

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Faculdade de Veterinária
Programa de Pós-Graduação em Veterinária



Tese

**Desenvolvimento e avaliação de uma vacina recombinante contra o vírus da
Bronquite Infecciosa das Galinhas carregada por adenovírus defectivo**

Giseli Aparecida Ritterbusch

Pelotas, 2015

Giseli Aparecida Ritterbusch

**Desenvolvimento e avaliação de uma vacina recombinante contra o vírus da
Bronquite Infecciosa das Galinhas carregada por adenovírus defectivo**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Veterinária da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Ciências (área de concentração: Sanidade Animal).

Orientador: Prof.^a Dra. Sílvia de Oliveira Hübner

Pelotas, 2015

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação na Publicação

R614d Ritterbusch, Giseli Aparecida

Desenvolvimento e avaliação de uma vacina recombinante contra o vírus da bronquite infecciosa das galinhas carregada por adenovírus defectivo / Giseli Aparecida Ritterbusch ; Silvia de Oliveira Hübner, orientadora ; Paulo Augusto Esteves, coorientador. — Pelotas, 2015.

60 f. : il.

Tese (Doutorado) — Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, 2015.

1. Bronquite infecciosa das galinhas. 2. Nucleoproteína. 3. Vacinas. 4. Adenovírus recombinante. 5. Células hek293. I. Hübner, Silvia de Oliveira, orient. II. Esteves, Paulo Augusto, coorient. III. Título.

CDD : 636.5

Giseli Aparecida Ritterbusch

Desenvolvimento e avaliação de uma vacina recombinante contra o vírus da
Bronquite Infecciosa das Galinhas carregada por adenovírus defectivo

Tese aprovada, como requisito parcial, para obtenção do grau de Doutor em
Ciências, Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária,
Universidade Federal de Pelotas.

Data da Defesa: 29/01/2015

Banca examinadora:

Prof.^a Dra. Silvia de Oliveira Hübner (Orientador)
Doutor em Ciências Veterinárias pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof. Dr. Gilberto D'Ávila Vargas
Doutor em Zootecnia pela Universidade Federal de Pelotas

Prof.^a Dra. Carine Dahl Corcini
Doutor em Biotecnologia pela Universidade Federal de Pelotas

Dr. Paulo Augusto Esteves
Doutor em Ciências Veterinárias pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Agradecimentos

À Universidade Federal de Pelotas pela oportunidade de realização do Curso de Pós-Graduação em Veterinária.

À minha orientadora, professora Sílvia, pela disponibilidade em orientar este trabalho, pela confiança a mim dispensada e pelo apoio durante a execução do experimento.

À Coordenação e Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos, que tornou a realização deste trabalho possível, bem como à Embrapa Suínos e Aves, por disponibilizar toda a estrutura necessária para realização dos experimentos.

Ao pesquisador, Paulo Augusto Esteves, pela presença constante durante o período de execução do projeto, pelo apoio dentro e fora do laboratório e nas revisões de cada artigo. Este trabalho não teria sido possível sem tua parceria e incansável presença!

Aos demais pesquisadores que também colaboraram e atuaram no projeto, Lara, Luizinho, Fátima, meu especial agradecimento pelo apoio e confiança.

Aos colegas do laboratório de Virologia da Embrapa Suínos e Aves, que estiveram comigo nas inúmeras tentativas de fazer este projeto sair do papel e tornar-se real, pela ajuda de cada um, sem a qual não teria concluído este trabalho.

Ao meu esposo Julio, por apoiar mais esta escolha que fiz anos atrás, e por me ajudar a enfrentar a distância, sempre com muito carinho e otimismo.

Aos meus pais, que mesmo sendo pessoas de pouca instrução, sempre me incentivaram a estudar para poder buscar melhores oportunidades e chances de uma vida melhor. Esta conquista também é de vocês!

Muito Obrigada!

Resumo

RITTERBUSCH, Giseli Aparecida. **Desenvolvimento e avaliação de uma vacina recombinante contra o Vírus da Bronquite Infecciosa das Galinhas carregada por adenovírus defectivo**. 2015. 60 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Programa de Pós - Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2015.

O vírus da bronquite infecciosa das galinhas (VBI) é o agente etiológico da Bronquite Infecciosa (BI), uma enfermidade altamente contagiosa que causa grandes perdas econômicas na avicultura. O VBI é um vírus envelopado, que possui genoma constituído de RNA fita simples, que codifica 4 proteínas estruturais, dentre elas a Nucleoproteína (N), que é produzida em grande quantidade na infecção viral e é reconhecidamente imunogênica. O controle da BI se faz com a imunização das aves através da aplicação de vacinas vivas atenuadas, seguidas de vacinação utilizando antígeno inativado, sendo o sorotipo Massachusetts o único liberado para uso no Brasil. Um dos objetivos do presente trabalho foi realizar um estudo exploratório, afim de conhecer a opinião de diferentes segmentos da avicultura sobre a situação atual da ocorrência de BI nos planteis brasileiros e os custos que ela representa. Diante disso, surge então a necessidade do desenvolvimento de vacinas alternativas e seguras para controle da BI, entre elas a utilização de vacinas vetoriais. Dessa forma, com o objetivo de desenvolver uma vacina efetiva no controle da BI, amostras variantes de VBI foram clonadas em adenovírus humano recombinante e utilizadas para transfectar células HEK293, originando adenovírus recombinantes carreadores do gene N do VBI. Estes vírus foram purificados e utilizados como vacinas recombinantes para imunização de aves SPF. Com base nos dados obtidos, observou-se que apesar das diferentes estratégias de vacinação, a BI ainda é considerada uma doença de alta prevalência que continua causando significativas perdas econômicas na produção avícola de corte e postura no Brasil. Os resultados obtidos demonstraram que a vacina recombinante não induziu uma resposta sorológica detectável pelo teste de Elisa comercial utilizado, bem como não reduziu os escores de lesões nos tecidos das aves vacinadas e desafiadas. Assim, a vacina recombinante carregada por adenovírus defectivo expressando o gene N do VBI foi construída e caracterizada, porém se mostrou ineficaz e não induziu suficiente proteção às aves experimentalmente imunizadas frente ao desafio com VBI.

Palavras-chave: bronquite infecciosa das galinhas; nucleoproteína; vacinas; adenovírus recombinante; células HEK293

Abstract

RITTERBUSCH, Giseli Aparecida. **Development and evaluation of a recombinant vaccine against avian infectious bronchitis virus carried by defective adenovirus.** 2015. 60f. Theses (Doctor degree in Sciences) - Programa de Pós - Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2015.

The infectious bronchitis virus (IBV) is the etiologic agent of Infectious bronchitis (IB), a highly contagious disease that causes great economic losses in the poultry industry. The IBV is an enveloped virus that has RNA single strand genome, encoding four structural proteins, among them Nucleoprotein (N), which is produced abundantly in viral infection and is known immunogenic. The IB control is done by immunization of birds by applying live attenuated vaccine, followed by vaccination using inactivated antigen, wherein the Massachusetts serotype is the only released for use in Brazil. One of the goals of the present work was to conduct an exploratory study in order to know the opinion of different segments of the poultry industry on the current situation of the occurrence of IB in Brazilian squads and the costs that it represents. Therefore, the development of alternative and safe vaccines to IB control is necessary, including the use of vectors. In order to develop an effective vaccine to IB control, samples from IBV field variants were cloned into recombinant human adenovirus and used to transfect HEK293 cells, resulting in recombinant adenovirus carriers of the N gene of the IBV. These recombinant viruses were purified and used as vaccines to immunization of SPF chickens. Based on the obtained data, it was observed that despite the different vaccination strategies, IB is still considered highly prevalent disease that causes significant economic losses in Brazilian poultry industry. The results here obtained showed that the recombinant vaccine does not causes detectable positive serological responses by commercial Elisa test in vaccinated chickens and does not reduce the tissues damage in vaccinated and challenged chickens. Thus, the recombinant vaccine carried by defective adenovirus expressing N gene of IBV was constructed and characterized, but seemed to be ineffective and did not induce sufficient protection to experimentally immunized chickens against IBV challenge.

