
VÍRUS DA BRONquite INFECCIOSA AVIÁRIA: PERFIS DE IMUNOGENICIDADE E NOVOS PATOTIPOS NO BRASIL – REVISÃO DE LITERATURA

SANTOS, Romeu Moreira dos¹
FERNANDO, Filipe Santos¹
MONTASSIER, Maria de Fátima da Silva¹
SILVA, Ketherson Rodrigues¹
LOPES, Priscila Diniz¹
BORZI, Mariana Monezi¹
OLIVEIRA, Elisabete Schirato de¹
MONTASSIER, Helio José²

Recebido em: 2018.01.28

Aprovado em: 2018.05.08

ISSUE DOI: 10.3738/21751463.2935

RESUMO: A bronquite infecciosa das galinhas (BIG) é uma doença infecciosa causada pelo coronavírus aviário (vírus da bronquite infecciosa – VBI) que está amplamente disseminada entre as criações avícolas comerciais na maior parte do mundo. Esse vírus apresenta alta capacidade de variabilidade genética, o que se traduz pelo aparecimento de alterações marcantes na composição, estrutura e propriedades antigênicas e biológicas de suas proteínas. Diante disso, este trabalho tem por objetivo realizar uma revisão bibliográfica sobre os novos genótipos, tipos antigênicos e de patotipos do VBI que foram isolados nas últimas décadas no Brasil, abordando principalmente a imunogenicidade dessas estirpes do VBI. Assim, essa revisão destaca que com o aparecimento de variantes antigênicas e biológicas entre as estirpes do VBI nos últimos anos, ocorreu o surgimento de diferentes genótipos, sorotipos e patotipos deste vírus o que resultou em um aumento nas falhas vacinais contra esta doença e a necessidade de serem desenvolvidas novas preparações vacinais que proporcionem tanto respostas mediadas por anticorpos como por células T, especialmente no compartimento das mucosas e que resultem em um estado de proteção mais efetivo contra as variantes brasileiras do VBI.

Palavras- chave: Coronavírus aviário. Ornitopatologia. Vacinação.

AVIAN INFECTIOUS BRONCHITIS VIRUS: IMMUNOGENICITY PROFILES AND NEW PATHOTYPES IN BRAZIL - LITERATURE REVIEW

SUMMARY: Infectious bronchitis of chickens (BIG) is an infectious disease caused by avian coronavirus (IBV) that is widely disseminated among commercial poultry farms in most parts of the world. IBV has a high genetic variability, which is reflected by the appearance of marked changes in the composition, structure and antigenic and biological properties of its proteins. Therefore, the objective of this work is to carry out a bibliographical review on the new genotypes, antigenic types and IBV pathotype that have been isolated in the last decades in Brazil, mainly addressing their immunogenicity profiles. With the appearance of antigenic and biological variants among IBV strains in the last years, different genotypes, serotypes and pathophyses of this virus occurred, which resulted in an increase in vaccine failures against this disease and the need to develop new vaccine preparations which provide both antibody and T cell mediated responses, especially in the mucosal compartment, and which result in a more effective protection status against Brazilian VBI variants.

Keywords: Avian coronavirus. Ornitopathology. Vaccination.

¹ Pós-graduando da Universidade Estadual Paulista "Julio de Mesquita filho" - UNESP Câmpus Jaboticabal-SP

² Docente da Universidade Estadual Paulista "Julio de Mesquita filho" - UNESP Câmpus Jaboticabal-SP

INTRODUÇÃO

A avicultura brasileira tem ganho destaque cada vez maior no cenário mundial, e em vista de sua alta produtividade, transformou o Brasil em um dos maiores exportadores de carne de frango do mundo. A propósito, a produção de carne de frango chegou a 13,5 milhões de toneladas em 2017, em um crescimento de 1,7% em relação a 2016. Com este desempenho, o Brasil se tornou o segundo maior produtor mundial, abaixo apenas dos Estados Unidos, com 18,2 milhões de toneladas, conforme projeções do Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (ANUALPEC, 2016).

Estes dados dimensionam a importância da avicultura brasileira no cenário econômico do país. No entanto, deve-se enfatizar que as atividades desse setor em nosso país podem ser ainda mais rentáveis dependendo do estado sanitário das aves, especialmente no sentido de que sejam implementadas medidas mais efetivas para o controle das enfermidades infecciosas que acometem as aves submetidas a diferentes condições de criação que geram perdas decorrentes da menor eficiência na produção, bem como perdas por mortalidade. Dentre tais enfermidades infecciosas, destaca-se por sua ampla disseminação e enormes prejuízos que acarreta, a Bronquite Infecciosa das Galinhas (BIG). Trata-se de uma doença infecciosa aguda que acomete frangos de corte, matrizes e poedeiras, sendo seu agente etiológico o vírus da bronquite infecciosa aviária (VBI) (BANDE et al., 2016; CAVANAGH, 2007; JACKWOOD, 2012; JACKWOOD; DE WIT, 2017; MONTASSIER, 2010).

O VBI apresenta no curso de seu processo de replicação alta variabilidade genética, o que se traduz pelo aparecimento de alterações marcantes na composição, estrutura e propriedades antigênicas e biológicas de suas proteínas. Como consequência de sua alta variabilidade genética, há o aparecimento de variantes antigênicas e biológicas entre as estirpes do VBI, acarretando a emergência de diferentes genótipos, sorotipos / tipos antigênicos, protectotipos e patotipos do VBI (BANDE et al., 2016; CAVANAGH, 2007; COLVERO et al., 2015; JACKWOOD, 2012; JORDAN, 2017; MONTASSIER et al., 2010, 2012).

No Brasil, pouco se tem investigado sobre as alterações imunes e de patogenicidade mais relevantes que as variantes isoladas de campo do VBI têm sofrido, bem como quais os seus reflexos dessas alterações nas relações com os seus hospedeiros naturais, assim como no estado de proteção induzido pelas vacinas comerciais disponíveis contra a BIG (BALLESTRIN et al., 2014; FERNANDO et al., 2013; 2015; 2017; OKINO et al., 2017).

Por isso, há necessidade de se fazer uma caracterização mais completa dos novos isolados variantes do VBI no Brasil, em especial quanto aos seus perfis de patogenicidade

(patotipos) e de imunogenicidade (antígeno-tipos e protectotipos). Assim, este trabalho tem por objetivo realizar uma revisão bibliográfica sobre os novos genótipos, tipos antigênicos, protectotipos e patotipos do VBI que surgiram nas últimas décadas, no Brasil, com a finalidade de indicar as condições e os procedimentos mais eficazes para se alcançar um controle imunoprolático mais efetivo da BIG nos plantéis avícolas nacionais.

1 REVISÃO DE LITERATURA

1.1 Bronquite infecciosa das galinhas (BIG)

A bronquite infecciosa das galinhas pode ser definida como uma doença altamente infecciosa, de etiologia viral, de caráter agudo que acomete aves domésticas (*Gallus gallus*), de ambos os sexos e com alta prevalência em regiões com maior densidade populacional (JACKWOOD; DE WIT, 2017). A BIG é encontrada em praticamente todas as regiões produtoras avícolas do mundo, causando problemas em aves jovens e adultas. Assim, uma grande diversidade de estirpes do VBI acomete frangos de corte, poedeiras, matrizes leves e pesadas, podendo manifestar nessas aves alterações patológicas e clínicas respiratórias, renais, reprodutivas e entéricas (COOK; JACKWOOD; JONES, 2012).

