. A razão para isso seria o tempo de coleta dos órgãos, que necessitam de algumas semanas para apresentarem lesões. No estudo experimental conduzido por Ignjatovic et al. (2002), as cepas que induziram nefrite severa também induziram lesões macroscópicas nos rins e alta mortalidade. No presente estudo, a infecção causou lesões macroscópicas nos rins, com alterações moderadas no exame histopatológico.

A ciliostase traqueal induzida pela infecção por VBI é um parâmetro usado com sucesso para verificar a severidade de uma infecção respiratória por alguma amostra de VBI, e seus resultados também refletem a diferença da susceptibilidade ao VBI entre diferentes linhagens de aves (Benyeda et al., 2009; Cubillos et al., 1991; Otsuki et al., 1990). No experimento conduzido por Otsuki et al. (1990), houve diferença entre as duas linhagens testadas no que se refere ao tempo de recuperação dos movimentos ciliares da traquéia. Em uma delas a porção superior da traquéia levou mais tempo para a regeneração do que a porção inferior, enquanto a outra linhagem apresentou uma recuperação dos movimentos ciliares de toda a traquéia ao mesmo tempo. Além de induzir lesões histopatológicas, a infecção experimental deste presente estudo mostrou que ambas as amostras foram capazes de causar ciliostase. A amostra 801 no entanto, mostrou-se mais patogênica, atingindo 100% de inibição da atividade ciliar por pelo menos três dias, enquanto a amostra 810 atingiu 50% no seu pico de inibição da atividade ciliar.

Sinais clínicos respiratórios característicos são causados pela replicação do VBI nos tecidos respiratórios, como traquéia e pulmões (Boltz et al., 2004; Benyeda

et al., 2009; Cavanagh, 2003). Altos níveis de RNA viral foram detectados nos seios nasais, traquéia e pulmões, em concordância com os sinais clínicos e alterações microscópicas que indicam replicação viral nesses tecidos.

O VBI também se replica nas células do trato alimentar (Boltz et al., 2004; Benyeda et al., 2009), muitas vezes sem nenhum efeito clínico (Ambali and Jones, 1990). De forma similar, neste presente estudo, o RNA viral foi detectado em amostras de íleo, tonsila cecal e suabe cloacal, em altos níveis e até o último dia de amostragem, porém apenas com alterações histopatológicas leves no íleo e nenhuma na tonsila cecal.

O VBI é um vírus pouco imunogênico para a geração de resposta humoral. Quando inoculados experimentalmente, poucas aves desenvolvem anticorpos e 10% permanecem sorologicamente negativas (Cavanagh, 2003). Não são liberados por brotamento, mas somente após a morte da célula. Como replicam primeiramente nas vias aéreas superiores, são expectorados ou eliminados por espirros após a descamação das células mortas, impedindo desta forma o reconhecimento pelos linfócitos B. Devido a isso, a resposta humoral é baixa e inconsistente, explicando em parte a baixa resposta de anticorpos obtida no presente estudo. Porém, no caso de vírus mais invasivos, obtém-se uma resposta mais elevada de anticorpos séricos. Quanto mais extensivamente um tecido for lesado, maior será a resposta humoral e celular (Ito et al., 2006).

Utilizando o método ELISA, quando uma ave é inoculada com um vírus virulento, a resposta de anticorpos tem início 6 dias após a infecção com pico de resposta aos 21 dias e declínio subsequente (Cavanagh, 2003). Aves mais velhas são mais imunocompetentes, o que leva a uma persistência menor do vírus em alguns órgãos (Raj e Jones, 1996).

Durante a infecção aguda, o VBI induz uma resposta específica de linfócitos T citotóxicos. Essa resposta pode ser mais correlacionada com o declínio inicial da carga viral do que a resposta humoral subsequente. A resposta celular declina após o aparecimento da resposta imune humoral (Seo e Collison, 1997). No experimento realizado pelos autores citados, o nível de anticorpos IgG permaneceu baixo até o 15º d.p.i. A presença ou ausência de anticorpos no soro não está correlacionada

com proteção, ou seja, galinhas vacinadas podem estar protegidas contra o VBI independente do título de anticorpos no soro (Cavanagh, 2003).

O uso de vacinas homólogas a esta variante se faz necessário e tem sido recomendado devido à sua prevalência já demonstrada em diversos estudos epidemiológicos. Um programa de vacinação que contenha duas cepas antigenicamente diferentes pode gerar uma proteção mais abrangente, quando administradas em um intervalo de duas semanas (Terregino et al. 2008). Vacinas contra novos sorotipos têm sido desenvolvidas, indicadas e utilizadas regionalmente nos Estados Unidos somente quando confirmada a presença deste novo sorotipo (Ito et al., 2006). Quando vírus vacinais passam a co-circular com vírus de campo nas granjas, ocorre uma disseminação do vírus vacinal, que em dado momento pode estar causando a doença, além da dificuldade do isolamento, se necessário, e causar uma situação epidemiológica confusa na população avícola, devido às diferentes manifestações da doença. (Farsang et al. 2010). Vacinas vivas de VBI com altos títulos podem conter mais de uma variante genética e a vacinação das aves resulta na seleção da subpopulação viral mais adaptável, assim como o surgimento de mutações (McKinley et al., 2008).

6. Conclusão

Este estudo demonstrou que as duas amostras variantes inoculadas em aves SPF sob condições experimentais produziram predominantemente doença respiratória, confirmada pelos sinais clínicos, detecção de RNA e alterações histopatológicas. As maiores quantidades e mais longa persistência de detecção de RNA viral foram encontradas nas amostras entéricas, no entanto, resultando em poucas ou nenhuma alteração histopatológica nesses órgãos, assim como a sorologia resultou em uma baixa imunidade humoral. A introdução de vacinas variantes deve ser realizada com cautela, sendo utilizada somente em regiões onde este vírus esteja presente, pois em um dado momento a recombinação entre a vacina e um vírus de campo, ou mesmo a reversão da virulência pode levar à

doença clínica, com características exibidas neste trabalho e semelhantes às de outras variantes do VBI.

7. Referências bibliográficas

- Albassam, M. A., Winterfield, R. W., Thacker, H. L (1986) Comparison of the nephropathogenicity of four strains of infectious bronchitis vírus. Avian diseases, 30, 468-476
- Alvarado, I. R.; Villegas, P.; Mossos, N.; Jackwood, M. W. Molecular characterization of avian infectious bronchitis virus strains isolated in Colombia during 2003. Avian Disease, 49: 494-499. 2005
- Ambali, A.G. & Jones, R.C. Early pathogenesis of an enterotropic variant of infectious bronchitis virus in chickens. Avian Diseases, 34: 809-81. 1990.
- Assayag Jr., M.S; Chacón, J.L.V; Ferreira, A.P. (2012) Economical impact of infectious bronchitis in a poultry integration system. VII International Symposium on Avian Corona- and Pneumoviruses and complicating pathogens. Rauschholzhausen, Alemanha.
- Associação Brasileira de Proteína Animal (ABPA). <http://www.ubabef.com.br> acesso em 29/01/2015.
- Benyeda, Zsófia; Mató, Tamás; Süveges, Tibor; Szabó, Éva; Kardi, Veronika; Abonyi-Tóth, Zsolt; Rusvai, Miklós; and Palya, Vilmos (2009) 'Comparison of the pathogenicity of QX-like, M41 and 793/B infectious bronchitis strains from different pathological conditions', Avian Pathology, 38: 6, 449 — 456

- Benyeda, Z et al., Comparative Histopathology and Immunohistochemistry of QX-like, Massachusetts and 793/B Serotypes of Infectious Bronchitis Virus Infection in Chickens, *Journal of Comparative Pathology* (2010), doi:10.1016/j.jcpa.2010.04.
- Boltz D.A., Nakai M., Bahra J.M., 2004. Avian infectious bronchitis virus: a possible cause of reduced fertility in the rooster, *Avian Dis.* 48:909–915.
- Branden, R.C.; Da Silva, E. N. Ocurrencia de “nuevos” serotipos de bronquites infecciosa en Brasil. In *Proceedings of VI Seminario Internacional de Patologia aviar*, 6., Athens, GA, USA. 1986
- Callison, S. A., Hilt, D. A., Boynton, T. O., Sample, B. F., RolBson, R., Swayne, D. E., and Jackwood, M. W. (2006). 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* 138, 60-65.
- Callison, S.A.; Jackwood, M.W.; Hilt, D.A. Molecular characterization of infectious bronchitis virus isolates foreign to the United States and comparison with United States isolates. *Avian Disease*, 45: 492-9. 2001.
- Cavanagh, D. & Gelb, J. (2008) Infectious bronchitis, in: Saif, Y.M., Barnes, H.J. Glisson, J.R., Fadly, A.M., McDougald, L.R. & Swayne, D.E. (Eds) *Diseases of Poultry*, pp. 117-135 (Ames, Iowa State University Press).
- Cavanagh, D. (2007) Coronavirus avian infectious bronchitis virus. *Veterinary Research*; 38:281-297.