Key words: avian infectious bronchitis virus; nucleocapsid protein; vaccines; recombinant adenovirus; HEK293 cells

Sumário

1	Introdução.....	7
2	Objetivos e hipótese	14
2.1	Objetivo geral	14
2.2	Objetivos específicos	14
2.3	Hipótese.....	14
3	Artigos.....	15
3.1	Artigo 1	15
3.2	Artigo 2	28
4	Considerações Finais	47
	Referências.....	48

1 Introdução

A avicultura brasileira encontra-se em posição de destaque no cenário mundial de produção de alimentos, já que o Brasil ocupa a primeira posição na exportação de carnes de frango e a terceira em termos de produção de carne e derivados de frango, além de relevante avanço na produção de ovos pelo setor avícola de postura do país. Em 2013, o Brasil produziu 12,3 milhões de toneladas de carne de frango, sendo 31,6% desta produção destinada à exportação, chegando a 142 países do mundo (UBABEF, 2014).

Para a manutenção deste nível elevado de produção, a sanidade dos planteis avícolas é um ponto fundamental, uma vez que as doenças infecciosas, de maneira geral, causam um impacto significativo em perdas econômicas no setor, relacionados à diminuição do crescimento, diminuição da qualidade e da produção de ovos, mortalidade, condenações no abate e gastos com insumos incluindo diagnóstico, vacinas e antimicrobianos a fim de eliminar infecções bacterianas intercorrentes (Montassier, 2010).

Diversas enfermidades infecciosas podem afetar as aves e dentre as doenças respiratórias de maior importância, destaca-se a Bronquite Infecciosa (BI), causada pelo vírus da bronquite infecciosa (VBI). Aves infectadas pelo VBI podem apresentar diminuição na produção bem como queda da qualidade interna e externa dos ovos, diminuição da eclodibilidade, da eficiência alimentar e do ganho de peso, aumento da mortalidade e da condenação de carcaças ao abate, além dos gastos com medicamentos para debelar infecções bacterianas secundárias (Cavanagh, 2007).

Descrita pela primeira vez nos EUA em 1931 por Schalk e Hawn, a BI é uma infecção que afeta galinhas de produção de corte e postura, extremamente contagiosa que ocorre em praticamente todas as regiões do mundo onde existe avicultura industrial (Cavanagh, 2007; Mendonça et al., 2009).

O VBI, pertencente à família *Coronaviridae*, gênero *Coronavírus*, é um vírus pleomórfico, envelopado, com genoma constituído por RNA de fita simples não segmentado, sentido positivo com cerca de 27.000 bases (Bournsnell et al, 1985). O genoma viral codifica 4 principais proteínas estruturais: Nucleocapsídeo (N), Matriz ou Membrana (M), a proteína de superfície "Spike" (S) e a proteína do envelope (E). Destas, duas destacam-se por serem reconhecidamente imunogênicas: a proteína N, que é altamente conservada, e a proteína S, constituída por duas subunidades (S1 e S2) (Siddell et al., 1983; Cavanagh, 1983a; 2007).

A proteína N é formada por 409 aminoácidos com uma massa molecular predita de cerca de 50 KDa (Macnaughton et al.,1977; Bournsnell et al., 1985). Usualmente, apresenta alta homologia entre as diferentes cepas de VBI, com cerca de 94 a 99% de identidade entre as várias estirpes, sendo uma proteína abundantemente expressa durante o processo de infecção viral (Williams et al., 1992), além de ser altamente imunogênica, capaz de induzir a produção de anticorpos específicos e de linfócitos T efetores específicos, sobretudo com ação citotóxica (Sneed et al., 1989; Seo et al., 1997). Dessa forma, tem sido amplamente utilizada no desenvolvimento de ensaios sorológicos (Ndifuna et al., 1998; Gilbertoni et al, 2010) e no desenvolvimento de vacinas (Tang et al, 2008; Guo et al, 2010; Yan et al, 2013).

Importante determinante do tropismo tecidual, a proteína S (180 KDa), é provavelmente um trímero (Wu et al., 2009) que apresenta duas funções conhecidas: 1) possibilitar que o vírus ligue-se aos receptores celulares das células-alvo e 2) viabilizar a fusão entre as membranas viral e celular visando a liberação do material genético viral no citoplasma celular (Macnaughton et al.,1977; Cavanagh, 1981; 1983b; 1988; 2007). Assim como em outros Coronavírus, a proteína S do VBI sofre clivagem proteolítica translacional ocorrendo, dessa forma, uma modificação estrutural originando duas subunidades, uma amino (S1) e outra carboxi-terminal (S2), com 92 e 84 KDa respectivamente (Cavanagh et al., 1983a).

Sugere-se que a subunidade 1 (S1), formada por cerca de 500 aminoácidos, atue diretamente no reconhecimento dos receptores celulares, e, como encontra-se exposta no envelope viral, seja um importante, ou o principal indutor da produção de anticorpos neutralizantes frente ao VBI, sendo, conseqüentemente, o principal alvo para o sistema imune do hospedeiro (Cavanagh, 1983; 2007). Acredita-se que a S1 seja importante na definição da patogenia causada pelo vírus. Importante salientar

também, que a S1 contém três regiões hipervariáveis (HVR) apresentando importantes epitopos antigênicos principalmente dentro de tais regiões. Epitopos neutralizantes e que definem as cepas virais dentro de específicos sorotipos estão associados com tais HVR (Wang e Huang, 2000).

Variações na sequência da S1 têm sido utilizadas para classificar as cepas de VBI entre diferentes sorotipos (Capua et al., 1999; Cassais et al 2003). Assim, vários novos sorotipos de VBI têm sido reconhecidos em todo o mundo, e acredita-se que tenham sido gerados naturalmente por inserções, deleções, mutações pontuais e recombinações do RNA viral (Cavanagh et al., 1992a; 1997; Gelb et al., 1991; Jia et al., 1995; Kusters et al., 1989; 1990; Wang et al., 1993). Estudos demonstram que, se uma célula estiver infectada por duas cepas de uma determinada espécie de Coronavírus, a progênie viral apresentará sequências genômicas oriundas dos vírus que infectaram a célula inicialmente, assim, assume-se que todas as cepas de campo de VBI sejam fruto da recombinação de diferentes cepas do vírus (Cavanagh et al., 1992b; 2005; Wang et al., 1994; Jia et al., 1995).

Assim como outros vírus cujo genoma é composto por RNA, o genoma do VBI apresenta alta taxa de recombinação, o que pode levar a formação de dois grandes grupos de cepas clássicas e variantes. Estudos apontam que a ocorrência de tais mutações, poderia levar a formação de cepas variantes de VBI que apresentariam genotipo diferentes da cepa vacinal, podendo ser um importante fator na ocorrência das falhas vacinais, uma vez que tais alterações possibilitariam que as cepas variantes não fossem reconhecidas pelos anticorpos induzidos pelas cepas clássicas (Cavanagh et al., 1988).

As condições para a ocorrência de recombinações entre diferentes cepas de VBI incluem o número extremamente grande de aves alojadas, sendo a maioria das aves, mantida sob grande densidade, o que facilita a difusão viral e a co-circulação de diferentes sorotipos em um mesmo plantel (Capua et al., 1999; Cavanagh et al., 1999). Estes diferentes sorotipos e variantes emergentes nos planteis de aves podem estar envolvidos com episódios de falhas vacinais, embora não seja possível descartar como importante ponto nessa questão a aplicação adequada do vazio sanitário, transporte, estocagem, bem como armazenamento, manejo, diluição e aplicação incorreta das vacinas.