Portanto, tem sido relatado que a infecção pelo VBI compromete de diferentes maneiras o estado sanitário das aves acometidas e facilita o desenvolvimento de infecções bacterianas secundárias, resultando, conseqüentemente, em perdas consideráveis da produtividade de criações comerciais de frangos de corte, galinhas de postura ou de aves reprodutoras (BANDE et al., 2016; COLVERO et al., 2015; JORDAN, 2017).

1.2 Etiologia da BIG

O agente etiológico da BIG é o VBI, um membro do grupo 3, classificado na ordem Nidovirales, família Coronaviridae, subfamília Coronavirinae e pertencente ao gênero Gammacoronavirus (ICVA, 2018).

Os coronavírus são vírus envelopados, pleomórficos, aproximadamente arredondados, com aproximadamente 100nm a 150nm de diâmetro e com quatro a seis proteínas estruturais, dependendo da espécie viral. O genoma do VBI é constituído de RNA de 27,6 kDa de fita simples e sentido positivo que codifica quatro proteínas estruturais; a glicoproteína de espícula de superfície (S), a glicoproteína de membrana (M), a glicoproteína pequena do envelope viral (E) e a nucleoproteína de capsídeo (N). Esta última (N) está associada ao genoma viral para formar o nucleocapsídeo (NC), enquanto as outras proteínas estruturais - projeções superficiais – espícula

de superfície (S), proteína da membrana (M) e do envelope (E) - estão inseridas no envelope que circunda o nucleocapsídeo. As proteínas M e E são necessárias à formação da partícula viral. A glicoproteína S contém epítomos específicos para cada um dos diferentes sorotipos do VBI e, ainda, sítios envolvidos na adsorção ao receptor celular e entrada do vírus na célula hospedeira, além de induzirem anticorpos neutralizantes (CAVANAGH, 2007).

Ademais, a glicoproteína S é pós-translacionalmente clivada em duas subunidades, a subunidade amino-terminal S1 de 92kDa e a subunidade S2 de 84 kDa, compreendendo cerca de 500 e 600 aminoácidos, respectivamente. Na verdade, a glicoproteína S pode ser dividida em três domínios estruturais, sendo um domínio externo (dividido em dois subdomínios S1 e S2), um domínio transmembrana e um domínio curto carboxi-terminal. O gene codificador da glicoproteína S1 é o mais variável e pode apresentar várias mutações que resultam em mudanças correspondentes nas sequências de aminoácidos da proteína S1, podendo acarretar alterações na antigenicidade e no tropismo tecidual das estirpes variantes do VBI. Estas variações podem ocorrer em torno de 2% a 25% na sequência de aminoácidos. Por outro lado, a subunidade S2 é mais conservada (CAVANAGH, 2007; MCKINLEY et al., 2008).

Ainda, conforme descrito acima, deve-se salientar que a glicoproteína S1 é responsável pela infectividade viral, por possuir sítios que se combinam com os receptores de células alvo da infecção pelo VBI. Dessa forma, em regiões próximas a esses sítios estão presentes os principais determinantes antigênicos que induzem a formação de anticorpos neutralizantes. Um aspecto interessante é que a variação gênica de algumas regiões codificadoras da glicoproteína S, especialmente aquelas correspondentes aos sítios de vírus-neutralização, passa a se constituir na principal estratégia do VBI para escapar dos mecanismos de defesa do hospedeiro (CAVANAGH et al., 2007; FERNANDO et al., 2017; JORDAN, 2017; MONTASSIER et al., 2006; 2012).

Por isso, pode-se afirmar que a glicoproteína S1 possui um papel biológico de elevada relevância para as interações do VBI com o organismo hospedeiro das aves. Ainda, nesse mesmo contexto, sabe-se que a glicoproteína S1 é a principal indutora da resposta imune protetora contra a infecção por esse vírus, sendo então de fundamental importância na identificação mais acurada de quais estirpes desse vírus, que sofreram variação gênica e, que portanto podem ter sofrido alterações nas suas antigenicidade e patogenicidade, a fim de estabelecer relações melhor fundamentadas com a estirpe vacinal de referência do VBI, que é usada em um determinado país para o controle imunoprolifático da BIG. (JACKWOOD et al., 2012).

As mudanças ativas e constantes da população do VBI permitem a seleção da subpopulação de VBI melhor adaptada ao hospedeiro, garantindo a sua sobrevivência por períodos relativamente longos desse vírus nas células, no organismo e na população hospedeira, o que pode resultar em mudanças na patogenicidade e, conseqüentemente, na emergência de novos

patotipos desse vírus (CAVANAGH, 2007; JACKWOOD; DE WIT, 2017; MONTASSIER, 2010).

1.3 Transmissão, período de incubação e patogenicidade do VBI

O VBI se dissemina entre as aves susceptíveis principalmente pela via aerossol rapidamente por contato direto ou indireto. Dentro desse contexto, tem sido também sugerida a transmissão vertical do vírus, mas ainda não existem fatos comprovados sobre isto. O local primário de replicação do VBI é o trato respiratório superior, independentemente da estirpe ou do patotipo desse vírus (CAVANAGH, 2003).

Dessa forma, é reconhecido que o VBI afeta primariamente o trato respiratório (TR) das aves, sendo esse o principal sítio de replicação viral, embora existam estirpes desse vírus que infectam e causam lesões nos trato respiratório, reprodutivo, urinário e digestivo, tanto em poedeiras, como em reprodutoras e frangos de corte. Vários estudos evidenciaram que esse vírus é epiteliotrópico, replicando-se nas células epiteliais do revestimento das mucosas do trato respiratório, nas células caliciformes secretoras de muco e nas células epiteliais dos pulmões e dos sacos aéreos. Ademais, durante a replicação, o VBI causa estase dos cílios traqueais, tanto in vivo, quanto in vitro, e esse parâmetro tem sido usado para inferir sobre a severidade da infecção no TR. Ainda, a replicação desse vírus nos tecidos do TR causa necrose de células epiteliais e alterações inflamatórias proeminentes na mucosa e submucosa do TR que resultam em sinais clínicos característicos, como dificuldades para respirar, tosse e descarga nasal (CAVANAGH et al., 2007; JACKWOOD; DE WIT, 2017).

A morbidade da infecção pelo VBI é alta, podendo chegar a 100%, enquanto a mortalidade, via de regra, não é tão elevada, mas, no caso de aves jovens serem acometidas pela infecção por estirpes nefropatogênicas, a mortalidade pode alcançar 25%. Além disso, a infecção pelo VBI é frequentemente associada com o desenvolvimento de infecções bacterianas secundárias, especialmente no TR, as quais exacerbam as lesões em tecidos do TR (CAVANAGH et al., 2007; JACKWOOD; DE WIT, 2017).