- Cavanagh, D. (2005) Coronaviruses in poultry and other IBrds. *Avian Pathology*, 34(6):439-448.
- Cavanagh, D; Naqi, S. (2003) Infectious bronchitis. In: Said, Y.M; Barnes, H.J; Glisson, J.R; Fadly, A.M; McDougald, L.R; Swayne, D.E (eds) *Diseases of the poultry*. Iowa State Press, Ames, 101-119.
- Cavanagh, D. (2003) Severe acute respiratory syndrome vaccine development: experiences of vaccination against avian infectious bronchitis coronavirus, *Avian Pathology*, 32:6, 567-582
- Cavanagh, D., Ellis, M.M. & Cook, J.K.A. (1997). Relationship between sequence variation in the S1 spike protein of infectious bronchitis virus and the extent of cross-protection in vivo. *Avian Pathology*, 26, 63_74.
- Chacón, J. L; Assayag, M. S; JR., L. Revolledo, C. S. Astolfi-Ferreira, M. P. Vejarano, R. C. Jones & A. J. Piantino Ferreira (2014): Pathogenicity and molecular characteristics of infectious bronchitis virus (VBI) strains isolated from broilers showing diarrhoea and respiratory disease, *British Poultry Science*
- Chacón, Jorge Luis , Rodrigues, Juliana Nogueira , Assayag Júnior, Mario Sergio , Peloso, Camila , Pedroso, Antonio C. and Piantino Ferreira, Antonio J. (2011) 'Epidemiological survey and molecular characterization of avian infectious bronchitis virus in Brazil between 2003 and 2009', *Avian Pathology*, 40: 2,153— 162
- Chousalkar, K. K; Roberts, J. R; Reece, R. (2007) Histopathology of Two Serotypes of Infectious Bronchitis Virus in Laying Hens Vaccinated in the Rearing Phase. *Poultry Science*. 89:59-62

- Cook, J. K. A; M. Jackwood & R. C. Jones (2012): The long view: 40 years of infectious bronchitis research, *Avian Pathology*, 41:3, 239-250
- Cook, J.K.A., Orbell, S.J., Woods, M.A. & Huggins, M.B. (1999). 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*, 28, 477_485.
- Cubillos, A; Ulloa, J; Cubillos, V; Cook, J. (1991) Characterisation of strains of infectious bronchitis virus isolated in Chile, *Avian Pathology*, 20:1,85-99
- Cumming, R.B. Infectious avian nephrosis (uraemia) in Australia. *Australia Jornal of Veterinary*, 39: 360. 1963.
- de Wit, J. J; Jane K. A. Cook & Harold M. J. F. van der Heijden (2011): Infectious bronchitis virus variants: a review of the history, current situation and control measures, *Avian Pathology*, 40:3, 223-235
- Di Fábio J; Buitrago L. Y. B. (2009). Bronquite infecciosa das galinhas. In: Berchieri A. Jr.,Silva E. N., Di Fábio J., Sesti L., Zuanaze M. A. F., editors. *Doenças das aves*. 2ª ed. Campinas, Brazil: Facta; 2009. p. 631-648.
- Di Fábio, J; Rossini, L. I. (2000) Bronquite infecciosa das galinhas, in Berchieri Junior, A; Macari, M. *Doenças das aves*, 1 edição, editora Facta
- Di Fabio, J., Rossini, L.I., Orbell, S.J., Paul, G., Huggins, M.B., Malo, A., et al. (2000). Characterization of infectious bronchitis viruses isolated from outbreaks of disease in commercial flocks in Brazil. *Avian Diseases*, 44, 582_589.

- Dhinaker-Raj, G., and R. C. Jones. 1997. Infectious bronchitis virus: immunopathogenesis of infection in the chicken. *Avian Pathol.* 26:677-706.
- Escorcia, M.; Jackwood, M. W.; Lucio, B.; Petrone, V. M.; Lopez, C.; Fehervari, T. & Tellez, G. Characterization of Mexican strains of avian infectious bronchitis isolated during 1997. *Avian Disease*, 44: 944-947. 2000.
- Fan, W.Q., Wang, H.N., Zhang, Y., Guan, Z.B., Wang, T., Xu, C.W., Zhang, A.Y., Yang, X., 2012. Comparative dynamic distribution of avian infectious bronchitis virus M41, H120, and SAIBK strains by quantitative real-time RT-PCR in SPF chickens. *Biosci Biotechnol Biochem* 76, 2255-60.
- Fabricant, J. (2000) The Early History of Infectious Bronchitis. *Avian diseases*, Vol. 42, No 4, p. 648-650.
- Farsang, A., C. Ros, L. H. Renstrom, C. Baule, T. Soos, and S. Belak. (2002). Molecular epizootiology of infectious bronchitis virus in Sweden indicating the involvement of a vaccine strain. *Avian Pathol.* 31:229–236.
- Felippe, P. A. N.; da Silva, L. H. A; Santos, M. M. A. B; Spilki, F. R.; Arns, C. W. (2010) Genetic Diversity of Avian Infectious Bronchitis Virus Isolated from Domestic Chicken Flocks and Coronaviruses from Feral Pigeons in Brazil Between 2003 and 2009. *Avian diseases* 54:1191–1196, 2010
- Fraga, A. P; Eder Balestrin, Nilo Ikuta; Andre Salvador Kazantzi Fonseca, Fernando Rosado Spilki; Cláudio Wageck Canal, and Vagner Ricardo Lunge. Emergence of a New Genotype of Avian Infectious Bronchitis Virus in Brazil. *avian diseases*, 57:225–232, 2013

- Gelb, J.; Ladman, B.S.; Tamayo, M.; Gonzalez, M.; Sivanandan, V. Novel infectious bronchitis virus S1 genotypes in Mexico 1998-1999. *Avian Diseases*, 45: 1060-1063. 2001.
- Gough, R. E.; Randall, C. J.; Dagless, M.; Alexander, D. J.; Cox, W. J.; Pearson, D. A “new” strain of infectious bronchitis virus infecting domestic fowl in Great Britain. *Veterinary Rec.*, 22: 493-494. 1992.
- Hidalgo H, Gallardo R, Toro H. Antigenic and pathogenic properties of three isolates of infectious bronchitis virus obtained from vaccinated chickens. *Journal of Veterinary Medicine* 1986; 33:26-35
- Ignjatovic J, Sapats SI, Ashton F. A long-term study of Australian infectious bronchitis viruses indicates a major antigenic change in recently isolated strains. *Avian Pathology*. 1997; 26:535-552.
- Ignjatovic, J; D. F. Ashton, R. Reece, P. Scott and P. Hooper. (2002) Pathogenicity of Australian Strains of Avian Infectious Bronchitis Virus. *J. Comp. Path.* 2002, Vol. 126, 115–123
- Ignjatovic, J; Gould, G; Sapats, S. (2006) Isolation of a variant infectious bronchitis virus in Australia that further illustrates diversity among emerging strains. *Archives of Virology*, 151:1567-1585.
- ICTV, 2012. *Virus taxonomy: classification and nomenclature of viruses, Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of viruses*. Elsevier Academic Press, San Diego.

- Ito, N. M; Miyaji, C. I; Okabayashi, S. Controle de variantes do virus da da bronquite infecciosa das galinhas. In. Anais da Conferência Apinco 2006 de Cinência e Tecnologias Avícolas.
- Jackwood, M. W; Hall, D; Handel, A. (2012) Molecular evolution and emergence of avian gammacoronaviruses. *Infection, Genetics and Evolution* 12, 1305-13100
- Jackwood, M. W; Lee, C. W. (2001). Origin and evolution of Georgia 98 (GA98), a new serotype of avian infectious bronchitis virus. *Virus Research* 80 (2001) 33–39
- Jones, R. C. (2010a) 'Viral respiratory diseases (ILT, aMPV infections, IB): are they ever under control?', *British Poultry Science*, 51: 1, 1 — 11
- Jones, R. C. (2010b) Europe: History, Current Situation and Control Measures for Infectious Bronchitis. *Rev. Bras. Cienc. Avic.* vol.12 no.2 Campinas Apr./June 2010
- Jones, R.C. & Ambau, A.G. (1987) Re-excretion of an enterotropic VBI by hens at point of lay after experimental infection at day-old. *Veterinary Record*, 120, 617-618.
- Klieve, A.V. & Cumming, R.B. Immunity and cross-protection to nephritis produced by Australian infectious bronchitis viruses used as vaccines. *Avian Pathology*, 17: 829-839. 1988
- Lee, C.W; Jackwood, M.W. (2000) Evidence of genetic diversity generated by recombination among avian coronavirus VBI. *Archives of Virology*, 145:2135-2148.