Apesar de tratar-se de uma infecção aguda que afeta principalmente o trato respiratório das aves, o VBI pode causar lesões no trato reprodutivo, urinário e

digestivo, tanto em poedeiras, como em reprodutoras e aves de corte, podendo ainda replicar-se no oviduto resultando em quedas produtivas consideráveis (Cavanagh et al., 1992b; 2003). Trata-se de um vírus primariamente epiteliotrópico, replicando-se nas células epiteliais, nas células secretoras de muco e nas células epiteliais dos pulmões e dos sacos aéreos. Durante a replicação, o vírus causa estase dos cílios traqueais, tanto “*in vivo*”, quanto “*in vitro*”, e esse parâmetro tem sido utilizado para inferir sobre a severidade da infecção no trato respiratório (Mendonça et al., 2009; Trevisol e Jaenisch, 2010). A replicação do vírus nos tecidos do trato respiratório causa sinais característicos da infecção, como dificuldade respiratória, tosse e descarga nasal. Aves infectadas apresentam diminuição do desempenho, conseqüentemente perda de peso e refugagem e as infecções bacterianas secundárias causam grandes perdas econômicas por condenação de carcaças devido à aerossaculite (Cavanagh, 2007; Mendonça et al., 2009).

O período de incubação da BI pode durar até 50 dias, e as infecções podem ocorrer associadas a infecções respiratórias bacterianas e virais, o que constitui fator importante na patogenia da BI (Cavanagh, 2003). Vários patógenos respiratórios, como *Mycoplasma gallisepticum*, *Escherichia coli*, *Haemophilus paragallinarum*, vírus da doença de Newcastle e vírus da doença de Gumboro, podem interagir sinergicamente com VBI ou mesmo com vírus vacinais, aumentando, dessa forma, a severidade e duração da doença (Mendonça et al., 2009).

O controle da BI deve ser baseado principalmente na aplicação de medidas de biossegurança, rigoroso controle sanitário dos plantéis, além de diferentes estratégias de vacinação que vem sendo praticadas há cerca de 50 anos (Cavanagh, 2007; Mendonça et al., 2009; Trevisol e Jaenisch, 2010). Em tais estratégias, aves de vida longa, como poedeiras e matrizes de corte são imunizadas com vacinas vivas atenuadas, seguidas de vacinação utilizando-se antígeno inativado. Por outro lado, aves de vida curta, como frangos de corte, de um modo geral, são imunizadas somente com vacinas vivas, sendo o sorotipo Massachusetts o único liberado para uso no Brasil pelos órgãos oficiais. Mesmo assim, apesar das diferentes estratégias de vacinação, a BI é ainda considerada uma doença de alta prevalência que continua causando significativas perdas econômicas na produção avícola de corte e postura no Brasil e no mundo (Cubillos et al., 1991; Mendonça et al., 2009).

Neste contexto, surge a necessidade do desenvolvimento de novas vacinas, sendo uma delas a produção de vacinas com vírus recombinantes. A utilização de adenovírus como vetores está amplamente difundida e diversas metodologias tem sido trabalhadas para emprego destes como uma ferramenta de expressão de proteínas heterólogas, obtendo grande sucesso na indução de imunidade em modelos experimentais (Sullivan et al., 2000; 2003; Mooij & Heeney, 2001; Bruna-Romero et al., 2001; Gilbert et al., 2002).

O genoma dos adenovírus é constituído de uma molécula de DNA fita dupla linear com cerca de 36 Kb e entre 60 e 90 nanômetros de diâmetro (Imler, 1995; Roy-Chowdhury et al, 2002; Volpers et al, 2004). A transcrição do genoma viral é dividida em dois grupos de genes e ocorre em duas fases, que são determinadas em relação à replicação do DNA. Antes da replicação, tem-se a fase inicial, formada por genes que codificam proteínas para internalização e replicação viral (chamados *early genes* ou E). Na fase tardia, depois da replicação do DNA viral, são transcritos os genes codificadores de proteínas estruturais (*late genes* ou L). Dentre estes genes, cabe destacar a região E1, responsável pela replicação e transcrição viral, que, por motivos de segurança, encontra-se deletada nos vetores adenovirais. Além disso, o gene E3 é também frequentemente deletado visando aumentar a capacidade de clonagem no vetor (Bett et al, 1994).

Os adenovírus apresentam uma série de vantagens visando o desenvolvimento de vacinas, uma vez que a biologia e o genoma dos mesmos já foram amplamente estudados. Além disso, tais recombinantes apresentam grande estabilidade, habilidade de replicar-se em altos títulos, fácil manipulação e purificação e capacidade de infectar um amplo espectro de tipos celulares, não só de mamíferos, independentemente do ciclo celular, podendo incorporar fragmentos de até 2 kb de sequência de DNA adicional, sem perder sua estabilidade e viabilidade (Graham, 2000; Babiuk & Tikoo, 2000; Souza et al., 2005).

Diversos estudos demonstraram que os vetores de adenovírus são altamente eficientes para a transferência de genes, induzindo resposta imune humoral e celular a antígenos codificados pelos genes nele inseridos (Wu et al, 2003; Ferreira et al., 2005; Vemula et al., 2010; Zenham et al., 2011; Vemula et al., 2013). Dentre eles, destaca-se o adenovírus humano tipo 5 (Ad5), que possui baixa patogenicidade tanto em humanos como em animais (Russel, 2000).

O vetor pAd5 utilizado no presente estudo apresenta deleções nas regiões E1 e E3 do Ad5, onde os genes são clonados substituindo a região E1, que é responsável pela replicação (Moraes et al, 2001). Com isso os vírus recombinantes não se replicam em células normais, tornando-se dependentes de células que sejam complementares a eles, ou seja, que expressem essa região constitutivamente, como as células HEK293 (*Human Embryo Kidney*). Esta linhagem é composta de células de rim embrionário humano, as quais foram transformadas com fragmentos de DNA derivados da região E1 do genoma de Ad5, expressam fatores de transcrição E1 e são permissivas a replicação de adenovírus de primeira geração (Graham et al., 1977, Graham & Prevec, 1992; Graham, 2000; Shaw et al., 2002). Este sistema permite a expressão dos genes de interesse nele inseridos controlados pelo promotor do citomegalovírus (CMV), reconhecido pela maquinaria de transcrição das células, sendo dessa forma, obtidas grandes quantidades de proteína (Mayr et al., 1999).

Um estudo recente utilizando o Ad5 demonstrou a eficácia protetora de uma vacina recombinante expressando o gene S1 do VBI, em que as aves vacinadas desenvolveram altos títulos de anticorpos contra o VBI no soro, além de aumento nos níveis de IL-4 no baço das aves vacinadas, indicando que a vacina estimulou também a resposta imune celular (Zenham 2010). Em outro estudo, Toro et al (2007), também demonstraram a eficácia de uma vacina usando Ad5 defectivo como vetor, carreando o gene da Hemaglutinina do vírus da Influenza aviária, induzindo imunidade protetora nas aves vacinadas.

A utilização de adenovírus recombinantes apresenta-se como uma alternativa segura de vacina para controle da BI, pois a vacina originada da combinação com segmentos do genoma do VBI não teria capacidade de multiplicação, uma vez que tais vírus recombinantes possuem a capacidade de infectar as células e expressar os genes inseridos, sem que haja a formação de novas partículas virais completas ou infectantes. Além disso, a utilização de um isolado brasileiro na confecção de tal vacina evitaria a introdução de uma nova cepa de VBI vinda de fora do Brasil, o que, como demonstrado em alguns relatos, acaba por aumentar a diversidade de cepas que ocorrem a campo (Wang et al, 1994; Jia et al, 1995; Jackwood, 2012; Toro et al, 2012).