Estirpes nefropatogênicas do VBI infectam e provocam lesões no sistema urinário manifestada principalmente por lesões como nefrite intersticial, necrose de células epiteliais tubulares e aparecimento de sinais clínicos como diarreia moderada a severa e urolitíase (FERNANDO et. al., 2013; JACKWOOD; DE WIT, 2017). Em poedeiras, podem ser ainda observados as mesmas lesões macro e microscópicas, bem como os sinais clínicos acima relatados, mas também alterações patológicas e clínicas no sistema reprodutivo, caracterizadas por produção de ovos deformados e com casca fina e porosa, queda na produção de ovos e

alterações na qualidade do albúmen e, eventualmente, alguns patotipos do VBI provocam em aves mais jovens lesões nos ovidutos com acúmulo de grande quantidade de fluido, caracterizando o quadro patológico e clínico conhecido como “false layers” (CHOUSALKAR; ROBERTS, 2007; COOK, 2001; DI FÁBIO et al., 2000; JACKWOOD; DE WIT, 2017).

A despeito do que foi descrito acima, não existem lesões macroscópicas patognomônicas na infecção pelo VBI, nem são observados corpúsculos de inclusão característicos nas células infectadas pelo VBI. O exame histológico pode ser um recurso para avaliar a virulência, a patogenicidade de estirpes isoladas de campo do VBI e ainda para avaliar as respostas de imunoproteção induzidas por vacinas contra tais estirpes.

Ao nível do trato respiratório, seja em situações de desafio de campo ou experimental com o VBI, os principais achados histopatológicos são diminuição do revestimento de cílios nas células do epitélio traqueal, descamação do epitélio traqueal, presença de infiltrado de células inflamatórias de polimorfo e mononucleares e de edema na mucosa e submucosa, sendo observado ainda, congestão vascular nesses tecidos. Na submucosa, são encontrados vacuolização das células glandulares (ácinos secretores) e hemorragia e, o lúmen traqueal pode conter exsudato seromucoso, que pode ou não conter células inflamatórias (COOK; JACKWOOD; JONES, 2012).

A perda de cílios e a descamação no epitélio traqueal ocorrem nos primeiros dois dias de infecção, seja qual for a idade em que esteja ocorrendo a infecção pelo VBI. Em aves jovens o edema de submucosa da traqueia é proeminente, com presença de discreto infiltrado inflamatório. Em aves mais velhas, esse infiltrado já se apresenta mais intenso, talvez pelo fato de a resposta imune dessas aves ser mais eficiente. Ademais, esse infiltrado celular, bem como a presença de edema, também tem relação com a estirpe e o patotipo do VBI, pelo fato de esta poder ter maior ou menor virulência. Infecções secundárias por bactérias após a infecção pelo VBI também podem interferir na presença e na composição do infiltrado de células inflamatórias na submucosa do trato respiratório (CAVANAGH, 2003).

Apesar de a infecção pelo VBI inicialmente ocorrer no trato respiratório, há algumas estirpes desse vírus que podem apresentar tropismo e patogenicidade por outras células epiteliais, como as dos rins e gônadas, e outros tipos celulares do trato gastro-intestinal (CAVANAGH, 2005, 2007; , JACKWOOD; DE WIT, 2017).

Em casos de estirpes nefropatogênicas do VBI são observados alterações macro e microscópicas como rins inchados e com manchas esbranquiçadas (depósitos de uratos), presença de túbulos distendidos e ureteres contendo cristais de urato, sendo que nesse caso, a mortalidade pode chegar a 25% das aves. Alterações citopáticas no epitélio tubular são também observadas, como consequência, inflamação intersticial e infiltrado de leucócitos polimorfonucleares são

vistos na região medular e cortical dos rins. Além disso, degradação tubular extensiva e necrose podem ser observadas entre 5 a 10 dias pós-infecção com estirpes desse patótipo do VBI (BANDE et al., 2016; CONG et al., 2013; IGNJATOVIĆ; SAPATS, 2000).

No trato reprodutivo pode-se desenvolver, por ação da infecção pelo VBI, degeneração do ovário e aumento de tamanho dos ovidutos nas fêmeas e infertilidade nos machos. Reduções das células epiteliais acompanhada da redução ou perda total dos cílios também podem ser observadas no oviduto (BANDE et al., 2016; CHOUSALKAR; ROBERTS, 2007; IGNJATOVIĆ; SAPATS, 2000).

Ademais, a persistência do VBI em órgãos de aves infectadas ainda não está bem elucidada, porém, a detecção desse vírus em tonsila cecal e fezes até 20 semanas pós-infecção, demonstra a possibilidade de persistência e potencial de transmissão desse vírus, trazendo dificuldades adicionais para o controle da infecção pelo VBI (ALEXANDER; GOUGH, 1977; BANDE et al., 2016).

1.4 Imunidade contra o VBI

Sabe-se que a infecção pelo VBI é capaz de induzir uma grande diversidade de mecanismos imunes efetores, tanto aqueles vinculados às respostas imunes inatas, como às respostas imunes adaptativas, sendo que esses mecanismos se desenvolvem sistemicamente e junto às mucosas do trato respiratório, durante o estágio inicial da infecção por esse vírus, ou em aves não imunes, ou naquelas que tiverem sido previamente vacinadas. Foi constatado também que esses mecanismos imunes são diretamente responsáveis por parte da remoção (“clearance”) desse vírus ao nível da traquéia (porta de entrada) e de outros tecidos que vierem a ser infectadas com esse mesmo vírus (CHHABRA et al., 2015; GUO et al., 2008; OKINO et al., 2013, 2017; WANG et al., 2006).

As infecções pelo VBI induzem respostas imunes inatas de intensidades elevadas e que se caracterizam por uma rápida produção de citocinas pró-inflamatórias, como IL1 β e IL6 e os interferons do tipo I (IFN α/β), sendo que esses últimos exercem atividade inibitória sobre a replicação viral. Esta resposta anti-viral inata se inicia através do reconhecimento de moléculas de padrões de reconhecimento molecular de patógenos (PAMPs) que compõem as partículas virais, principalmente os RNAs dos genomas virais de dupla cadeia (dsRNA) ou os de cadeia simples (ssRNA), por meio de receptores reconhecedores de padrões moleculares de patógenos (PRRs); como o TLR-3, TLR-7, MDA, LGP2 e NLRC5 (okinoCHABRA et al., 2015; GUO et al., 2008, KAMEKA et al., 2014; OKINO et al., 2013, 2017).

A expressão de citocinas pró-inflamatórias está diretamente envolvida com o recrutamento de leucócitos polimorfonucleares e mononucleares para o sítio primário da infecção

pelo VBI. Entretanto, a produção de algumas citocinas pró-inflamatórias varia dependendo da estirpe viral do VBI e da linhagem de aves infectadas (ASIF et al., 2007; FERNANDO et al., 2015, OKINO et al., 2017). Por conta disso, a superprodução de algumas citocinas, como IL6, IL1 β e IFN γ , podem resultar em graves lesões patológicas locais, além de não ter efeito no sentido de reduzir a carga viral (ASIF et al., 2007, FERNANDO et al., 2015; KAMEKA et al., 2014, OKINO et al., 2017).