- Le Gros, F.X. Serotyping studies on recent IBV isolates from France and various regions of the world. In: Proceedings of the Vth International Symposium on Avian Corona and Pneumoviruses, Rauschholzhausen, Germany, p. 205-209. 1998.
- Lovato, L. T; Dezengrini, R. (2007) Coronaviridae: In Flores, E. Virologia Veterinária, Editora UFSM, 888p.
- Lucio, B. & Fabricant, J. (1990). Tissue tropism of three cloacal isolates and Massachusetts strain of infectious bronchitis virus. Avian Diseases, 34 , 865-870.
- McKinley, E. T; Hilt, D. A; Jackwood, M. A. (2008) Avian coronavirus infectious bronchitis attenuated live vaccines undergo selection of subpopulations and mutations following vaccination. Vaccine (2008) 26, 1274—1284
- Matthijs, M.G.R; Van Eck, J.H.H; Landman, W.J.M; Stegeman, J.A. (2003) Ability of Massachusettstype infectious bronchitis virus to increase colibacillosis susceptibility in commercial broilers: a comparison between vaccine and virulent field virus. Avian Pathology, 32:473-481.
- Moya, A.; Elena, S.F.; Bracho, A.; Miralles, R.; Barrio, E. (2000). The evolution of RNA viruses: a population genetic view. Proc. Natl. Acad. Sci., Washington, v. 97, n. 13, p. 6967-6973. 2000
- Otsuki, K; Huggins, M.B; Cook, J.K.A. (1990) Comparison of the susceptibility to avian infectious bronchitis virus infection of two inbred lines of white leghorn chickens, Avian Pathology, 19:3, 467-475

- Parsons, D.; Ellis, M.M.; Cavanagh, D.; Cook, J.K.A. Characterisation of an infectious bronchitis virus isolated from vaccinated broiler breeder flocks. *Veterinary Rec.*, 131: 408-411. 1992.
- Raj, G.D; R. C. Jones (1996) Immunopathogenesis of infection in SPF chicks and commercial broiler chickens of a variant infectious bronchitis virus of economic importance, *Avian Pathology*, 25:3, 481-501
- Raj, G. D; Jones, R.C. (1997). Infectious bronchitis virus: immunopathogenesis of infection in the chicken. *Avian Pathology*, 26, 677_706.
- Reed & Muench (1938) A simple method of estimating fifty per cent endpoints, *Am. J. Epidemiol.* 27 (3): 493-497
- Rimondi, A.; Craig, M.I.; Vagnozzi, A.; König, G.; Delamer, M.; Pereda, A. (2009) Molecular characterization of avian infectious bronchitis virus strains from outbreaks in Argentina (2001-2008). *Avian Pathology*, 2: 149-53. 2009.
- Seo, S. e Collisson, E. (1997) Specific Cytotoxic T Lymphocytes Are Involved in In Vivo Clearance of Infectious Bronchitis Virus, *Journal of Virology*, Vol. 71, Nº 7
- Siller, W. G. e Cummin, R. B. (1974). The histopathology of a interstitial nephritis in the fowl produced experimentally with infectious bronchitis virus. *Journal of pathology*, 114, 163-173
- Silva, E.N. (2010) Infectious Bronchitis in Brazilian Chickens: current data and observations of Field Service Personnel. *Revista Brasileira de Ciência Avícola* – Julho, 2010 – v.12 – n.3
- Terregino, C; Anna Toffan ; Maria Serena Beato ; Roberta De Nardi ; Marta Vascellari , Amelio Meini , Giovanni Ortali , Marzia Mancin & Ilaria Capua

(2008) Pathogenicity of a QX strain of infectious bronchitis virus in specific pathogen free and commercial broiler chickens, and evaluation of protection induced by a vaccination programme based on the Ma5 and 4/91 serotypes, *Avian Pathology*, 37:5, 487-493

União Brasileira de Avicultura (UBABEF). <http://www.abef.com.br>, acesso em 13/09/2012.

Villareal, L. Y. B; Brandão, P. E; Chacón, J. L; Saindeneberg, A. B. S; Assayag, M. S; Jones, R. C; Ferreira, A. J. P. (2007) Molecular Characterization of Infectious Bronchitis Virus Strains Isolated from the Enteric Contents of Brazilian Laying Hens and Broilers. *Avian Diseases*, 51(4):974-978

Villareal, L. Y. B; Sandri, T. L; Souza, S. P; Richtzenhain, L. J; de Wit, J. j; Brandão, P. E. (2010) Molecular Epidemiology of Avian Infectious Bronchitis in Brazil from 2007 to 2008 in Breeders, Broilers and Layers. *Avian Diseases* 54:894–898

Worthington, K. J. , Currie, R. J. W. and Jones, R. C.(2008) 'A reverse transcriptase-polymerase chain reaction survey of infectious bronchitis virus genotypes in Western Europe from 2002 to 2006', *Avian Pathology*, 37: 3, 247 — 257

Yu L, Jiang Y, Low S, Wang Z, Seah JN, Liu W, Kwang J. (2001) Characterization of three infectious bronchitis virus isolates from China associated with proventriculus in vaccinated chickens. *Avian Disease* 45: 416-424

YuDong, W., YongLin, W., ZiChun, Z., GenChe, F., YiHai, J., XiangE, L., et al. (1998). Isolation and identification of glandular stomach type IBV (QX IBV) in chickens. *Chinese Journal of Animal Quarantine*, 15, 13.

8. Anexo 1: Artigo submetido à revista *Avian Diseases*

Outcomes of infection of chickens with two infectious bronchitis virus (IBV) variants of chicken and pigeon origin

Short title (running head): IBV of chicken and pigeon origin in chicken

Matheus C. Martini²⁺; Leonardo C. Caserta³⁺; Marcia B. Santos^{4*}; Ricardo D. Carvalho⁵; Ana C. S. Barnabé⁶; Marina A. Padilla⁷; Paulo A. N. Felipe⁸; Helena L. Ferreira⁹; Arns, C.W.¹

⁺Equal contribution

^{1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8} Laboratory of Animal Virology, Institute of Biology, University of Campinas- UNICAMP- Campinas, 13083970, Brazil; ¹e-mail: clarns@gmail.com, ²e-mail: crm2007@hotmail.com, ³e-mail: leonardo.caserta@gmail.com, ⁴e-mail: marciamerces@yahoo.com.br ⁵e-mail: rdcarval@gmail.com, ⁶e-mail: sbanacaroline@gmail.com, ⁷e-mail: Marina Padilla ma_padilla2001@yahoo.com.br, ⁸e-mail: pauloanselmo@terra.com.br

⁴ ICB-Universidade Federal de Juiz de Fora, Rua José Lourenço Kelmer, s/n - Campus Universitário, Juiz de Fora, MG, 36036-330, Brazil; e-mail: marciamerces@yahoo.com.br

⁹ ZMV- FZEA-USP, Av. Duque de Caxias Norte, 225, Pirassununga – SP, 13635-900, Brazil; e-mail: hlage@usp.br

*Author for correspondence: Laboratory of Animal Virology, Institute of Biology, University of Campinas-UNICAMP- Campinas, 13083970, Brazil

e-mail: marciamerces@yahoo.com.br

Telephone: +55 19 3521 6258

Abstract

The pathogenicity of two isolates of infectious bronchitis virus (IBV) of chicken origin, grouped with Brazilian genotype strains, and one avian coronavirus of pigeon origin, clustered with Massachusetts vaccine serotype, was investigated in chickens. All isolates induced essentially a respiratory disease, with clinical signs and severe histopathological lesions limited to respiratory tract and mild microscopic changes in other tissues. Supporting the clinical and histopathological findings, all strains were able to cause ciliostasis achieving complete absence of ciliary activity at some point. Despite of the developed respiratory effects, viral RNA was detected in all eight investigated tissues and enteric samples yielded the highest amounts and longer lasting viral detection. In general, although chicken and pigeon strains induced similar pathological outcomes, the pigeon isolate induced more severe and longer lasting effects in chickens. These results reveals the ability of both chicken and pigeon strains to replicate in a wide tissue range and cause disease in chickens. Pigeons might represent a potential risk for avian coronavirus spreading and constitute a space for virus evolution.

Keywords: infectious bronchitis virus, pigeon, chicken, pathogenicity, virus detection

Abbreviations:

IBV: infectious bronchitis virus

IB: infectious bronchitis

RNA: ribonucleic acid

BR: brazilian IBV genotype

SPF: specific pathogen-free

CEUA: Animal Ethics Committee

Dpi: day post infection

UTR: untranslated region

RT-PCR: reverse transcription polymerase chain reaction

H&E: hematoxylin and eosin

ANOVA: analysis of variance

1. Introduction

Coronaviruses belong to the vast family *Coronaviridae*, which is divided into two subfamilies: *Torovirinae* and *Coronavirinae*. The subfamily *Coronavirinae* comprises four genera: *Alphacoronavirus*, *Betacoronavirus*, *Gammacoronavirus*, and *Deltacoronavirus* (39). Whilst *Alphacoronavirus* and *Betacoronavirus* are found mainly in mammals (19, 22), *Gammacoronavirus* and *Deltacoronavirus* have been detected primarily in avian species (11, 44, 56, 57). The diversity of Coronavirus is a result of its tendency for recombination and high mutation rates, similar to other RNA viruses such as influenza A virus (36). These factors have led to the generation of a variety of strains, genotypes and even new species, which may adapt to new hosts and ecological niches, sometimes causing major outbreaks and posing a threat to the human and animal health (36, 58).

Within *Gammacoronavirus* genus, the avian coronavirus infectious bronchitis virus (IBV) causes one of the most important endemic viral diseases of chicken in countries with intensive poultry production (3, 12, 38). The name of the disease, Infectious bronchitis (IB), refers to its most frequent clinical manifestation, although it can infect many other epithelial cells, including the kidney, genital organs and many parts of the alimentary tract (12). In addition of being pathogenic for many tissues, IBV is one of the most important causes of loss of egg production and quality (12). Many variants of IBV have been identified and unpredictable emergence of new genotypes is regularly seen worldwide (38, 43, 61). Molecular epidemiological studies have shown a similar trend in Brazil, where a Brazilian IBV genotype (BR) appears to be the dominant field strain (1, 14, 45, 51, 52), although a variety of other IBV genotypes have also been identified (1, 20, 26).