Diante do exposto, o presente estudo tem por objetivo realizar um estudo exploratório a fim de conhecer a opinião de diferentes segmentos da avicultura sobre

a situação atual da ocorrência de BI nos planteis brasileiros e os custos que ela representa. Além disso, o objetivo principal do estudo foi a construção de adenovírus recombinantes carreando o gene N do VBI a partir de amostras variantes isoladas no Brasil e sua utilização como vacinas recombinantes para imunização de aves frente ao desafio com VBI, bem como avaliação de sua imunogenicidade.

2 Objetivos e hipótese

2.1 Objetivo geral

Construir uma vacina baseada em sistema de adenovírus recombinante contendo a sequência codificadora da Nucleoproteína do VBI e avaliar sua capacidade imunoprotetora.

2.2 Objetivos específicos

- realizar estudo exploratório por meio de questionário sobre a situação da BI no Brasil;
- amplificar e clonar o fragmento da Nucleoproteína do VBI;
- produzir vírus recombinantes;
- detectar a expressão da Nucleoproteína do VBI pelo adenovírus;
- purificar e titular o adenovírus recombinante;
- imunizar aves SPF com o adenovírus recombinante;
- avaliar a capacidade imunoprotetora da vacina através de ensaios de desafio com VBI em aves SPF

2.3 Hipótese

É possível desenvolver uma vacina viva recombinante, baseada em adenovírus carreando o gene N do VBI que garanta proteção adequada às aves frente ao desafio de campo.

3 Artigos

3.1 Artigo 1

**Percepção de diferentes segmentos da avicultura brasileira sobre
apresentação, controle e impactos econômicos da Bronquite Infecciosa das
Galinhas**

Giseli Aparecida Ritterbusch; Gilberto D'Ávila Vargas; Silvia de Oliveira Hubner

Submetido ao periódico Pesquisa Agropecuária Brasileira

Percepção de diferentes segmentos da avicultura brasileira sobre apresentação, controle e impactos econômicos da Bronquite Infecciosa das Galinhas

Giseli Aparecida Ritterbusch⁽¹⁾; Gilberto D'Ávila Vargas⁽¹⁾; Silvia de Oliveira Hubner⁽¹⁾

⁽¹⁾ Universidade Federal de Pelotas, Programa de Pós-graduação em Veterinária, Laboratório de Virologia e Imunologia, Caixa Postal 354, Campus Universitário, CEP 96010-900, Pelotas/RS, Brasil. E-mail: giseliritter@yahoo.com.br, silviaohubner@gmail.com, gdavilavargas@gmail.com

Resumo – A bronquite infecciosa das galinhas (BI) é uma doença amplamente disseminada entre as criações avícolas do mundo. A ocorrência da BI em plantéis vacinados tem sido tema frequente em encontros técnicos do setor avícola brasileiro. O objetivo do presente trabalho foi buscar informações, mediante o preenchimento de um questionário, junto a relevantes empresas compreendendo três importantes setores que compõe a cadeia avícola nacional: produção e processamento de aves, diagnóstico laboratorial, e produção de vacinas, sobre perdas econômicas, ocorrências de falhas vacinais, necessidade da utilização de novos vírus vacinais no território nacional, medidas de biosseguridade e diagnóstico e segmentos da cadeia produtiva mais afetados pela enfermidade. De acordo com os dados obtidos, foi possível verificar que: *i*) a BI continua sendo importante problema sanitário para os planteis avícolas do Brasil; *ii*) a doença clínica é diagnosticada tanto em frangos de corte, quanto em matrizes e poedeiras; *iii*) a forma respiratória da doença é a que traz maior impacto, acarretando grandes prejuízos econômicos para o segmento e para o país; *iv*) deve ser realizado um rigoroso estudo epidemiológico para comprovar a necessidade de ampliar o espectro de proteção aos desafios a campo para a eventual introdução de uma nova cepa vacinal no país.

Termos para indexação: *Gallus gallus*, avicultura brasileira, vacinação, prejuízos econômicos.

Perception of different segments of the Brazilian poultry industry on presentation, control and economic impacts of Avian Infectious Bronchitis

Abstract – The infectious bronchitis (IB) is a widespread disease in poultry industry worldwide. Cases of IB in previously vaccinated poultry are a frequent theme in technical meetings of the Brazilian poultry industry. The aim of this work was to seek information from the relevant companies comprising three important sectors of national poultry industry: production and processing of poultry, laboratory diagnosis and vaccine production, by completing a questionnaire, involving several issues about economic losses attributed to BI, occurrence of possible vaccine failures, biosafety, diagnosis, and which segments of the production chain are most affected by this disease. According to the obtained data, it was found that: *i*) IB remains a major health problem in herds; *ii*) clinical disease is observed so much in broilers as for breeders and laying hens; *iii*) the respiratory form of the disease results in greater impact, causing significant economic losses for the segment and the country; *iv*) a rigorous epidemiological study should be performed to prove the need to broaden the spectrum of protection to challenges in the field to eventual introduction of a new vaccine formulation in the country.

Index terms: *Gallus gallus*, Brazilian poultry, vaccines, economic losses.

Introdução

A avicultura brasileira encontra-se em posição de destaque no cenário mundial de produção de alimentos, uma vez que o Brasil ocupa a primeira posição na exportação de carnes de frango e a terceira posição na produção de carne e derivados de frango, além do relevante avanço na produção de ovos apresentado nos últimos anos. Em 2013, o Brasil produziu 12,3 milhões de toneladas de carne de frango, sendo 31,6% deste total destinado à exportação, chegando a mais de 142 países do mundo, representando quase 1,5% do PIB (Produto Interno Bruto) do país no período (UBABEF, 2014).

Ainda que fatores como qualidade e preço contribuam para aperfeiçoar e manter o elevado padrão da produtividade no setor, a sanidade dos plantéis avícolas no Brasil é um ponto fundamental, uma vez que as doenças infecciosas, de uma maneira geral, causam um impacto significativo, principalmente devido às perdas econômicas geradas. Dentre as doenças respiratórias de maior importância, destaca-se a Bronquite Infecciosa das galinhas (BI), causada pelo vírus da bronquite infecciosa (VBI). A BI afeta galinhas de produção, de corte e postura, é extremamente contagiosa e ocorre em praticamente todas as regiões do mundo onde exista avicultura industrial (Cavanagh, 2007; Mendonça et al., 2009).

Apesar de tratar-se de uma infecção aguda que afeta principalmente o trato respiratório, o VBI pode causar lesões no trato reprodutivo, urinário e digestivo, tanto em poedeiras, como em reprodutoras e aves de corte, podendo ainda replicar-se no oviduto, resultando em quedas produtivas consideráveis (Cavanagh et al., 1992; 2003). Aves jovens podem apresentar problemas respiratórios graves, com diminuição da eficiência alimentar e ganho de peso, aumento da mortalidade e da condenação de carcaças, além dos gastos com medicamentos para debelar infecções bacterianas secundárias. As galinhas podem apresentar diminuição na produção bem como queda da qualidade interna e externa dos ovos e diminuição da eclodibilidade (Cavanagh, 2007).

O controle da BI se faz, principalmente, através da imunização das aves, bem como através de medidas de biossegurança. No Brasil, aves de vida longa, como poedeiras e matrizes de corte são imunizadas com vacinas vivas atenuadas, seguidas de vacinação utilizando-se antígeno inativado com adjuvante. Frangos de corte são imunizados somente com vacinas vivas, sendo o sorotipo Massachusetts o único liberado para uso pelos órgãos oficiais (Mendonça et al., 2009).