Em síntese, a ativação das vias intra-celulares sinalizadoras para a produção de citocinas pró-inflamatórias, como a IL-1 β , IL-6, os IFNs do tipo I α/β e também as citocinas anti-inflamatórias como a IL-10, pode ser de fundamental importância para que haja continuidade entre as respostas imunes inatas e as adaptativas contra o VBI, que ocorrem ao nível das mucosas, através da modulação do micro-ambiente local, ou inversamente para que haja uma situação de perda da regulação do processo inflamatório que, nesse último caso, não evoluiu para a imunidade adaptativa, mas sim para um quadro de lesões mais severas (GUO et al., 2008, KAMEKA et al., 2014, OKINO et al., 2017). Ainda, dentro do contexto da imunidade inata, deve-se considerar o papel importante exercido pelas Células NK (*natural killer*) contra agentes infecciosos virais, que atuam em processos de destruição das células infectadas por vírus, e, também, produzindo IFNs do tipo I, os quais se constituem em importantes mecanismos de imunidade contra patógenos virais como o VBI no início do processo infeccioso e antes do desenvolvimento da resposta imune adaptativa (CHABRA et al., 2015; OKINO et al., 2017).

Os primeiros sítios de desafio na infecção pelo VBI nas aves são as mucosas, principalmente as do trato respiratório, digestório e uro-genital. Estes sítios, possuem coleções de tecidos linfóides especiais associados a essas mucosas, como o HALT (tecido linfóide associado à cabeça – *head associated lymphoid tissue*), o GALT (tecido linfóide associado aos intestinos - *gut associated lymphoid tissues*) e o BALT (tecido linfóide associado aos brônquios - *Bronchio associated lymphoid tissues*), nos quais estão distribuídos as células apresentadoras de antígenos; como as células dendríticas e os macrófagos, os linfócitos B e T que são os responsáveis diretos após o reconhecimento dos antígenos pela geração de respostas imunes adaptativas humorais e celulares para atuarem na proteção das superfícies mucosas contra os agentes infecciosos em geral e particularmente contra o VBI, por meio da produção de anticorpos do isótipo IgA e IgG ou na geração de células Tc CD8+ efectoras (CHHABRA et al, 2015; GUO et al., 2008; OKINO et al., 2013; 2017; WANG et al., 2006).

Ademais, é reconhecido também que a maioria dos anticorpos anti-VBI dos isótipos IgA, IgG e IgM, presentes nas secreções mucosas do trato respiratório e anexos, como a mucosa ocular, é produzida pelos tecidos linfóides traqueo-bronquiais e principalmente pela glândula de Harder (órgão linfóide especializado das aves que está localizado na cavidade orbital), em

resposta à inoculação de suspensões virulentas ou atenuadas (vacinas “vivas) do VBI (CHHABRA et al, 2015; LANCELLOTTI et al., 2014, OKINO et al., 2013). Para os anticorpos do soro sanguíneo foram detectadas atividades vírus-neutralizantes contra o VBI, bem como foi verificado que a presença de altos títulos de anticorpos séricos estão associadas com a ausência de re-isolamento do VBI nos rins e no trato reprodutor das aves infectadas experimentalmente com esse vírus. No entanto, a maior parte dos artigos da literatura destaca que os títulos de anticorpos anti-VBI no soro sanguíneo, ao contrário dos anticorpos presentes na secreções mucosas, não apresentam boa correlação com o estado de proteção ao desafio com estirpe virulenta do VBI, especialmente quando o estado de proteção é avaliado na traqueia; através da mensuração da integridade do movimento ciliar, do grau de lesões histológicas e do re-isolamento ou carga viral nesse mesmo órgão (CHHABRA et al, 2015; LANCELLOTTI et al., 2014, OKINO et al., 2013, 2017).

Foi verificado também que a resposta mediada por células T CD8⁺ citotóxicas (CTLs) também é de crucial importância na fase inicial da infecção pelo VBI e está envolvida com a inibição da replicação viral e com eliminação de células infectadas com esse patógeno. As respostas mediadas por CTLs durante a infecção pelo VBI apresentam correlação negativa com as alterações patológicas em tecidos e órgãos alvo da infecção por esse vírus, além da atividade citotóxica requerer a compatibilidade de moléculas do Complexo de Histocompatibilidade Principal (MHC) de classe I da célula alvo do processo de citólise com o das células responsáveis por esta atividade, no caso, as células T citotóxicas - CD8⁺ (CHHABRA et al., 2015; OKINO et al., 2013; 2017).

Dessa forma, foi constatado que a resposta imune celular, especialmente quando mediada por células T citotóxicas (Tc), é bastante eficaz para controlar a infecção pelo VBI, uma vez que ela apresenta correlação negativa significativa com a carga viral e correlação positiva com uma melhora clínica e patológica do animal. Ainda, dentro desse contexto, sabe-se que a atividade das células T pode ser avaliada através dos níveis de expressão gênica ou de produção de IFN γ , assim como a atividade das células T citotóxicas, pode ser avaliada pelos níveis de expressão gênica ou de produção de Granzima A e Perforina (OKINO et al., 2013; 2017).

Em síntese, fica evidente que, tanto os elementos efetores da imunidade adaptativa humoral, como da imunidade cito-mediada que são induzidos no compartimento das mucosas do trato respiratório superior após a administração de vacina viva atenuada contra o VBI em pintinhos com 1 dia de idade, exercem papéis relevantes na proteção contra esse vírus (CHHABRA et al., 2015; OKINO et al., 2013). E, dentre os principais marcadores da imunidade pós-vacinal contra o VBI, ou imuno-correlatos de proteção, destacam-se os níveis de anticorpos anti-VBI do isótipo IgG e IgA na secreção lacrimal e também os níveis de expressão do gene

codificador do homólogo da Granzima A na traqueia, os quais se elevaram mais precocemente após o desafio (1 a 3 dias pós-desafio) e foram os parâmetros que apresentaram correlações negativas mais elevadas com todos os indicadores de proteção do trato respiratório e especificamente da mucosa traqueal (ciliostase, histopatologia e replicação viral), quando as aves previamente vacinadas foram desafiadas com a estirpe virulenta M41 do VBI. Em adição a esses dois grupos de parâmetros, verificou-se também, nesses mesmos estudos, que a expressão dos genes codificadores de CD8+ e IFN- γ (RNAm) também apresentaram elevações mais precoces pós-desafio e correlações substanciais com um ou dois dos parâmetros de proteção traqueal avaliados. Isso indica que a vacinação de pintinhos com 1 dia de idade com a vacina atenuada contra o VBI induziu respostas imunes humorais e celulares de memória no compartimento de mucosas do trato respiratório superior, tanto no que concerne à produção de anticorpos como de células T citotóxicas, que proporcionaram o desenvolvimento de mecanismos de proteção mais rápidos e capazes de restringir a replicação viral e reduzir as alterações patológicas na traqueia das aves desafiadas com estirpe virulenta do VBI (CHHABRA et al., 2015; OKINO et al., 2013).