Avian coronaviruses with high nucleotide identity with IBV have also been found in various wild bird species and sinantropic birds such as pigeons (21, 27, 30, 33, 37, 47, 50). This

creates the suspicion that wild and sinantropic birds might actively participate to the IBV and other coronavirus ecology as reservoir and/or pathogen transmitter. Although there is no evidence that IBV strains can infect migratory wild birds and be carried over long distances as seen for avian influenza viruses, pigeons could be critical in this context since they can transport the virions and have close contact with chicken, providing in this way an important environment for virus evolution (26, 47).

In a previous epidemiological study, we identified two major phylogenetic groups of IBV or avian coronavirus in Brazilian commercial poultry and feral pigeons: poultry samples clustered at most with BR-I/D207 genotypes or Massachusetts serotype, whilst pigeon samples joined the Massachusetts vaccine serotype group (26, 27). The main aim of this study was to select strains of chicken and pigeon origin derived from the above study to evaluate its pathogenicity in chickens on a comprehensive experiment, covering the possible sites of virus strains replication. This could provide a deeper understanding on the BR variants pathogenicity and bring new insights regarding the role of pigeon on the eco-epidemiology of avian coronavirus.

This report describes the outcomes of infection of chickens with one strain of pigeon origin, clustered with the Massachusetts vaccine strain, and two Brazilian strains of chicken origin, classified into BR-I/D207 group.

2. Material and Methods

2.1. Chickens

One hundred and sixty five one-day-old specific pathogen-free (SPF) white Leghorn chickens (provided by the Biovet laboratory) were randomly split into three groups of 55 birds for challenge with IBV strains. Fifty five mock-infected chickens were also included as

control group. Chickens were kept in isolators at the Research facility of Biovet Laboratory, and supplied with feed and water *ad libitum*. All of experimental procedures were performed according to the Brazilian Ethics Community guidelines and approved by The State University of Campinas Animal Ethics Committee (CEUA Protocol n°005/13).

2.1. Viruses

Three avian coronavirus strains previously isolated by the Laboratory of Animal Virology at IB-UNICAMP were used. Those strains were selected due to their different avian origins and phylogenetic classification in distinct genotypes (26, 27): 1. Avian coronavirus strain designated as COLUMBA/BRAZIL/2007/UNICAMP67T (pigeon-67T strain) isolated from pigeon (*Columba livia*) and classified into Massachusetts group; 2. IBV strain IBV/BRAZIL/2007/UNICAMP801 (chicken-801 strain) isolated from broiler in the southern region of Brazil (*Gallus gallus domesticus*) and classified into BRAZIL-I/D207 group; 3. IBV strain IBV/BRAZIL/2007/UNICAMP810 (chicken-810 strain) isolated from broiler in the southeastern region of Brazil (*Gallus gallus domesticus*) and classified into BRAZIL-I/D207 group (Table 1). Both of the chicken strains were isolated from symptomatic chickens. Viruses were grown and titred in 9 days old chicken embryonated eggs according Reed and Muench method (49). All strains were used for inoculation at the dose of $10^{5.5}$ EID₅₀ per chicken.

2.2. Experimental design

One-day-old chickens were divided into three groups named pigeon-67T, chicken-801 and chicken-810 and inoculated intraocularly and intranasally with 0.2 mL of the respective IBV isolate, containing $10^{5.5}$ EID₅₀, per chicken. Thirty-five mock-infected chickens were retained as control group. Chickens were monitored daily by visual observation for clinical

signs (23) and survival during the 42 days of the experiment. Between the 2nd and 42nd day post infection (dpi), five birds of each group were euthanized at 2, 4, 5, 7, 9, 11, 14, 21, 28, 35 and 42 dpi for cloacal swab collection and organ sampling (sinus, trachea, lung, proventriculus, ceecal tonsil, kidney and testis) to evaluate the amount of viral RNA in tissues and histological changes in selected organs. At 4, 7, 9, 11, 14 and 21 dpi ciliary activity in the trachea was also measured. Blood was also collected at 3 and before euthanizing the birds for measurement of the humoral immune response.

2.3. Tracheal Ciliostasis

The entire trachea was removed immediately after euthanized at 4, 7, 9, 11, 14 and 21 dpi, and three thin tracheal rings (one from the top and bottom and one from the middle of the trachea) were selected from each bird and then, cut and placed in MEM (Minimal Essential medium with Hank's salt) in a 24-well microplate. The rings were observed for ciliary activity using a microscope and was made a score for the inhibition of ciliary activity, on a scale of 100% to no activity (17).

2.4. Detection and quantification of viral RNA in organs

Tissues collected from selected organs were homogenized in 400 µL of ice-cold Dulbecco Minimum Essential Medium (Life Technologies, Carlsbad, USA). Tissue homogenates were centrifuged at 4° C for 10 min at 1000 x g and supernatants were collected. Viral RNA from tissues suspensions were extracted using the QIAmp Viral RNA mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) according to the manufacturer's instructions. The real-time RT-PCR targeting the untranslated region- UTR of IBV was used according a previous study (9) with slight modifications. Briefly, the Quantitec Probe RT-PCR kit (Qiagen, Hilden, Germany) was used with final concentrations of 500nM of each primer, and 100nM of the

Taqman probe labeled with VIC fluorescence in a total individual reaction volume of 25 μ L containing 5 μ L of RNA (0.2 to 20ng). An external standard curve was created using spectrophotometrically determined copy number standards of purified PCR product for UTR gene. After an initial reverse transcription step (50°C for 30min) and an initial denaturation step at 95°C for 15min, 45 cycles (95°C for 15sec – 60°C for 1min) were performed with fluorescence detection at the end of the annealing-extension step.

Amplification and fluorescence detection were carried out in an Applied Biosystems 7500 real time PCR cycler (Applied Biosystems, Foster City, USA). For absolute quantification, a PCR product containing the target sequence was used as DNA standard. The experiments were repeated three times on different days from the same RNA stocks. Threshold cycle values (Ct) were used, as Cp indicates the PCR cycle number at which the amount of amplified target reaches a fixed threshold. In order to convert threshold cycles in copy numbers, an external standard curve was created with known copy numbers of UTR gene of IBV. Copy number was calculated using the following formula:

$$Y \text{ molecules } \mu\text{L}^{-1} = (Xg \text{ } \mu\text{L}^{-1} \text{ DNA} / [\text{Length of PCR product in base pairs} \times 660]) \times 6.022 \times 10^{23}.$$

Control of reaction was used as according to previous study (8).

2.5. Histopathology

As for histopathological evaluation, selected organs inoculated with distinct viruses and the control group were collected and fixed in 4% paraformaldehyde for 12h at room temperature. The specimens were submitted to diafanization with xylene, dehydrated by graded ethanol, embedded in paraffin and cut in 5- μ m-thick sections, processed by the standard histological procedure (4). Histologic changes were evaluated on sections stained with hematoxylin and eosin (H&E). One sample from each animal, for each collected organ, was examined. All the sections were examined by light microscopy. The analysis was

performed blindly by three independent investigators who evaluated the slides, each one containing three sections.

2.6. Detection of antibodies against IBV

The humoral response in chickens was evaluated by an indirect ELISA using ID Screen®IBV Indirect (ID vet Innovative Diagnostic, France) according to the manufacturer's instructions. Microwells were coated with purified IBV antigen. Collected samples to be tested and controls were added to the wells. Anti-IBV antibodies, if present, formed an antigen-antibody complex. After washing, an anti-chicken horseradish peroxidase (HRP) conjugate was added to the wells, which fixed to the antibodies, forming an antigen-antibody-conjugate-HRP complex. After elimination of the excess conjugate by washing, the substrate solution (TMB) was added. The microplate was read at 450 nm and evaluated for the presence of antibodies.

2.1. Statistical analysis

The One-way analysis of variance (ANOVA) and the Student t-test were carried out to compare the quantity of viral RNA detected in challenged groups with the control group. The differences were considered as significant at $P < 0.05$.

3. Results

3.1. Clinical signs and gross pathological findings

At two dpi, chickens from all infected groups appeared depressed with signs of listless, ruffled feathers and wings lowered. Respiratory signs, such as dyspnea and coughing, were also observed at 2 dpi on the pigeon-67T group, followed by tracheal rales and mild

watery faeces noticed from the 4dpi. In both chicken-801 and chicken-810 groups tracheal rales were observed from the 5 dpi. Most of the animals presented a peak of clinical signs between 4 and 9 dpi, however chickens infected with the pigeon-67T were shown to develop a slightly more severe disease and before the other two groups challenged with chicken IBV strains. These worse signs lasted for about 8 days and disappeared at 14 dpi. No mortality was observed in challenged groups. No clinical signs or mortality was observed in the mock-infected group.

At necropsy, congestion and catarrhal exudates were observed in the tracheal lumen between 4 and 9 dpi in all infected groups. Urate deposition in kidney was observed in chickens challenged with pigeon-67T at 5 dpi. Gross lesions were not observed in any other organs examined after infection with either strain.