O VBI pertence à família *Coronaviridae*, é pleomórfico, envelopado, com genoma caracterizado por apresentar regiões com alta taxa de recombinação sendo

constituído por RNA de fita simples não segmentado (Bournnell et al, 1985). O genoma viral codifica 4 principais proteínas estruturais: Nucleocapsídeo (N), Matriz ou Membrana (M), proteína de superfície "Spike" (S) e proteína do envelope (E). Destas, duas destacam-se por serem reconhecidamente imunogênicas: a proteína N, altamente conservada, e a proteína S, variável e constituída por duas subunidades (S1 e S2) (Siddell et al., 1983; Cavanagh, 1983; Cavanagh, 2007). Análises realizadas tendo como alvo a região hipervariável da S1, tornam possível separar as cepas do IBV em dois grandes grupos, um composto por cepas consideradas clássicas e o outro por cepas consideradas variantes (Cavanagh, 1988, Lee et al, 2003). Durante os últimos anos, muitos estudos desse tipo foram gerados e utilizados para reforçar a ideia de que diferenças genéticas apresentadas pelas amostras variantes do VBI poderiam causar alterações tais na S1 que resultariam na falta de reconhecimento por parte do sistema imune de aves previamente imunizadas com vacinas derivadas de amostras consideradas clássicas. Nesse sentido, uma vacina elaborada tendo como base um vírus do grupo clássico, pode não conferir proteção adequada frente a desafios por amostras variantes (Di Fábio et al, 2000; Villarreal et al., 2007; Chacón et al, 2011; Fernando et al, 2013). Embora isto possa ser um fator relevante na busca pela causa da ocorrência de falhas vacinais, todo o processo de vacinação em si, desde a fabricação, transporte, armazenagem, diluição e aplicação da vacina nas aves deve ser considerado. O VBI é extremamente sensível à variações de temperatura, resultando em rápida declínio em seus títulos à medida em que o vírus é exposto à temperatura ambiente (Precausta et al., 1980; Adzharet al, 1997; Cavanagh et al., 1997; Ladman et al, 2006). Dessa forma, uma questão bastante pontual envolvendo uma possível falha vacinal devido a diferenças genômicas e antigênicas nas cepas de VBI (clássicas X variantes) pode tornar-se uma questão muito mais complexa, onde devem ser levadas em conta, também, as demais etapas que fazem parte do processo de imunização.

O objetivo do presente trabalho foi realizar um estudo exploratório sobre a situação atual da ocorrência de BI nos plantéis avícolas brasileiros. O estudo buscou possibilitar uma melhor compreensão a respeito dos custos que esta doença representa ao setor, bem como sobre o envolvimento do VBI nos casos clínicos que vem ocorrendo no campo, mesmo em planteis previamente imunizados para esta enfermidade, além de relatar as percepções de profissionais que atuam em importantes empresas do setor avícola brasileiro sobre a possibilidade da introdução de uma nova vacina contra o VBI.

Material e Métodos

A fim de compreender a situação da ocorrência da BI no Brasil, bem como sobre a necessidade da utilização de novos vírus vacinais no território nacional, foram elaboradas diversas questões as quais foram aplicadas a profissionais ligados à avicultura (Figura 1). Participaram do estudo membros de agroindústrias de carne de frango, técnicos da indústria de vacinas e de laboratórios de diagnóstico, além de profissionais ligados à consultoria avícola.

Resultados e Discussão

As respostas obtidas representam as percepções de profissionais que atuam em algumas das maiores empresas do setor avícola brasileiro.

Dentre as agroindústrias, houve unanimidade nas respostas quanto à relevância dos prejuízos atribuídos ao VBI (embora as condenações totais representem um valor percentual pequeno - menos de 0,01% - as condenações parciais são significativas). Estes problemas foram relatados tanto em frangos de corte como reprodutoras e poedeiras comerciais, sendo que não houve diferenças importantes sobre a manifestação da doença nas diferentes regiões do país onde há avicultura intensiva.

Quando foi abordado sobre o segmento da cadeia produtiva mais afetado pela doença, 33% relataram que o vírus afeta de forma generalizada tanto frangos e matrizes de corte assim como aves de postura, enquanto que 66% identificaram maiores problemas no segmento de frangos de corte. Por outro lado, 100% dos respondentes concordaram que a apresentação clínica mais comum relacionada à infecção pelo VBI envolve problemas respiratórios.

Foi relatado, também, que nos últimos anos, as perdas econômicas na avicultura relacionadas a este vírus vêm aumentando significativamente. A infecção está associada a um aumento do custo de produção devido às perdas ocasionadas pelo impacto da infecção diretamente no trato reprodutivo, respiratório e/ou de outros órgãos que afetam as aves. O problema é significativo no plantel de frangos de corte, devido às perdas no desempenho e redução do aproveitamento das carcaças no abatedouro, resultante das condenações causadas pela infecção. O aumento dos custos também foi atribuído ao uso de antibióticos e programas de vacinação diferenciados com o objetivo de controlar os casos de campo e, também, em consequência do número elevado de atendimentos realizados por médicos veterinários a campo. Foi destacado ainda que as perdas no campo são variáveis, dependentes da idade das aves no abate e do grau de lesão, sendo que aves mais jovens, em geral, sofrem menos perdas, pois, permanecem menos tempo

a campo e, aparentemente, na maior parte desse tempo estão protegidas, mesmo que de forma parcial, pelos anticorpos maternos e pelas vacinas realizadas no incubatório. As perdas mais significativas se observam em aves abatidas com idade mais avançada, possivelmente por permanecerem mais tempo suscetíveis aos desafios.

Quanto aos prejuízos causados pela enfermidade, as respostas obtidas indicam o VBI envolvido em casos de condenações parciais de carcaças de frango por aerossaculite nos abatedouros, porém os critérios de avaliação para estas condenações variam de acordo com cada SIF (Serviço de Inspeção Federal). Em uma planta frigorífica que abate cerca de 3 milhões de frangos por mês, por exemplo, houve 0,74% de condenações parciais devido à aerossaculite, representando mais de 20 mil carcaças no período.

Uma abordagem importante confirmada nas respostas obtidas é que as medidas de biossegurança aplicadas de forma adequada estão diretamente associadas à prevenção ou diminuição da ocorrência da enfermidade. Segundo os respondentes, o intervalo de tempo adequado de vazão sanitário, bem como uma adequada densidade nos galpões, tem influência direta na pressão de infecção sobre os lotes.

Sobre a realização de diagnóstico confirmatório, 100% das agroindústrias que responderam as perguntas afirmaram que realizam algum tipo de análise laboratorial sempre que é identificada uma situação clínica suspeita. Além do diagnóstico, as monitorias sanitárias estabelecidas também facilitam a identificação e confirmação do problema.

De acordo com as respostas recebidas, a ocorrência de BI é identificada principalmente por meio dos relatos dos técnicos da agroindústria que, geralmente, baseiam-se em achados clínicos suspeitos, tais como sinais respiratórios, lesões renais e elevada mortalidade, com confirmação da identificação do agente através de exames laboratoriais. Estes relatos envolvem tanto frangos de corte como reprodutoras e poedeiras comerciais em diferentes regiões do Brasil.