1.5 Variantes do VBI no mundo e no Brasil

De maneira semelhante à maioria dos vírus RNA, os Coronavírus apresentam uma alta frequência de mutação a qual decorre principalmente dos mecanismos de falhas de correção (“proof-reading”) da enzima RNA-polimerase desse vírus, bem como pelo fato de a transcrição do RNA genômico ser descontínua nos coronavírus e se processar em “saltos”. Assim, a evolução de estirpes variantes do VBI é um fenômeno relativamente frequente, em virtude da alta capacidade de variabilidade genética desse vírus, o que se traduz pelo aparecimento de alterações genéticas marcantes especialmente nos genes codificadores das proteínas estruturais S e N e, em menor escala, das proteínas não estruturais ou até mesmo em regiões não codificadoras. Essas alterações genéticas acarretam mudanças relevantes nas características fenotípicas, como por exemplo, nas propriedades antigênicas e naquelas associadas à virulência e/ou à patogenicidade desse mesmo agente infeccioso. Para ilustrar melhor as consequências da grande variabilidade que ocorre entre as estirpes do VBI, já foram descritos, em diversas partes do mundo, mais do que 20 sorotipos desse vírus (CHACÓN et al., 2011; JACKWOOD et al., 2012; JACKWOOD; DE WIT, 2017; MONTASSIER et al., 2006; MONTASSIER, 2010; VILLARREAL et al., 2010).

Devido a alta taxa de variabilidade genética durante a transcrição gênica, o VBI pode ser considerado como uma “quasiespecies”, que se define como agrupamentos contendo um conjunto de variantes genotípicas e fenotípicas de uma progênie desse vírus, que tem como fundamentação a divisão genômica interespecífica causada por influências internas e/ou externas, tais como o

ambiente, os mecanismos de escape desencadeados pelo vírus, variabilidade e suscetibilidade ao hospedeiro (FERNANDO et. al., 2017). Na verdade, o fenômeno da geração de quasispecies nas progênies virais tem sido relatado entre os coronavírus, incluindo o VBI e considera-se que é importante para a evolução e persistência destes vírus dentro do organismo hospedeiro, porque pode favorecer o surgimento de novas variantes desse vírus no campo e pode contribuir com os mecanismos de escape do vírus às respostas imunes do hospedeiro (MONTASSIER, 2010).

As primeiras variantes do VBI foram isoladas no início dos anos 1950 nos Estados Unidos, tendo sido nessa ocasião isolada a estirpe Connecticut (Conn), a qual não apresentava reação de neutralização e nem proteção vacinal quando utilizada a vacina da estirpe Massachusetts, isolada no início dos anos 1940. Desde então muitos relatos de outras variantes do VBI foram descritos em todo o mundo. Este fato levou a uma maior atenção para a busca e a identificação e estirpes variantes e o conhecimento de que muitos países possuem suas próprias estirpes, denominadas indígenas (CAVANAGH, 2007; JACKWOOD et. al., 2012).

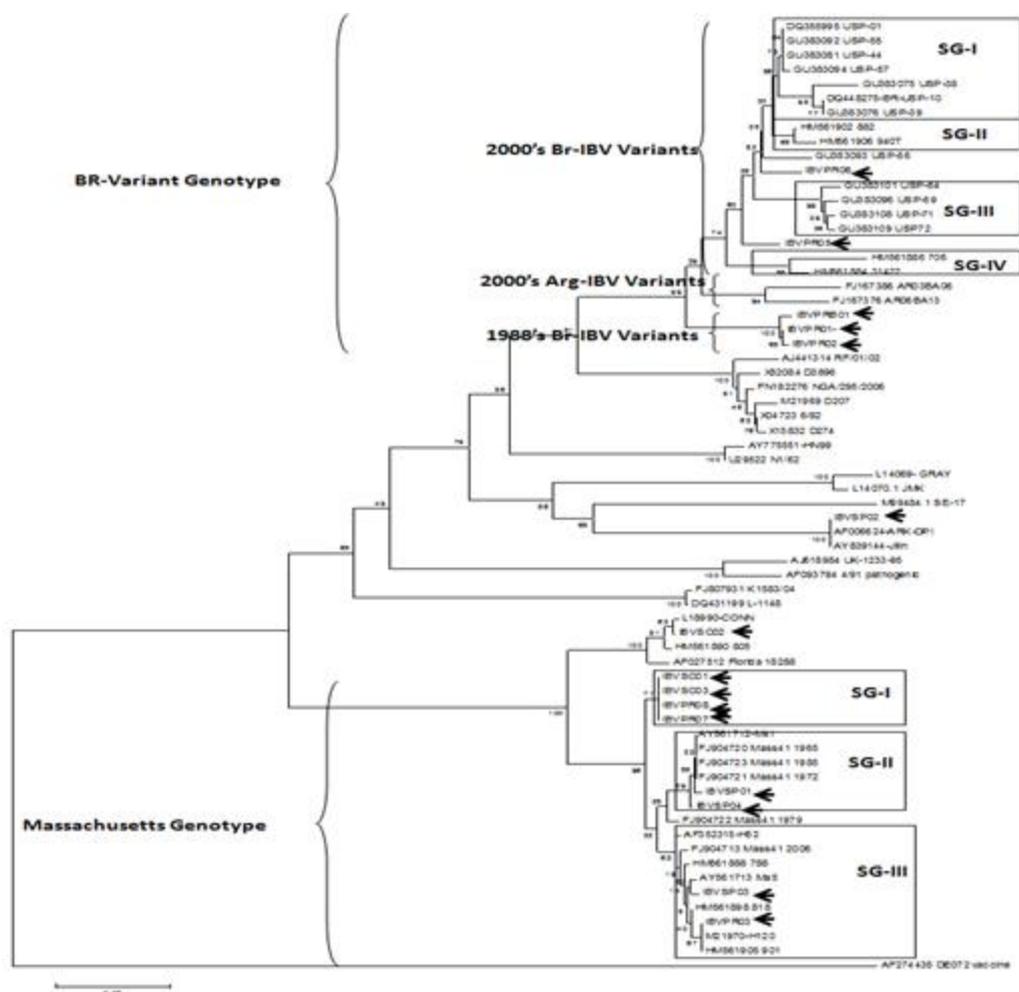
Ao se considerar a ocorrência de estirpes do VBI na América Latina, verifica-se que a presença desse vírus foi relatada pela primeira vez no final da década de 1950 após o isolamento de uma estirpe do sorotipo Mass no Brasil (HIPÓLITO, 1979). As estirpes desse sorotipo parecem ter predominado no Brasil até meados da década de 80, quando foi reportado o isolamento da primeira variante no Brasil (BRANDEN; DA SILVA, 1986).

Em outro estudo realizado em meados de 1990, foram isolados 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 (DI FABIO et al., 2000; MONTASSIER, 2010). Além disso, a partir de 2000 e com base na análise das sequências de nucleotídeos do gene S1 de isolados de campo do VBI foram identificados, no Brasil, genótipos diferentes daqueles em que são classificadas as estirpes americanas, europeias, asiáticas e australianas do VBI (Figura 1) (BALESTRIN et al., 2014; CHACÓN et al., 2011; FELIPPE et al., 2010; FRAGA et al., 2013; MONTASSIER et al., 2006, 2012; VILLARREAL et al., 2007, 2010). Além disso, foram também identificadas estirpes variantes brasileiras do VBI com relação à sequência de nucleotídeos do gene da nucleoproteína (N) (ABREU et al., 2006).