3.2. Inhibition of ciliary activity

Analyzing the mean scores resulting from pigeon and chicken IBV strains (Table 2), a complete ciliostasis (0% of active cilia) was observed at 4, 7 and 9 dpi on the pigeon-67T group. As for chicken-801 group, on which a complete ciliostasis was observed slightly later, at 9 and 11 dpi. The chicken-810 group did not reveal complete absence of ciliary activity, although the ciliostasis gradually increased until 11 dpi. For all these groups, a recovery of 50% of cilia activity was found at 14 dpi, and a complete recovery was observed at 21 dpi. No ciliostasis was observed in the mock-infected group.

3.3. Virus RNA detected after inoculation

Real-time RT-PCR test was performed with ten-fold serial dilutions of a reference Massachusetts H120 strain with detection limit of 50EID₅₀/mL corresponding to a 9.44 x10⁵ copies/μL. Cycle threshold values above 37.09 were considered negative. Log titres of

different IBV strains RNA in each organ were measured to show the differences between strains. Viral RNA was detected in all infected group after virus inoculation in sinus, trachea, lung, proventriculus, ceecal tonsil, cloaca, kidney and testis at different points (Figure 1). No viral RNA was detected in control group.

By analyzing all strains, the highest quantity of RNA in trachea and sinus could be seen between the 2 and 7 dpi. Although similar amounts of viral RNA were detected in pigeon-67T, chicken-801 and chicken-810 groups, the first lasted longer. In the lung, the RNA levels of chicken IBVs were higher during the first nine days and peaked at 5 dpi, while RNA of pigeon IBV peaked later, at 11 day. In both upper and lower respiratory tract, the levels of viral RNA dropped to zero by 14 and 21 dpi.

Regarding to the persistence of viral RNA, a similar trend to that seen in the respiratory tract was found in kidney (the peaks were observed at 5 or 7 dpi and dropped under detected level between 14 and 21 dpi), however, highest amounts of RNA were detected in the kidney.

Considering the whole experiment, the highest amounts and longer duration of IBVs RNA were observed in the ceecal tonsil and cloacal swab of all infected groups. Virus RNA was detected from the 2 and 4 dpi in cloaca and ceecal tonsil, respectively, and persisted during the whole experiment (chicken IBVs could be detected even on the last sampling day and pigeon IBV fell to zero at 35 or 42 dpi). On the other side, the lowest levels of viral genome were seen in the proventriculus: the titre of all infected groups peaked at 7 dpi and dropped to zero by 14, 21 and 28 dpi for chicken-810, chicken-801 and pigeon-67T groups, respectively. In testis, all strains were detected until 11 dpi, and peaked between 4 and 5 dpi with titre values similar to that found in trachea.

No significant difference was found among infected groups regarding to RNA quantity measured by real time RT-PCR ($P > 0.05$). All inoculated groups showed significant levels of

viral RNA when compared infected groups to control group, except for chicken-801 group in testis and chicken-810 group in proventriculus.

3.4. Histology

Mild congestion, degeneration of pseudostratified ciliated cells and lack of cilia were observed in sinus after inoculation with chicken-801 and chicken-810. Sinus samples from pigeon-67T group seemed to be slightly more affected, showing degeneration of pseudostratified ciliated cells with lack of cilia, discrete mononuclear cell infiltrate and edema in the lamina propria, besides moderate hyperkeratosis (Figure 2a). Tracheal lesions were shown to be similar in all infected groups: Lack of cilia in the pseudostratified ciliated cells and moderate congestion were observed, in addition to a discrete presence of polymorphonuclear cells in the submucosal of chickens in pigeon-67T group (Figure 2b).

Different patterns of histological changes in lungs were observed among challenged groups: Severe diffuse congestion was observed in chicken-801 group, while the same microscopical lesion was moderate in chicken-810 group. Lungs of birds infected with pigeon-67T group were more affected than those infected with chicken IBVs, showing a moderate presence of erythrocytes in parabronchi and atrium, mild lymphohistiocytic infiltrate, moderate edema, multiple demineralization areas of parabronchi and atrium, multiple granulomas characterized by central necrosis surrounded by multinucleated giant cells, epithelioid histiocytes and heterophiles. In inner of necrosis focus, basophilic granulation was observed (Figure 2c).

Characteristic lesions of interstitial nephritis were observed in chickens from pigeon-67T group. Renal lesions such as mixed inflammatory infiltration in the renal pelvis, moderate edema and a discrete presence of hyaline cylinders in the tubules were observed in chicken-

801 group, whereas no characteristic lesion was found in renal tissue of chickens from chicken-810 group.

Slight changes were observed in ileum of infected chickens. Discrete edema in lamina propria was found in ileum samples of birds infected with the chicken-IBVchicken-801, while no characteristic lesions were found in the chicken-810 group. Birds infected with the Pigeon-67T, exhibit mononuclear cells infiltration in ileum. No characteristic lesion was found in proventriculus, testis and caecal tonsil of challenged groups, nether in any organ of mock-infected group.

3.5. Antibody response

Specific antibodies to IBV were detected in chickens inoculated with Chicken-801, Chicken-810 and Pigeon-67T strains (Figure 3). Pigeon IBV strain induced detectable antibody response at the first week post infection (pi), which reached the highest level with titres around $1.0 \times 10^3 \log_{10}$ at 21 dpi and decreased on the following weeks. Differently, chicken IBV strains first induced detectable antibody titres at the second week, maintaining similar titres until de 42 dpi; 801 and 810 groups reached their maximal level with titres around $3.0 \times 10^2 \log_{10}$ at 35 and 21 dpi, respectively. Results showed absence of IBV antibodies in mock-infected groups throughout the experiment. Statistical analyses showed that the rise in antibody titre was significant only when Pigeon-67T and control groups were compared.

4. Discussion

This study shows that infection of chickens with three Brazilian IBV strains, two of chicken origin classified into BR-I/D207 group and one of pigeon origin classified into the IBV Massachusetts group, led primarily to respiratory disease with severe histological lesions in the

respiratory tract, and to detection of high amounts of viral RNA in the alimentary tract. Although chicken and pigeon strains induced similar clinical outcomes and tissue tropism in chickens, the pathogenic effects observed for pigeon strain were long lasting and more evident than that seen for chicken strains.

After challenge of chickens with the strains of chicken origin (chicken-801 and chicken-810) and pigeon origin (pigeon-67T), susceptibility and clinical signs were shown to be similar to those previously reported for other IBV variants replicating in respiratory tissues, which lasted for only 5 to 7 days and disappear within 10 to 14 days, with low mortality (46, 48). Here, clinical signs were predominantly respiratory and chickens challenged with pigeon-67T suffered a longer lasting respiratory infection, with a greater number of animals affected, than chickens challenged with chicken-801 and chicken-810. The worse signs lasted for about 8 days and totally disappeared at 14 dpi in all challenged.

Following the trend observed for clinical signs, histopathological changes were more severe in chickens challenged with pigeon-67T than those challenged with chicken-801 and chicken-810. Both characteristic respiratory clinical signs and histological changes appeared to be caused by replication of IBV in the respiratory tissues, as seen elsewhere (5, 7, 10). Indeed, high viral RNA levels were detected in sinus, trachea and lungs indicating virus replication in those tissues. Our histopathological and detection findings for both chicken IBVs are in agreement with previous studies that reported similar respiratory disease in chickens experimentally infected with two Brazilian genotype strains of enteric and respiratory origins (13).

Along with the above outcomes in the respiratory tract, experimental infection of young SPF chickens with both IBV variants led to ciliostasis in different levels. Supporting the findings of clinical signs and histopathology, pigeon-67T induced complete absence of

ciliary activity earlier and for a longer period than did chicken-801 and chicken-810. Since stasis of tracheal cilia induced by IBV infection is a parameter successfully used to assess severity of respiratory infection (5, 18, 46), then the above results suggest that pigeon-67T may be more virulent than chicken-801 and chicken-810 strains. Previous studies had also reported variable tracheal damage in terms of ciliary activity caused by different IBV variants (5, 18, 48).

In chickens, IBV strains also grow in cells of the alimentary tract (5, 6), causing little pathobiological clinical effect (2). Similarly, in the current study viral RNA was detected in enteric samples of all challenged groups, although only slightly histopathological changes were observed in ileum and no sign of microscopic lesions was seen in ceecal tonsil. Despite the poor histological findings, the highest amounts and longer-term viral RNA detection were observed in the ceecal tonsil and cloacal swab samples, where virus RNA was detected at the first days post infection and persisted during the whole 42 days long experiment. Benyeda et al. (2009) and Benyeda et al. (2010) also reported long-term virus replication in the alimentary tract of chickens infected with QX-like strains of IBV, associated with poor and sporadic histopathological changes in the ileum.

Various studies reported the ability of IBV to replicate in epithelial cells of various organs, but indicating the trachea as primary site of replication (16, 24, 48). This study reports the outcomes of a comprehensive experiment with IBV variants of distinct origins, leading to severe histopathological lesions limited to respiratory tract and mild microscopic changes in other tissues of chickens. It should be noted, however, that viral genome of both chicken and pigeon strains were able to replicate in a wide tissue range, since RNA was detected in all eight investigated tissues. No variation on pathogenic effects was found among IBV strains of chicken origin in any organ, which is not a surprise since both strains are classified into the

same group, the BR-I/D207 (26). On the other hand, the effects induced by the pigeon strain were more evident since more severe and longer lasting outcomes were observed in chickens challenged with this strain. Besides, the pigeon-67T strain was able to induce humoral antibody response showing significant difference to the control group; whereas no significant antibody titre was induced by neither chicken-801 nor chicken-810.