Quanto às técnicas utilizadas para o diagnóstico da infecção pelo VBI, 100% dos laboratórios que responderam as questões relataram que utilizam as técnicas de PCR e sorologia para confirmação da presença do agente ou de anticorpos contra o vírus. Neste sentido, as técnicas moleculares mostraram-se incorporadas à rotina laboratorial das indústrias, como ferramenta rápida e específica para auxiliar na detecção de agentes patogênicos. Assim sendo, o isolamento viral para confirmar as suspeitas clínicas pouco é utilizado, e, mesmo técnicas menos exigentes em termos de instalações e insumos,

como as análises microscópicas, também não foram relatadas. Cabe aqui ressaltar que, embora a técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) seja um método de diagnóstico amplamente disseminado, sendo uma prova de execução sensível e, via-de-regra, de fácil execução, ela também possui limitações. Uma vez que os “*primers*” ou iniciadores são, na maioria dos casos, específicos para um determinado agente, a menos que a PCR tenha sido padronizada para detectar mais de um agente simultaneamente, cada reação de PCR é “primer-dependente” e “primer-específica” detectando somente a parte do genoma (e conseqüentemente do agente) na qual os primers foram desenvolvidos. Fica evidente então a necessidade da realização de testes que avaliem a presença de outros agentes que poderiam estar envolvidos na ocorrência de tal quadro clínico e que não estejam sendo pesquisados nem detectados pela metodologia utilizada atualmente.

Sobre a introdução de um novo sorotipo para uma nova formulação de vacina no país, os participantes relataram ser favoráveis somente após a realização de um rigoroso estudo epidemiológico que comprove a real necessidade de ampliar o espectro de proteção frente ao desafio a campo. Para isso, faz-se necessário um criterioso levantamento epidemiológico molecular do VBI nas diversas regiões do Brasil, seguido de avaliação de patogenicidade destas variantes e de avaliações de protectotipos (testes de eficácia e proteção cruzada) das estirpes variantes mais prevalentes que causam prejuízo econômico nas agroindústrias brasileiras. Com isso, de acordo com as respostas obtidas, se comprovada a real necessidade da introdução de uma nova vacina contra o VBI, o ideal seria que ela fosse formulada com alguma cepa de VBI já existente no território nacional, visando aumentar o espectro de proteção contra as cepas variantes e, de alguma forma, minimizar possíveis mutações e geração de novas variantes ainda mais patogênicas no campo. Neste contexto, trabalhos prévios já relataram que as variantes brasileiras são genomicamente (Villarrealet al, 2007; Chacón et al, 2011) ou sorologicamente (Di Fábio, 2000) diferentes de outros VBI conhecidos, como as estirpes europeias e americanas.

Da mesma forma, análises filogenéticas da região S1 de cepas de VBI isoladas no Brasil têm mostrado que estas são, em sua maioria, classificadas como variantes e que, de acordo com dados disponíveis até o presente momento, tais vírus tendem a formar um grupo distinto, relativamente próximo às cepas isoladas de outros países da América do Sul, especialmente da Argentina, estando estas então, mais distante das

cepas isoladas nos demais continentes (Villarreal et al, 2007; Chacón et al, 2011; Fraga et al, 2013).

Assim, a introdução de vacinas com vírus que não são encontrados no território nacional não seria aconselhável, pois, tal introdução pode fazer com que a situação fique ainda mais difícil de controlar conforme descrito anteriormente (De Witt et al, 2011).

No Brasil, poucos estudos avaliaram a eficácia da vacina sorotipo Massachusetts para variantes do VBI. Dentre estes, resultados de patotipagem (avaliação de tropismo tecidual das variantes) e protectotipagem (avaliação de proteção cruzada frente ao sorotipo Massachusetts) apresentados em fóruns nacionais mostraram que as cepas variantes do VBI avaliadas seguindo os critérios internacionais para testes de eficácia de vacinas vivas (OIE, 2013), apresentaram tropismo respiratório, e que uma ou duas doses de vacina sorotipo Massachusetts conferiram proteção satisfatória (Trevisol & Okino, 2012, Trevisol, 2013). Por outro lado, um estudo realizado com uma cepa variante do VBI apresentando tropismo renal, obteve proteção parcial no teste de protectotipagem, demonstrando pela primeira vez no Brasil a presença de um protectotipo diferente da Massachusetts (Fernando et al, 2013).

Com relação ao genótipo das amostras de VBI presentes no Brasil, um estudo realizado recentemente por Balestrin et al (2014) mostrou que em três regiões brasileiras avaliadas houve uma frequência muito maior de estirpes variantes circulando em granjas de frangos de corte e matrizes, quando comparada à presença da estirpe Massachusetts. No mesmo estudo, foi observado que houve maior incidência de amostras positivas para o VBI no trato digestivo das aves, evidenciando a importância da análise de tecidos de diferentes sistemas que podem ser afetados para obtenção de um diagnóstico conclusivo sobre a presença do vírus.

Finalmente, considerando a importância sanitária bem como as elevadas perdas econômicas atribuídas a ocorrência da BI no território nacional, o presente trabalho buscou fazer um levantamento baseado em informações relevantes a esta questão para que seja possível contribuir na busca de um melhor entendimento a cerca da ocorrência e possíveis formas de controle de tal enfermidade.

Conclusões

1. O presente estudo confirma, com base nas respostas obtidas, que, apesar da existência de imunização e medidas de biossegurança, a BI continua sendo um problema sanitário importante nos planteis avícolas brasileiros.

2. A enfermidade afeta tanto frangos de corte quanto matrizes e poedeiras, principalmente na forma respiratória, acarretando grandes prejuízos econômicos ao segmento avícola.

3. A utilização de técnicas moleculares é a mais utilizada entre os entrevistados para o diagnóstico do VBI.

4. O processo de imunização das aves deve ser realizado com muito cuidado e controle, atentando sempre para que seja mantido o título correto da vacina utilizada e que esta seja administrada adequadamente e no menor tempo possível.

4. Sobre questões envolvendo a ocorrência de possíveis falhas vacinais, os entrevistados salientaram que se for verificada a necessidade da utilização de uma nova formulação de vacina visando aumentar o espectro de proteção das aves frente a infecções causadas por cepas de IBV à campo, devem ser realizados estudos moleculares, de patotipagem e protectotipagem das amostras candidatas a fazer parte da nova vacina a ser utilizada no Brasil, respeitando sempre as legislações vigentes do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA).

Agradecimentos

Os autores agradecem a disponibilidade dos representantes das empresas em participar do estudo.

Referências Bibliográficas

ADZHAR, A.; GOUGH, R.E.; HAYDON, D.; SHAW, K.; BRITTON, P.; CAVANAGH, D. Molecular analysis of the 793/B serotype of infectious bronchitis virus in Great Britain. **Avian Pathology**, v.26, p.625-640, 1997.

BALESTRIN, E.; FRAGA, A.P.; IKUTA, N.; CANAL, C.W.; FONSECA, A.S.K.; LUNGE, V.R. Infectious bronchitis virus in different avian physiological systems - A field study in Brazilian poultry flocks. **Poultry Science**, v.93, p.1922-1929, 2014.

BOURSNELL, M.E.G.; BINNS, M.M.; BROWN, T.D.K. Sequencing of Coronavirus IBV Genomic RNA: Three Open Reading Frames in the 5' 'Unique' Region of mRNA. **D. Journal of General Virology**, v.66, p.2253-2258, 1985.

CAVANAGH, D. Coronavirus IBV: further evidence that the surface projections are associated with two glycopolypeptides. **Journal of General Virology**, v.64, p.1787-1791, 1983.

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

CAVANAGH, D.; DAVIS, P.J.; COOK, J.K.A. Infectious bronchitis virus: evidence for recombination within the Massachusetts serotype, **Avian Pathology**, v.21, p.401–408, 1992.

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

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

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

CHACON, J.L.; RODRIGUES, J.N.; ASSAYAG JUNIOR, M.S.; PELOSO, C.; PEDROSO, A.C.; FERREIRA, A.J. Epidemiological survey and molecular characterization of avian infectious bronchitis virus in Brazil between 2003 and 2009. **Avian Pathology**, v.40, p.153-162, 2011.