Os estudos de proteção vacinal contra estirpes do VBI isoladas na década de 1990 no Brasil mostraram que o sorotipo Mass, forneceu proteção inadequada contra a maior parte dessas novas variantes brasileiras do VBI (COOK et al., 1999; DI FABIO et al., 2000). Consta também, na literatura, que essas estirpes foram isoladas de surtos de BIG, apresentando diversas manifestações clínicas e patológicas, tais como traqueobronquites e aerossaculites, lesões renais e problemas reprodutivos em fêmeas e em machos. Esses achados clínico-patológicos caracterizaram, assim, o potencial de um amplo espectro de patotipos dentre esses isolados do

VBI no Brasil (BALESTRIN et al., 2014; CHACÓN et al., 2011; 2014; FELIPPE et al., 2010, FRAGA et al., 2013; MONTASSIER et al., 2006, 2012; VILLARREAL et al., 2007, 2010).

Figura 1. Diferentes genótipos do VBI encontrados no Brasil e no mundo



Fonte: Montassier et al., 2012.

Ademais, foi demonstrado que uma das estirpes variantes brasileiras do VBI (IBVPR05) apresentava, em ensaios de infecção experimental, maior patogenicidade para os rins (nefropatogênica) e menor para o trato respiratório e, ainda, foi observado que a infecção por esta estirpe era somente em parte controlada pela vacina formulada com a estirpe Massachusetts (H120) do VBI, quanto à proteção contra alterações patológicas traqueais e renais induzidas por esse vírus. Portanto, as vacinas formuladas com estirpes Massachusetts não eram capazes de induzir proteção integral e efetiva contra variantes brasileiras do genótipo BR do VBI (FERNANDO et al., 2013; 2017).

1.6 Controle e prevenção da BIG

O controle e a prevenção da BIG deve ser baseado principalmente na aplicação de medidas de biossegurança e rigoroso controle sanitário dos plantéis avícolas. Além disso, vacinas vivas atenuadas são importantes na imunoprofilaxia da infecção pelo VBI para aves dos diferentes tipos de criação, e as vacinas inativadas em emulsão oleosa antecedidas da imunização com vacina viva atenuada, são especialmente recomendadas para conferir uma maior imunoproteção a aves poedeiras e reprodutoras (BANDE et al, 2015). As vacinas vivas atenuadas conferem imunidade local mais efetivas no trato respiratório, entretanto, há o risco de patogenidade residual, reversão de virulência e persistência nas aves de uma granja vacinada, enquanto que as vacinas inativadas são menos efetivas em induzir proteção no compartimento das mucosas e, principalmente os mecanismos mediados por células Tc (CHHABRA et al., 2015; LOPES et al., 2018; MCKINLEY et al., 2008). Dentre as vacinas atenuadas, estão disponíveis no Brasil, aquelas que são formuladas com as estirpes atenuadas do genótipo / sorotipo Massachusetts, como a H52 e a H120, derivadas da amostra Holland (H) e ainda a estirpe atenuada Ma5. Além disso, as estirpes atenuadas do sorotipo / genótipo Massachusetts, especialmente a H120 e a Ma5 são as mais usadas globalmente devido à capacidade que tais estirpes têm de promover proteção cruzada contra diferentes sorotipos do VBI (DE WIT et. al., 2015).

1.7 Vacinação versus variantes do VBI

Sabe-se que no Brasil, a estirpe Mass era a única estirpe licenciada pelo Ministério da Agricultura e Pecuária (MAPA) para a formulação de vacinas até 2015, quando foi aprovada o uso de formulações vacinais inativada (2015) e atenuadas (2016), contendo estirpes do genótipo BR-I do VBI (CHACÓN et al., 2016). Nesse caso, deve-se ressaltar que as razões para a aprovação dessas novas vacinas contra o VBI foi o fato de que as estirpes dos genótipos BR-I e BR-II do VBI que circulam no Brasil apresentam baixa identidade com a região S1 da estirpe Massachusetts e reduzida proteção cruzada com relação à estirpe vacinal atenuada Massachusetts (CHACÓN et al., 2011; 2016; FERNANDO et al., 2013, 2017; FRAGA et al., 2013; MONTASSIER et al., 2006; 2012; VILLARREAL et al., 2010). Algumas dessas estirpes dos genótipos BR apresentam tropismo para o trato respiratório, outras para os tratos gastrointestinal, reprodutivo e/ou urogenital (BALESTRIN et al., 2014; CHACÓN et al., 2014; VILLARREAL et al., 2010), o que requer uma abordagem mais abrangente na formulação de vacinas visando à geração de estados de imuno-proteção tanto para os compartimentos de mucosa como sistêmicos das aves hospedeiras.

Um ponto interessante a considerar na imunoprofilaxia da BIG é que para se obter uma eficiente proteção contra a infecção pelo VBI, é necessário identificar os genótipos / sorotipos desse vírus predominantes para cada região / país e também determinar o potencial de proteção cruzada, isto é, o protectotipo das estirpes vacinais existentes em relação às novas estirpes do VBI isoladas de campo, procurando, dessa forma, otimizar os programas estratégicos de vacinação contra a BIG (CHHABRA et al., 2015; COOK et al., 2012; JACKWOOD, 2012; JORDAN, 2017).

Assim, devido às limitações que a estirpe vacinal Massachusetts tem para induzir proteção cruzada mais efetiva contra as estirpes dos genótipos brasileiros do VBI, tal como foi relatado acima, em 2016 começou a ser produzida e comercializada uma vacina viva atenuada contendo um genótipo BR-I, com o objetivo de induzir proteção contra as diversas variantes que emergiram no país (CHACÓN et al., 2016). Esses autores testaram a proteção da vacina viva atenuada BR-I contra diferentes variantes pertencentes ao grupo BR-I e compararam a proteção induzida pela vacina viva atenuada Massachusetts e observaram que a vacina contendo o genótipo brasileiro induziu total proteção contra o desafio com as estirpes homólogas do genótipo BR-I, de acordo com os resultados dos sinais clínicos, da ciliostase traqueal e da carga viral, enquanto a vacina Massachusetts falhou na indução de proteção cruzada contra estirpes do genótipo BR-I do VBI. Além disso, mais recentemente, foi produzida uma nova formulação com uma estirpe inativada do genótipo BR-I do VBI encapsulada em nanopartículas de quitosana que após ter sido administrada por via óculo-nasal, foi capaz de induzir respostas imunes humorais e cito-mediadas na mucosa do trato respiratório superior e anexos que conferiram proteção contra o desafio com estirpe virulenta BR-I homóloga (LOPES et al., 2018).