Coronaviruses are known to not be limited to replication in a single host (11). This was emphasized by the emergence of SARS-coronavirus (40, 41) spreading from mammals to humans in 2002, although experimental evidences had already shown the coronaviruses fastidious characteristic (34, 59, 60). Regarding avian coronavirus, it has been shown that isolates from certain species can replicate in other species, but no clinical sign is observed in most cases (29, 31, 35, 42). In this study an avian coronavirus of pigeon origin of high similarity with Massachusetts serotype was shown to be able to replicate in different tissues and cause disease in chickens. Our findings are in agreement to Sun (2007), who reported an avian coronavirus of wild peafowl origin nonpathogenic to peafowls, but pathogenic for chickens; our pigeon isolate although causing disease in chickens, didn't appear to induce pathogenic signs on the pigeon sampled (26). Qian (2006), however, also isolated an IBV-like from pigeon, which caused pancreatitis in that species and similar disease in chickens.

Due to economical reasons, many of the commercial flocks are located close to (or even on) expanding urban areas, favoring the contact between feral birds and poultry. This condition is increasingly exposing poultry to pathogens of other birds and vice versa, providing an important environment for virus evolution. Indeed, mixing different varieties of species at the same environment may allow interspecies jumping, which might subsequently pose risks for further genetic changes and adaptation to other hosts, as seen to SARS (15) or H5N1 virus (53). Our results suggest that feral pigeon could constitute a host range in which

the virus can evolve, as well as a space for recombination between the wild-type coronavirus and IBV vaccine. As a consequence, new variants with different pathogenic potential might be produced (25). Moreover, taking into account that large social groups, with good spatial mobility and close social interactions with other groups, are usually responsible for transmission and viral maintenance (28, 32, 54, 55), pigeons might represent a potential risk for avian coronavirus (already identified and perhaps new ones) spreading.

Overall, this study showed that one IBV strain of pigeon origin grouped with Massachusetts serotype, and the two IBV strains of chicken origin clustered with BR-I/D207 strains produced primarily respiratory disease in chickens under experimental conditions, confirmed by clinical signs, RNA detection and histopathological changes. Nevertheless, the highest amounts and longer duration of viral RNA detection was found in enteric samples, although with poor and sporadic histopathological changes. Both chicken strains induced similar patterns of disease in chickens, which were less evident than that caused by the pigeon strain. Considering that feral pigeons are able to carry a virus strain pathogenic for chickens, this specie could constitute a space for virus evolution and a way of virus transport and dispersal. Further detailed molecular investigation on the whole spike protein gene of the pigeon-67T strain used here is needed to clarify how close it is to other Massachusetts strains, including the vaccines, and whether there is connection between molecular findings and pathogenicity.

5. Bibliography

1. Abreu, J. T., J. S. Resende, R. B. Flatschart, Á. V. Folgueras-Flatschart, A. C. R. Mendes, N. R. Martins, C. B. Silva, M. C. Ferreira, and M. Resende. Molecular analysis of Brazilian infectious bronchitis field isolates by reverse transcription-polymerase chain

reaction, restriction fragment length polymorphism, and partial sequencing of the N gene. *Avian diseases* 50:494-501. 2006.

2. Ambali, A., and R. Jones. Early pathogenesis in chicks of infection with an enterotropic strain of infectious bronchitis virus. *Avian Diseases*:809-817. 1990.

3. Balestrin, E., A. P. Fraga, N. Ikuta, C. W. Canal, A. S. Fonseca, and V. R. Lunge. Infectious bronchitis virus in different avian physiological systems—A field study in Brazilian poultry flocks. *Poultry science* 93:1922-1929. 2014.

4. Bancroft, J. D., and M. Gamble. *Theory and practice of histological techniques*. Elsevier Health Sciences. 2008.

5. Benyeda, Z., T. Mato, T. Süveges, E. Szabo, V. Kardi, Z. Abonyi-Toth, M. Rusvai, and V. Palya. Comparison of the pathogenicity of QX-like, M41 and 793/B infectious bronchitis strains from different pathological conditions. *Avian Pathology* 38:449-456. 2009.

6. Boltz, D. A., M. Nakai, and J. M. Bahr. Avian infectious bronchitis virus: a possible cause of reduced fertility in the rooster. *Avian diseases* 48:909-915. 2004.

7. Boltz, D. A., C. R. Zimmerman, M. Nakai, D. Bunick, G. Scherba, and J. M. Bahr. Epididymal stone formation and decreased sperm production in roosters vaccinated with a killed strain of avian infectious bronchitis virus. *Avian diseases* 50:594-598. 2006.

8. Borm, S. V., M. Steensels, H. Ferreira, M. Boschmans, J. D. Vriese, B. Lambrecht, and T. d. Berg. A universal avian endogenous real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction control and its application to avian influenza diagnosis and quantification. *Avian diseases* 51:213-220. 2007.

9. Callison, S. A., D. A. Hilt, T. O. Boynton, B. F. Sample, R. Robison, D. E. Swayne, and M. W. Jackwood. 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* 138:60-65. 2006.

10. Cavanagh, D. Severe acute respiratory syndrome vaccine development: experiences of vaccination against avian infectious bronchitis coronavirus. *Avian Pathology* 32:567-582. 2003.
11. Cavanagh, D. Coronaviruses in poultry and other birds. *Avian Pathology* 34:439-448. 2005.
12. Cavanagh, D., and J. Gelb. Infectious bronchitis, in: SAIF, Y.M. et al. (Eds) *Diseases of Poultry*, 12th ed. Ames, IA, Blackwell Publishing, pp. 117—135. 2008.
13. Chacón, J., M. Assayag Jr, L. Revolledo, C. Astolfi-Ferreira, M. Vejarano, R. Jones, and A. Piantino Ferreira. Pathogenicity and molecular characteristics of infectious bronchitis virus (IBV) strains isolated from broilers showing diarrhoea and respiratory disease. *British poultry science* 55:271-283. 2014.
14. Chacon, J. L., J. N. Rodrigues, M. S. Assayag Junior, C. Peloso, A. C. Pedroso, and A. J. Piantino Ferreira. Epidemiological survey and molecular characterization of avian infectious bronchitis virus in Brazil between 2003 and 2009. *Avian Pathology* 40:153-162. 2011.
15. Cheng, V. C., S. K. Lau, P. C. Woo, and K. Y. Yuen. Severe acute respiratory syndrome coronavirus as an agent of emerging and reemerging infection. *Clinical microbiology reviews* 20:660-694. 2007.
16. Chousalkar, K., and J. Roberts. Ultrastructural study of infectious bronchitis virus infection in infundibulum and magnum of commercial laying hens. *Veterinary microbiology* 122:223-236. 2007.
17. Cook, J. K., S. J. Orbell, M. A. Woods, and M. B. Huggins. 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* 28:477-485. 1999.

18. Cubillos, A., J. Ulloa, V. Cubillos, and J. K. Cook. Characterisation of strains of infectious bronchitis virus isolated in Chile. *Avian Pathology* 20:85-99. 1991.
19. de Groot, R. J., S. C. Baker, R. S. Baric, C. S. Brown, C. Drosten, L. Enjuanes, R. A. Fouchier, M. Galiano, A. E. Gorbalenya, and Z. A. Memish. Middle East respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV): announcement of the Coronavirus Study Group. *Journal of virology* 87:7790-7792. 2013.
20. Di Fabio, J., L. I. Rossini, S. J. Orbell, G. Paul, M. B. Huggins, A. Malo, B. G. Silva, and J. K. Cook. Characterization of infectious bronchitis viruses isolated from outbreaks of disease in commercial flocks in Brazil. *Avian diseases*:582-589. 2000.
21. Domanska-Blicharz, K., A. Jacukowicz, A. Lisowska, K. Wyrostek, and Z. Minta. Detection and molecular characterization of infectious bronchitis-like viruses in wild bird populations. *Avian Pathology* 43:406-413. 2014.
22. Dong, B., W. Liu, X. Fan, D. Vijaykrishna, X. Tang, F. Gao, L. Li, G. Li, J. Zhang, and L. Yang. Detection of a novel and highly divergent coronavirus from Asian leopard cats and Chinese ferret badgers in Southern China. *Journal of virology* 81:6920-6926. 2007.
23. Elbers, A. R., G. Koch, and A. Bouma. Performance of clinical signs in poultry for the detection of outbreaks during the avian influenza A (H7N7) epidemic in The Netherlands in 2003. *Avian Pathology* 34:181-187. 2005.
24. Fan, W.-q., H.-n. Wang, Y. Zhang, Z.-b. Guan, T. Wang, C.-w. Xu, A.-y. Zhang, and X. Yang. 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* 76:2255-2260. 2012.
25. Farsang, A., C. Ros, L. H. Renström, C. Baule, T. Soos, and S. Belak. Molecular epizootiology of infectious bronchitis virus in Sweden indicating the involvement of a vaccine strain. *Avian pathology* 31:229-236. 2002.