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

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

FERNANDO, F.S.; MONTASSIER, M.F.S.; SILVA, K.R.; OKINO, C.H.; OLIVEIRA, E.S.; FERNANDES, C.C.; BANDARRA, M.B.; GOLÇALVES, M.C.M.; BORZI, M.M.; SANTOS, R.M.; VASCONCELOS, R.O.; ALESSI, A.C.; MONTASSIER, H.J. 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**, v.12, p.639-646, 2013.

FRAGA, A.P.; BALESTRIN, E.; IKUTA, N.; FONSECA, A.S.K.; SPILKI, F.R.; CANAL, C.W.; LUNGE, V.R. Emergence of a new genotype of avian infectious bronchitis virus in Brazil. **Avian Diseases**, v.57, p.225–232, 2013.

- LADMAN, B.S.; LOUPOS, A.B.; GELB, J.Jr. Infectious bronchitis virus S1 gene sequence comparison is a better predictor of challenge of immunity in chickens than serotyping by virus neutralization. **Avian Pathology**, v.35, p.127-133, 2006.
- LEE, C.W.; HILT, D.A.; JACKWOOD, M.W. Typing of field isolates of infectious bronchitis virus based on the sequence of the hypervariable region in the S1 gene. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.15, p.344-348, 2003.
- MENDONÇA, J.F.P.; MARTINS, N.R.S.; CARVALHO, L.B.; DE SÁ, M.E.P.; DE MELO, C.B. Bronquite infecciosa das galinhas: conhecimentos atuais, cepas e vacinas no Brasil. **Ciência Rural**, v.39, p.2559-2566, 2009.
- OIE. Avian infectious bronchitis. Cap. 2.3.2. In: **Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals**. 2014.p.1-15
- PRECAUSTA, P.M.; SIMATOS, D.; LE PEMP, M.; DEVAUX, B.; KATO, F. Influence of residual moisture and sealing atmosphere on viability of two freeze-dried viral vaccines. **Journal of Clinical Microbiology**, v.12, p.483-489, 1980.
- TREVISOL, I.M.; OKINO, C. H. Proteção vacinal contra bronquite infecciosa das galinhas - ensaios *in vivo*. In: III CONGRESSO SUL BRASILEIRO DE AVICULTURA, SUINOCULTURA E LATICÍNIOS, 2012, Bento Gonçalves,RS. **Anais**. Avisulat: CD Room, 2012. p. 1-9.
- TREVISOL, I.M. Bronquite Infecciosa. In: SIAV - Salão Internacional da Avicultura e 23º Congresso Brasileiro de Avicultura, 2013, São Paulo, SP. Anais: SIAV - Salão Internacional da Avicultura e 23º Congresso Brasileiro de Avicultura. 2013. p. 1-5.
- SCHALK, A.F.; HAWN, M.C. An apparently new respiratory disease of baby chicks. **Journal of the American Veterinary Medicine Association**, v.78, p.413-416, 1931.
- SIDDELL, S. Coronavirus JHM: coding assignments of subgenomic mRNAs. **Journal of General Virology**, v.64, p.113-125, 1983.
- UBABEF, 2014. Relatório anual da união brasileira de avicultura. Disponível em <http://www.ubabef.com.br/publicacoes> Acessado em 08/12/2014.
- VILLARREAL, L.Y.B.; BRANDÃO, P.E.; CHACÓN, J.L.; SAIDENBERG, A.B.S.; ASSAYAG, M.S.; JONES, R.C.; FERREIRA, A.J.P. Molecular characterization of infectious Bronchitis Virus strains isolated from the enteric contents of Brazilian laying hens and broilers. **Avian Diseases**, v.51, p.974-978, 2007.

	Questões	Alvo
1	<ul style="list-style-type: none"> - É possível atribuir um valor ao prejuízo causado pelo VBI? - Quando há suspeita de infecção por VBI nos lotes, é realizado um diagnóstico confirmatório? - Existe um percentual de perdas no abate relacionadas à infecção pelo VBI? - As medidas de biosseguridade são corretamente aplicadas nas granjas? 	<p>Agroindústria processadora/ Consultoria avícola</p>
2	<ul style="list-style-type: none"> - Como a indústria de vacinas percebe a ocorrência de infecções pelo VBI no campo? - Há algum tempo muito tem sido discutido a respeito da ocorrência de falhas vacinais frente às amostras de campo de VBI. O que você acha disso? Você é a favor da introdução de uma nova vacina contra o VBI? - Na sua opinião quais deveriam ser os critérios a serem atendidos para a formulação dessa nova vacina (caso ache que seja necessária a introdução de uma nova vacina contra o VBI)? 	<p>Indústria de vacinas</p>
3	<ul style="list-style-type: none"> - Quais as técnicas utilizadas para diagnóstico de BI em sua empresa? - É possível definir em qual segmento encontramos maior ocorrência de BI? - É possível estimar se a maioria dos problemas clínicos ligados a ocorrência da BI são: () respiratórios () renais () reprodutivos 	<p>Laboratório de diagnóstico</p>

Figura 1. Questionário aplicado às empresas participantes do estudo.

3.2 Artigo 2

Construction and characterization of a recombinant adenovirus vaccine expressing the Nucleocapsid gene of avian infectious bronchitis virus

Giseli Aparecida Ritterbusch; Paulo Augusto Esteves; Iara Maria Trevisol; Cintia Hiromi Okino; Fátima Regina Ferreira Jaenisch; Marcos Antônio Zanella Morés; Luizinho Caron; Alessandra D'Avila da Silva, Silvia de Oliveira Hübner

Artigo a ser submetido ao periódico Journal of Virological Methods

Construction and characterization of a recombinant adenovirus vaccine expressing the Nucleocapsid gene of avian infectious bronchitis virus

Giseli Aparecida Ritterbusch^{1*}; Paulo Augusto Esteves²; Iara Maria Trevisol²; Cintia Hiromi Okino²; Fátima Regina Ferreira Jaenisch²; Marcos Antônio Zanella Morés²; Luizinho Caron²; Alessandra D'Avila da Silva³, Silvia de Oliveira Hübner¹

¹Laboratory of Virology and Immunology, Department of Preventive Veterinary, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas-RS, Brasil;

²Embrapa Swine and Poultry (Embrapa), Brazilian Agricultural Research Corporation Concórdia - SC – Brasil

³Post-Doc Fellow, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Brasília, DF, Brasil.

*Corresponding author:

Laboratório de Virologia e Imunologia, Universidade Federal de Pelotas, Campus universitário. Caixa Postal 354, Pelotas, RS, 96010-900, Brasil.

e-mail: giseliritter@yahoo.com.br

ABSTRACT

Infectious bronchitis (IB), caused by infectious bronchitis virus (IBV) is a highly contagious chicken disease, which causes massive economic losses associated with production inefficiencies and mortality in poultry industry worldwide. Vaccination is the most effective way of preventing the infection and some progress has been made in designing novel and efficient candidate vaccines to control IBV infection. In this report, the recombinant adenovirus expressing N gene of IBV was constructed and characterized. The recombinant was constructed by cloning N/IBV gene into human adenovirus type 5 and transfected into the HEK-293 cells to generate Ad5_N. Then, the immunological efficacy and protection against IBV challenge were assessed in specific pathogen free (SPF) chickens. The results showed that the chickens vaccinated with Ad5_N did not developed anti-IBV antibodies detected by a commercial Elisa test and the recombinant vaccine did not confer adequate protection in chickens after challenge with virulent IBV-M41. Therefore, the construction of non-replicating human adenovirus vector encoding N gene of IBV seemed to be ineffective and did not induce sufficient protection in vaccinated chickens.