Em adição a isso, deve-se destacar que os programas de vacinação contra o VBI podem variar de um país para outro, ou mesmo de uma criação avícola para outra, dentro do mesmo país, dependendo das condições locais e do levantamento das principais estirpes identificadas como predominantes em uma dada região. Além disso, em todos os países com avicultura mais avançada, existe uma grande cautela quanto ao uso indiscriminado de vacinas vivas, de modo a não se utilizar estirpes vacinais atenuadas de outras partes do mundo que não estejam presentes em uma dada região ou país, e assim evitar a disseminação de linhagens genéticas e fenotípicas distintas das estirpes locais (CAVANAGH et al., 1997; GELB et al., 1991;)

Em se tratando de Brasil, o controle da BIG tem sido baseado principalmente no uso de vacina viva atenuada com a estirpe Massachusetts do VBI e só mais recentemente foi autorizado o uso de vacina viva atenuada formulada com estirpe do genótipo BR-I do VBI. Ainda neste contexto, deve-se considerar que os mecanismos essenciais de proteção contra a infecção do trato respiratório pelo VBI em galinhas têm sido definidos como a capacidade de o sistema imune

conferir resistência à traqueia contra a infecção por este vírus, reduzindo a replicação viral e impedindo principalmente que ocorram lesões mais severas na traqueia e a completa ciliostase no epitélio desse mesmo órgão, bem como impedindo a disseminação do VBI a partir da porta entrada desse vírus para outros órgãos e tecidos do organismo hospedeiro. No entanto, com o repentino e enorme crescimento da indústria avícola no Brasil, a partir da década de 1990, diversas estirpes do VBI vieram a se adaptar trazendo grandes problemas sanitários. Estas estirpes muitas vezes se manifestam de maneira diferente das comumente associadas com a BIG em nosso país. Portanto, o principal desafio para a comunidade científica e para o setor técnico da avicultura do Brasil é saber o estado de proteção imune efetivamente desencadeado pela vacinação com as estirpes preconizadas e/ou oficialmente autorizadas em nosso país, frente a estas novas variantes do genótipo BR do VBI e de forma a ter mais subsídios para procurar desenvolver vacinas mais eficazes contra essas estirpes do VBI, bem como programas imunoproliféricos mais efetivos contra esse agente infeccioso (FERNANDO et al., 2013; 2017; LOPES et al., 2018; OKINO et al., 2013).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Em vista de todo o exposto, ficou evidenciado nessa revisão que o vírus da bronquite infecciosa (VBI) ocasiona um grande impacto negativo na produção avícola industrial brasileira, sendo que esse vírus é caracterizado principalmente por ocasionar uma doença aguda do trato respiratório de seus hospedeiros, mas devendo-se considerar que algumas novas estirpes deste vírus podem desenvolver lesões em células de outros tecidos e órgãos do trato urinário, reprodutor e digestório das aves infectadas. Esta característica de diferentes tropismos e patogenicidade do VBI está relacionada principalmente à alta taxa de variabilidade genética desse vírus, que se reflete no surgimento de estirpes variantes genéticas e, na maioria das vezes, em variantes fenotípicas, com padrões de tropismo e patogenicidade diferentes das estirpes de referência utilizadas na produção de vacinas.

A prevenção da bronquite infecciosa das galinhas no Brasil é usualmente realizada pela vacinação dos plantéis avícolas, principalmente com a vacina atenuada contendo a estirpe Massachusetts do VBI (Mass) e bem mais recentemente com a vacina com estirpe do genótipo BR-I do VBI. Entretanto, existem situações em que as vacinas comerciais existentes não proporcionam proteção adequada contra desafios por novas estirpes desse vírus. Por isso, uma das medidas profiláticas que poderia proporcionar um controle mais efetivo da infecção com essas estirpes variantes do VBI no país é a adoção de programas de vacinação que utilizem novas preparações vacinais com estirpes homólogas do VBI atenuadas ou inativadas e, nesse último

caso, adicionadas de novos adjuvantes a fim de que tais vacinas sejam capazes de induzir respostas imunes mais efetivas e mediadas tanto por anticorpos como por células T, especialmente no compartimento das mucosas do trato respiratório, que se constitui na principal porta de entrada para esse patógeno viral.

REFERÊNCIAS

- ABREU, J. T. et al. 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 Dis.**, v. 50, p. 494-501, 2006.
- ALEXANDER, D. J.; GOUGH, R. E. Isolation of avian infectious bronchitis virus from experimentally infected chickens. **Research in veterinary science**, v. 23, n. 3, p. 344–347, 1977.
- ASIF, M. et al. Interleukin-6 expression after infectious bronchitis virus infection in chickens. **Viral immunology**, v. 20, n. 3, p. 479–86, 2007.
- ANUALPEC 2016. **Anuário da Pecuária Brasileira. Pecuária de Leite**. São Paulo: IEG/ IFNP, 2016.
- BALESTRIN, E. et al. Infectious bronchitis virus in different avian physiological systems--A field study in Brazilian poultry flocks. **Poultry Science**, v. 93, n. 8, p. 1922–1929, 2014.
- BANDE, F. et al. Progress and challenges toward the development of vaccines against avian infectious bronchitis. **Journal of Immunology Research**, v. 2015, ID 424860, 2015.
- BANDE, F. et al. Pathogenesis and Diagnostic Approaches of Avian Infectious Bronchitis. **Advance in Virology**, v. 2016, ID 4621659, 2016.
- BRANDEN, R. C.; DA SILVA, E. N. Ocorrência de “nuevos” serotipos de bronquitis infecciosa en Brasil. In: **Proceedings of VI Seminario Internacional de Patologia aviar**, 6., Athens, GA, USA, 1986.
- CAVANAGH, D.; ELLIS, M. M.; COOK, J. K. A. Relationship between sequence variation in the S1 spike protein of infectious bronchitis virus and the extent of crossprotection in vivo. **Avian Pathology**, v. 26, n. 1, p. 63-74, 1997.
- CAVANAGH, D.; NAQI, S. A. Infectious bronchitis. In: Saif YM, Barnes HJ, Glisson JR, Fadly AM, McDougald LR, Swayne DE. **Diseases of Poultry**. 11 a ed. Ames: Iowa State Press; p. 101-119, 2003.
- CAVANAGH, D. Coronavirus avian infectious bronchitis virus. **Veterinary Research**, v.38, p.281-297, 2007.
- CHACÓN, J. L. et al. Epidemiological survey and molecular characterization of avian infectious bronchitis virus in Brazil between 2003 and 2009. **Avian Pathology**, v. 40, n. 2, p. 153–162, 2011.