26. Felipe, P., L. da Silva, M. Santos, F. Spilki, and C. Arns. Genetic diversity of avian infectious bronchitis virus isolated from domestic chicken flocks and coronaviruses from feral pigeons in Brazil between 2003 and 2009. *Avian diseases* 54:1191-1196. 2010.
27. Felipe, P., M. Santos, L. da Silva, S. Sakata, M. Martini, H. Ferreira, C. Arns, M. Lierz, U. Heffels-Redmann, and E. Kaleta. Molecular characterization and phylogeny of avian coronavirus isolated from wild birds in Brazil. In: VII. International symposium on avian corona-and pneumoviruses and complicating pathogens, Raischholzhausen, Germany, 18-21 June 2012. Druckerei Schröder. pp 55-60. 2012.
28. Field, H. Bats and emerging zoonoses: henipaviruses and SARS. *Zoonoses and public health* 56:278-284. 2009.
29. Gough, R., W. Cox, D. d. B. Welchman, K. J. Worthington, and R. Jones. Chinese QX strain of infectious bronchitis virus isolated in the UK. *Veterinary Record* 162:99-100. 2008.
30. Gui, Q., J. Xiong, C. Zhu, and X. Lu. The present/null polymorphism in the GSTT1 gene and the risk of lung cancer in Chinese population. *Tumor Biology* 34:3465-3469. 2013.
31. Guy, J. S. Turkey coronavirus is more closely related to avian infectious bronchitis virus than to mammalian coronaviruses: a review. *Avian Pathology* 29:207-212. 2000.
32. Haydon, D. T., S. Cleaveland, L. H. Taylor, and M. K. Laurenson. Identifying reservoirs of infection: a conceptual and practical challenge. *Emerging infectious diseases* 8:1468-1473. 2002.
33. Hughes, L. A., C. Savage, C. Naylor, M. Bennett, J. Chantrey, and R. Jones. Genetically diverse coronaviruses in wild bird populations of northern England. *Emerging infectious diseases* 15:1091. 2009.
34. Ismail, M., K. Cho, L. Ward, L. Saif, and Y. Saif. Experimental bovine coronavirus in turkey poults and young chickens. *Avian diseases*:157-163. 2001.

35. Ismail, M., Y. Tang, and Y. Saif. Pathogenicity of turkey coronavirus in turkeys and chickens. *Avian diseases* 47:515-522. 2003.
36. Jackwood, M. W. The relationship of severe acute respiratory syndrome coronavirus with avian and other coronaviruses. *Avian diseases* 50:315-320. 2006.
37. Jonassen, C. M., T. Kofstad, I. Larsen, A. Lovland, K. Handeland, A. Follestad, and L. A. Molecular identification and characterization of novel coronaviruses infecting graylag geese (*Anser anser*), feral pigeons (*Columba livia*) and mallards (*Anas platyrhynchos*). *J. Gen. Virol.* 86:1597–1607. 2005.
38. Jones, R. C. Viral respiratory diseases (ILT, aMPV infections, IB): are they ever under control? *British poultry science* 51:1-11. 2010.
39. King, A. M., M. J. Adams, and E. J. Lefkowitz. *Virus taxonomy: ninth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Elsevier. 2012.
40. Lau, S. K., P. C. Woo, K. S. Li, Y. Huang, H.-W. Tsoi, B. H. Wong, S. S. Wong, S.-Y. Leung, K.-H. Chan, and K.-Y. Yuen. Severe acute respiratory syndrome coronavirus-like virus in Chinese horseshoe bats. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102:14040-14045. 2005.
41. Li, W., Z. Shi, M. Yu, W. Ren, C. Smith, J. H. Epstein, H. Wang, G. Crameri, Z. Hu, and H. Zhang. Bats are natural reservoirs of SARS-like coronaviruses. *Science* 310:676-679. 2005.
42. Lister, S., J. Beer, R. Gough, R. Holmes, J. Jones, and R. Orton. Outbreaks of nephritis in pheasants (*Phasianus colchicus*) with a possible coronavirus aetiology. *Veterinary Record* 117:612-613. 1985.
43. McKinley, E. T., D. A. Hilt, and M. W. Jackwood. Avian coronavirus infectious bronchitis attenuated live vaccines undergo selection of subpopulations and mutations following vaccination. *Vaccine* 26:1274-1284. 2008.

44. Mihindukulasuriya, K. A., G. Wu, J. S. Leger, R. W. Nordhausen, and D. Wang. Identification of a novel coronavirus from a beluga whale by using a panviral microarray. *Journal of virology* 82:5084-5088. 2008.
45. Montassier, M., L. Brentano, L. Richtzenhain, and H. Montassier. Genetic diversity on S1 glycoprotein of avian infectious bronchitis virus strains isolated in Brazil between 1988–2000. In: *Proc. V International Symposium on Corona-and Pneumovirus Infections*, Rauischholzhausen, Germany. pp 119-131. 2006.
46. Otsuki, K., M. Huggins, and J. K. Cook. Comparison of the susceptibility to avian infectious bronchitis virus infection of two inbred lines of white leghorn chickens. *Avian Pathology* 19:467-475. 1990.
47. Qian, D. H., G. J. Zhu, L. Z. Wu, and G. X. Hua. Isolation and characterization of a coronavirus from pigeons with pancreatitis. *American journal of veterinary research* 67:1575-1579. 2006.
48. Raj, G. D., and R. Jones. Infectious bronchitis virus: immunopathogenesis of infection in the chicken. *Avian Pathology* 26:677-706. 1997.
49. Reed, L. J., and H. Muench. A simple method of estimating fifty per cent endpoints. *American journal of epidemiology* 27:493-497. 1938.
50. Sun, L., G.-h. Zhang, J.-w. Jiang, J.-d. Fu, T. Ren, W.-s. Cao, C.-a. Xin, M. Liao, and W.-j. Liu. A Massachusetts prototype like coronavirus isolated from wild peafowls is pathogenic to chickens. *Virus research* 130:121-128. 2007.
51. Villarreal, L., P. Brandão, J. Chacón, A. Saldenberg, M. Assayag, R. Jones, and A. Ferreira. Molecular characterization of infectious bronchitis virus strains isolated from the enteric contents of Brazilian laying hens and broilers. *Avian diseases* 51:974-978. 2007.

52. Villarreal, L., T. Sandri, S. Souza, L. Richtzenhain, J. De Wit, and P. Brandao. Molecular epidemiology of avian infectious bronchitis in Brazil from 2007 to 2008 in breeders, broilers, and layers. *Avian diseases* 54:894-898. 2010.
53. Webster, R. Influenza virus: transmission between species and relevance to emergence of the next human pandemic. Springer. 1997.
54. Wong, S., S. Lau, P. Woo, and K. Y. Yuen. Bats as a continuing source of emerging infections in humans. *Reviews in medical virology* 17:67-91. 2007.
55. Woo, P. C., S. K. Lau, Y. Huang, and K.-Y. Yuen. Coronavirus diversity, phylogeny and interspecies jumping. *Experimental Biology and Medicine* 234:1117-1127. 2009.
56. Woo, P. C., S. K. Lau, C. S. Lam, K. K. Lai, Y. Huang, P. Lee, G. S. Luk, K. C. Dyrting, K.-H. Chan, and K.-Y. Yuen. Comparative analysis of complete genome sequences of three avian coronaviruses reveals a novel group 3c coronavirus. *Journal of virology* 83:908-917. 2009.
57. Woo, P. C., S. K. Lau, C. S. Lam, C. C. Lau, A. K. Tsang, J. H. Lau, R. Bai, J. L. Teng, C. C. Tsang, M. Wang, B. J. Zheng, K. H. Chan, and K. Y. Yuen. Discovery of seven novel Mammalian and avian coronaviruses in the genus deltacoronavirus supports bat coronaviruses as the gene source of alphacoronavirus and betacoronavirus and avian coronaviruses as the gene source of gammacoronavirus and deltacoronavirus. *J Virol* 86:3995-4008. 2012.
58. Woo, P. C., S. K. Lau, and K.-y. Yuen. Infectious diseases emerging from Chinese wet-markets: zoonotic origins of severe respiratory viral infections. *Current opinion in infectious diseases* 19:401-407. 2006.
59. Woods, R., N. Cheville, and J. Gallagher. Lesions in the small intestine of newborn pigs inoculated with porcine, feline, and canine coronaviruses. *American journal of veterinary research* 42:1163-1169. 1981.

60. Woods, R., and R. Wesley. Seroconversion of pigs in contact with dogs exposed to canine coronavirus. *Canadian Journal of Veterinary Research* 56:78. 1992.
61. Worthington, K. J., R. Currie, and R. C. Jones. A reverse transcriptase-polymerase chain reaction survey of infectious bronchitis virus genotypes in Western Europe from 2002 to 2006. *Avian Pathology* 37:247-257. 2008.

Tables

Table 1. Characteristics of the Brazilian IBV strains used for challenge.

Table 1. Characteristics of the Brazilian IBV strains used for challenge			
	IBV strains		
	Chicken-801	Chicken-810	Pigeon-67T
Reference code	IBV/BRAZIL/2007/UNICAMP801	IBV/BRAZIL/2007/UNICAMP810	COLUMBA/BRAZIL/2007/UNICAMP67T
Variant	Brazil-ID207	Brazil-ID207	Massachusetts
Avian specie	<i>Gallus gallus domesticus</i>	<i>Gallus gallus domesticus</i>	<i>Columba livia</i>
Clinical	Respiratory signs	Respiratory signs	No clinical signs
Year of isolation	2007	2007	2007
Organ of isolation	Tracheia/Sinus	Tracheia/Sinus	Tracheia
GeneBank Accession number	HM561889.1	HM561891.1	HM561882.1

Table 2. Ciliary activity of IBV strains

	IBV strains			
	Chicken-801	Chicken-810	Pigeon-67T	Control
4 d.p.i.	25%	50%	0%	100%
7 d.p.i.	0% ^a	50%	0%	100%
9 d.p.i.	0%	25%	25%	100%
11 d.p.i.	25%	25%	25%	100%
14 d.p.i.	50%	50%	50%	100%
21 d.p.i.	100% ^b	100%	100%	100%

^aCiliostasis

^bNormal ciliary activity.

Figures

Figure 1. Detection and quantification of viral RNA by real-time RT-PCR in the (a) sinus, (b) trachea, (c) lung, (d) kidney, (e) proventriculus, (f) ceecal tonsil, (g) cloaca and (h) testis of chickens non-inoculated and inoculated with pigeon-67T, chicken-801 and chicken-810

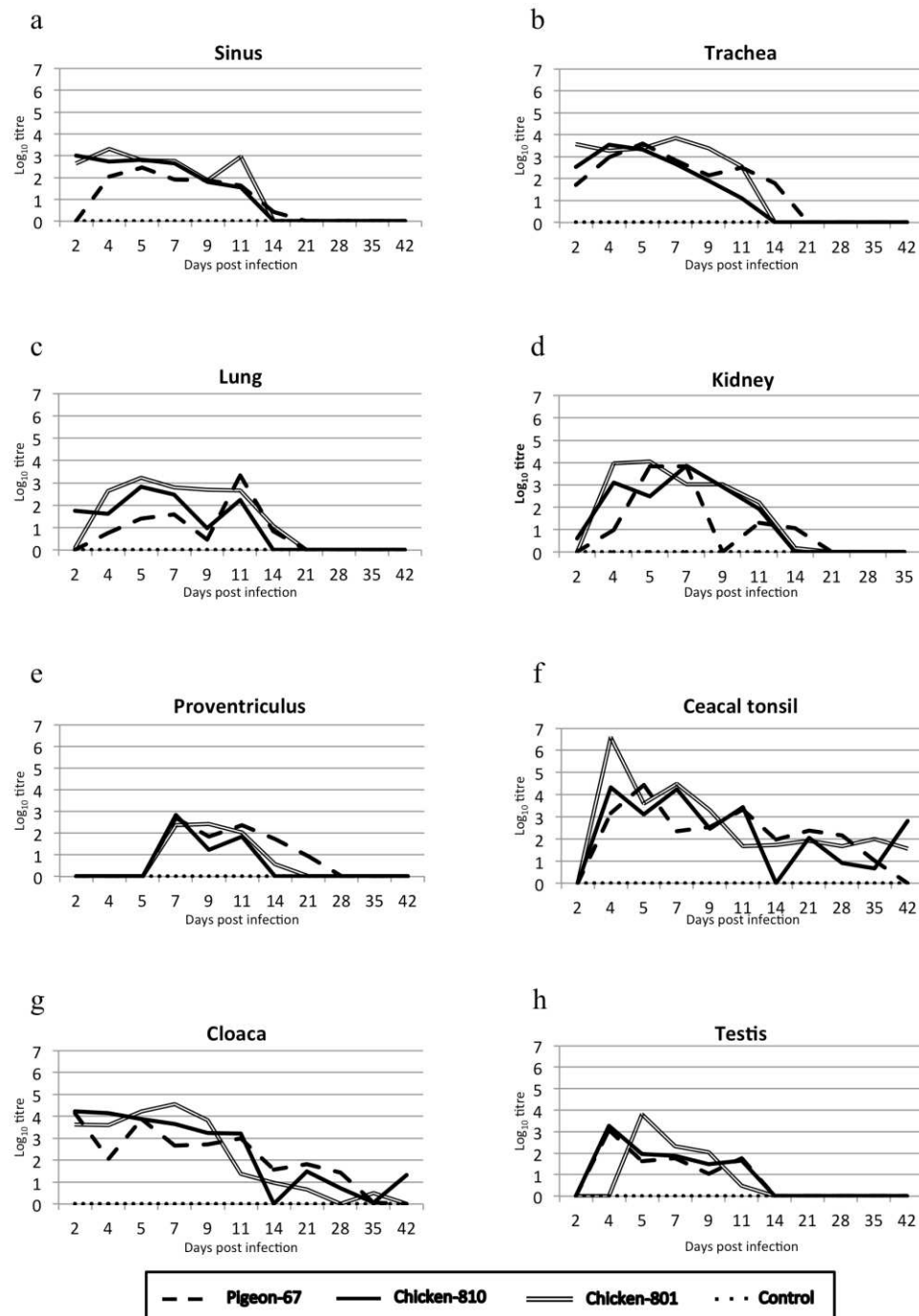
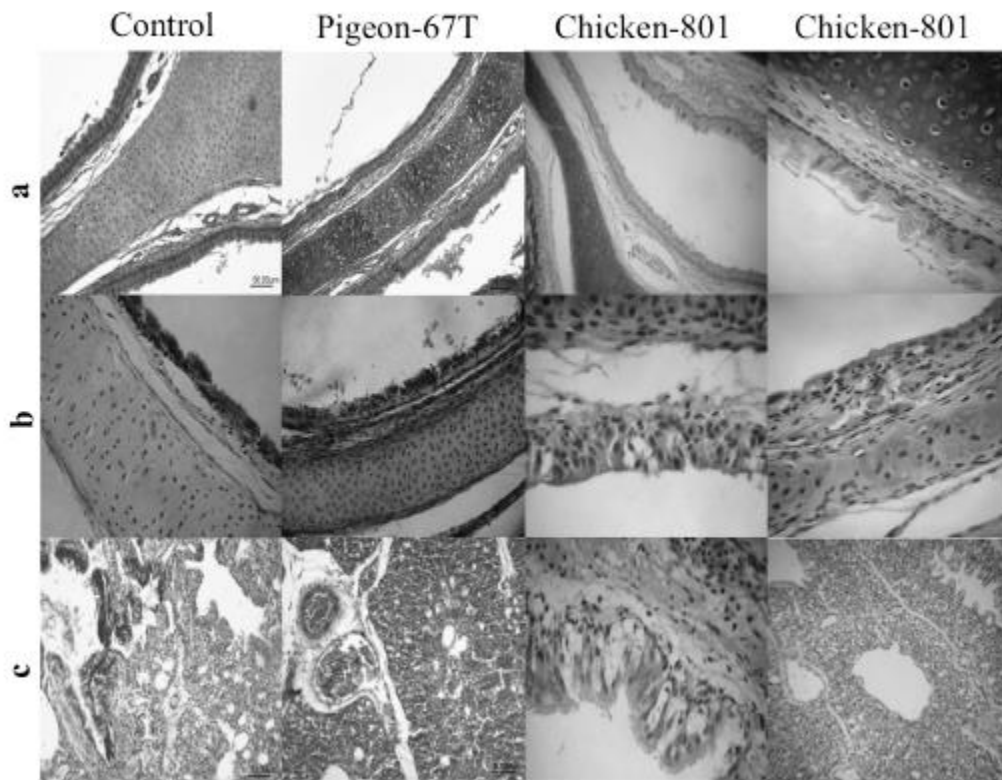


Figure 2. Microscopic lesions in (a) sinus, (b) trachea and (c) lungs of chickens mock-infected (control), challenged with pigeon-67T, chicken-801 and chicken-810. Chickens inoculated with the avian coronavirus isolate pigeon-67T (b) showed deciliation, mononuclear infiltration and edema in sinus; deciliation in thachea; and erythrocytes and demineralization areas in parabronchi and atrium, lymphohistiocytic infiltration and edema in lungs. Chickens inoculated with the IBV isolate chicken-801 (c) and IBV isolate chicken-810 (d) showed mild to moderate congestion and deciliation in sinus and trachea; and moderate to severe congestion in lungs (H&E staining).



9. Anexo 2: Aprovação no comitê de ética



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: [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: [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

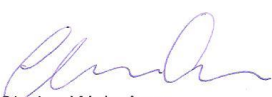
10. Anexo 3: Declaração

Profa. Dra. Rachel Meneguello
Presidente
Comissão Central de Pós-Graduação
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 de Mestrado, intitulada ESTUDOS DA PATOGENICIDADE DE ESTIRPE VARIANTE BRASILEIRA (BR) DO VÍRUS DA BRONQUITE INFECCIOSA DAS GALINHAS, não infringem os dispositivos da Lei n.º 9.610/98, nem o direito autoral de qualquer editora.

Campinas, 13/08/2015


Leonardo Cardia Caserta
Autor
RG n.º 449561550


Clarice Weis Arns
Orientador
RG n.º 5003366001