- CHACÓN, J. L. et al. Pathogenicity and molecular characteristics of infectious bronchitis virus (IBV) strains isolated from broilers showing diarrhoea and respiratory disease. **British poultry science**, v. 55, n. 3, p. 271–83, 2014.
- CHACÓN, J. et al. Homologous and heterologous protection against Brazilian BR-I viruses of Infectious Bronchitis. **PSA Annual Meeting**. New Orleans: 2016. Disponível em: https://aaap.memberclicks.net/assets/2016_Annual_Meeting/aaap_proceedings_2016.pdf
- CHHABRA, R.; CHANTREY, J.; GANAPATHY, K. Immune Responses to Virulent and Vaccine Strains of Infectious Bronchitis Viruses in Chickens. **Viral Immunology**. 28: 478-488. 2015.
- CHOUSALKAR, K. K.; ROBERTS, J. R. Ultrastructural study of infectious bronchitis virus infection in infundibulum and magnum of commercial laying hens. **Veterinary Microbiology**, v. 122, n. 3–4, p. 223–236, 2007.
- COLVERO, L. P. et al. E. Assessing the economic burden of avian infectious bronchitis on poultry farms in Brazil. **Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics)**, v. 34, n. 3, p. 993–9, 2015.
- CONG, F. et al. Transcriptome analysis of chicken kidney tissues following coronavirus avian infectious bronchitis virus infection. **BMC Genomics**, v. 14, n. 1, p. 743, 2013.
- COOK, J. Coronaviridae. In: JORDAN, F. et al. Protection of chickens against renal damage caused by a nephropathogenic infectious bronchitis virus. **Avian Pathology**, Colchester, v. 30, n. 4, p. 423-426, 2001.
- COOK, J. K.; JACKWOOD, M.; JONES, R. C. The long view: 40 years of infectious bronchitis research. **Avian Pathology**. 41:3, p. 239-250, 2012.
- DE WIT, J. J.; COOK, J. K. A.; HEIJDEN, H. M. J. F. Infectious bronchitis virus variants: a review of the history current situation and control measures. **Avian Pathology**, v.40 (3), p. 223-235, 2011.
- DE WIT, J. et al. Increased level of protection of respiratory tract and kidney by combining different infectious bronchitis virus vaccines against challenge with nephropathogenic Brazilian genotype subcluster 4 Strains. **Avian Pathology** 44, 352-357. 2015.
- DI FÁBIO, J.; ROSSINI, L. I. Bronquite infecciosa das galinhas. In: BERCHIERI JR. A.; MACARI, M. **Doença das aves**. 1 Ed. Campinas: FACTA, p.293-300, 2000.
- FELIPPE, F. A. N. et al. Genetic diversity of avian infectious Bronchitis vírus isolated from domestic chicken flocks and coronaviruses from feral rigeus in Brazil between 2003 and 2009. **Avian Diseases**, v. 54, n.4, p. 1191-1198, 2010.
- FERNANDO, F. S. et al. Nephritis Associated with a S1 Variant Brazilian Isolate of Infectious Bronchitis Virus and Vaccine Protection Test in Experimentally Infected Chickens. **International Journal Of Poultry Science**, Asia, v. 11, n. 12, p.639-646, 2013.
- FERNANDO, F. S. et al. Increased expression of interleukin-6 related to nephritis in chickens challenged with an avian infectious bronchitis virus variant. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. 35: 216±222. 2015.

FERNANDO, F.S. et al. Assessment of molecular and genetic evolution, antigenicity and virulence properties during the persistence of the infectious bronchitis virus in broiler breeders. **Journal of General Virology**, v. 98, p. 2470-2481, 2017.

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

GUO, X. et al. Molecular mechanisms of primary and secondary mucosal immunity using avian infectious bronchitis virus as a model system. **Veterinary Immunology and Immunopathology**. 121: 332–343. 2008.

HIPÓLITO, O. Isolamento e identificação do vírus da bronquite infecciosa das galinhas no Brasil. **Arquivos Escola Superior Veterinária**. MG, Belo Horizonte, v.10, p.131-63, 1979.a

ICVA - International Committee on Taxonomy of Viruses
<<http://ictvonline.org/virusTaxonomy.asp?version=2016>>. Acesso em: 20 de janeiro de 2018.

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

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

JACKWOOD, M.; De WIT, J. J. Infectious Bronchitis. In G. Swayne, L. R. McDougald, L.K. Nolan, D.L. Suarez, V.L. Nair (Eds.). **Diseases of Poultry** 13th edn (pp. 139–159). Ames, IA: Blackwell Publishing Professional. 2017.

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

JUNGHERR, E. L.; CHOMIAK, T. W.; LUGINBUHL, R. E. Immunologic differences in strains of infectious bronchitis virus. In Annual Meeting of the United States Livestock Sanitary Association, Chicago, IL, USA. **Proceedings Annual Meeting of the United States Livestock Sanitary Association**. p. 203-209. 1956.

KAMEKA, A. M. et al. Induction of innate immune response following infectious bronchitis corona virus infection in the respiratory tract of chickens. **Virology**, v. 450–451, p. 114–121, 2014.

LANCELLOTTI, M. et al. Relationship Between Mucosal Antibodies and Immunity Against Avian Infectious Bronchitis Virus. **International Journal Of Poultry Science**, Afeganistão, v. 13, n. 3, p.138-144, jun. 2014.

LOPES, P. D. et al. Inactivated infectious bronchitis virus vaccine encapsulated in chitosan nanoparticles induces mucosal immune responses and effective protection against challenge. **Vaccine**. v.36, p.2630-2636. 2018.

MARK, W.; JACKWOOD, M.; SJAACK, DE WIT Infectious Bronchitis. In: Swayne D.E., **Diseases of Poultry**, 1st Ed., pages: 139-159. 2017.

-
- MATTHIJS, M.G.R.et al. Course of infection and immune responses in the respiratory tract of IBV infected broilers after superinfection with E. coli. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.27, n.1-2, p.77-84, 2009.
- MCKINLEY, E. T.; HILT, D. A.; JACKWOOD, M. W. Avian coronavirus infectious bronchitis attenuated live vaccines undergo selection of subpopulations and mutations following vaccination. **Vaccine**; 26:1274-1284, 2008.
- MONTASSIER, M.F.S.et al. Genetic diversity on S1 glycoprotein of avian infectious bronchitis virus strains isolated in Brazil between 1988-2000. **Proc. V International Symposium on Corona-and Pneumovirus Infections**, Rauschholzhausen, Germany, P. 119-131. 2006.
- MONTASSIER, M. F. S.et al. Genetic grouping of avian infectious bronchitis virus isolated in Brazil based on RT-PCR/RFLP analysis of the S1 gene. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 28, p. 190-194, 2008.
- MONTASSIER, H. J. Molecular Epidemiology and Evolution of Avian Infectious Bronchitis Virus. **Revista brasileira de Ciência Avícola**. v. 12, n. 2, 87-96, 2010.
- MONTASSIER, M.F.S.et al. Molecular analysis and evolution study of infectious bronchitis viruses isolated in Brazil over a twenty-one-year period. **Proceedings of the 7th International Symposium on Avian Corona and Pneumoviruses and Complicating Pathogens**; Wetter, Germany. Druckerei Schoreder., 1: 19-30. 2012.
- OIE. Avian infectious bronchitis. In: **OIE Terrestrial Manual** P. 443-455. 2008.
- OKINO C. H. et al. Early immune responses and development of pathogenesis of avian infectious bronchitis viruses with different virulence profiles. **Plos One**, [s.l.], v. 12, n. 2, p.1-17, 2017.
- OKINO, C. H.et al. Humoral and Cell-Mediated Immune Responses to Different Doses of Attenuated Vaccine Against Avian Infectious Bronchitis Virus. **Viral Immunology**, Us, v. 26, n. 4, p.259-267, set. 2013.
- VILLARREAL, L. Y. B.et al. Molecular epidemiology of avian infectious bronchitis in Brazil from 2007 to 2008 in breeders, broilers, and layers. **Avian disease**, v. 54, p.894–898, 2010.
- WANG X, ROSA AJ. et al.. Transcriptome of local innate and adaptative immunity during early phase of infectious bronchitis viral infection. **Viral Immunology**; 19:768–774. 2006.