Key words: Infectious bronchitis virus, nucleocapsid protein, adenovirus vector, immune responses.

1. INTRODUCTION

The infectious bronchitis (IB) is a highly contagious disease of poultry caused by infectious bronchitis virus (IBV), a member of *Coronaviridae* family, which causes significant economic impact on the worldwide poultry industry. Infected birds present respiratory signs, reduced egg production and irregular shell formation, losses in feed conversion and drop in weight gain, increased mortality and carcass condemnation at slaughter (Cavanagh, 2007).

IBV is an enveloped virus which has a genome of single stranded RNA positive-sense of 27.6 kb (Boursnell et al, 1987), encoding four major structural proteins, known as spike (S), nucleocapsid (N), membrane (M) and envelope (E) (Cavanagh, 1981; Lai & Cavanagh, 1997; Siddel, et al, 1983; Stern & Sefton, 1982). The nucleocapsid proteins for various RNA viruses have been used as coating antigens in diagnostic ELISA (Linde et al., 1987; Reid-Sanden et al., 1990; Hummel et al., 1992; Ahmad et al., 1993; Errington et al., 1995). The IBV N, a major structural protein, is produced abundantly in infection. It is highly conserved, sharing 94–99% identity among various strains and highly immunogenic, readily inducing antibody, as well as cytotoxic T lymphocyte immunity in chickens (Sneed et al., 1989; Williams et al., 1992; Seo et al., 1997), and therefore is widely used for developing serological assays (Ndifuna et al, 1998).

Vaccination against IBV has been practiced using attenuated live and inactivated oil-emulsion vaccines, although generally effective, may have shown some disadvantages. Attenuated vaccines can induce both humoral and cellular immune responses, but with a possibility of spreading the live vaccine virus (Wareing and Tannock, 2001; Bijlenga et al., 2004; Mckinley et al., 2008), besides there is a risk of insufficient attenuation and/or genetic instability (Cook et al., 1986). The inactivated vaccines, in the other hand, can induce high titers of antibody but usually with low level of cytotoxic T lymphocyte (CTL) responses (Cavanagh et al, 1984; Yang et al., 2004; Ariane et al., 2009), lack of long-term immunity, elevated cost of the vaccine, local adverse effects and the individual administration are negative conditions which need to be considered prior the vaccination.

As the number of chickens being raised increases, IB outbreaks may occur despite of the vaccine utilization, and, as consequence, a significant number of IBV field variants have been identified circulating in the Brazilian commercial poultry flocks in last years (Silva, 2010; Chacon et al, 2011; Fraga et al, 2013; Balestrin et al, 2014). Therefore, the developing of a vaccine in order to help in the control of this disease with higher efficacy and fewer side or undesirable effects is highly recommended. Studies using experimental recombinant vaccines have been reported to protect chickens efficiently against IBV challenge, including vaccines that use adenovirus as a vector (Johnson et al, 2003; Zeshan et al, 2010; 2011). Adenoviruses are ideal vectors for the delivery of antigens to induce mucosal and cell mediated immunity (Russell, 2000) and has some advantages over DNA vaccines based on its relatively safe profile, the capacity to be grown to very high titers in tissue culture and ability to large scale production (Vemula et al, 2010).

Therefore, in this study, a replication-defective human adenovirus vector expressing N gene of Brazilian variant strain of IBV was constructed and evaluated in SPF chickens for the immune responses and protective efficiency against IBV challenge.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. Virus and cells

The reference IBV strain Massachusetts/41 (M41) was used in this study to challenge. Sample from Brazilian variant strain of IBV predominantly associated to upper respiratory disease was maintained as allantoic fluid seed stocks in the Embrapa Swine and Poultry laboratory (Concórdia, SC, Brasil). It was propagated following standard procedures at 37°C in the allantoic cavities of 9-day-old Specific Pathogen Free (SPF) embryonated chicken eggs (Owen et al., 1991). The virus infectious titre was determined by inoculation of 8-fold serial dilution in SPF embryonated eggs and measured as egg infectious doses 50% (EID₅₀) following the Read and Muench method (Reed and Muench, 1938; Owen et al, 1991). The infected allantoic fluid was stored at -80°C until use.

The live vaccine for IBV serotype Massachusetts is the only currently licensed for use in Brazil. The commercial Mass-I vaccine (H120, Zoetis®) was used according to the manufacturer's instructions to homolog protection control.

Human embryo kidney cells (HEK-293A/ Invitrogen®) were used to generate defective recombinant human adenovirus type 5 (E1/E3-defective), as previously described (Moraes et al, 2001). HEK-293A cells were cultured in Dulbecco Modified Eagle Medium (Sigma) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS), 2mM L-glutamine and 10mg/mL gentamicin at pH 7,2 and incubated at 37°C with 5% carbon dioxide.

2.2. Construction of a recombinant adenovirus expressing "N" gene of IBV

2.2.1. Amplification and cloning of N gene

Total RNA was isolated from IBV infected allantoic fluid using Trizol reagent (Invitrogen®, Carlsbad, CA, USA) according to the manufacturer's instructions. Complete N gene (1233 bp accession number GQ504724.1) was amplified by RT-PCR using the following primers: 5'-CCATCGATGTCATGGCAAGCGGTAAGGCA-3' (forward) and 5'-TCTAGATCAAAGTTCATTCTCTCCTAGGGCTG- 3' (reverse) (*Clal* and *XbaI* restriction sites underlined). The PCR products were cloned into TOPO vector (Invitrogen®, Carlsbad, CA, USA) and all plasmids were sequenced to confirm gene insertion.

2.2.2. Construction and generation of recombinant adenovirus

The N gene cloned was removed from plasmids cited above by digestion with *Clal* and *XbaI*, gel purified and ligated into similarly digested pAd5-Blue adenovirus vector (provided by Dr. Marvin J. Grubman, Plum Island Animal Disease Center, PIADC/ARS/NY/USA), under transcriptional control of the human cytomegalovirus (CMV) early promoter. The successful ligation and orientation were confirmed by digestion with *HindIII* and sequencing. The resulting adenoviral plasmid (pAd5_N) was linearized with *PacI*, purified by ethanol precipitation, and used to transfect HEK-293A cells. The cells were transfected in 6-well plates with 2µg of linearized plasmid DNA using Polyfect Transfection Reagent (Qiagen®) following the manufacturer's instructions. Wells were examined daily until viral plaques formation. Plaques were individually picked and used to infect a 150 mm flask of HEK-293A cells as described by Moraes et al (2001) to generate recombinants adenovirus, designated rAd5_N.

2.2.3. Identification and expression of IBV N by recombinant virus

The expression of N protein was demonstrated in HEK-293A cells infected with recombinant adenovirus by immunoperoxidase monolayer assay. Briefly, confluent cells in 96-well culture plate were infected with rAd5_N. After 48 h, the cells were washed and fixed with 4% paraformaldehyde solution for 30 min at room temperature, followed by incubation with mouse monoclonal antibody anti-N of IBV (Prionics®, Switzerland) for 1 h at 37°C. The cells were rinsed with PBS-T and incubated with anti-mouse conjugated with peroxidase (Sigma®, A-2304) at 37°C for 30 minutes. After, the cells were washed with PBS-T, incubated with AEC (3-amino-9-ethyl-carbazole peroxide substrate) solution for 10 min at room temperature, washed again and visualized in an inverted microscope (Axiovert 200; Carl Zeiss®, Oberkochen, Germany).

2.2.4. Purification and titration of recombinant

For large-scale preparation, the recombinant adenovirus were propagated in multiple 150 mm flasks of HEK-293A cells and purified by sedimentation through a cesium chloride gradient (Beckman® Ultracentrifuge, SW40 Ti rotor, 23000 x g, 15°C, 20 h). The purified viruses were dialyzed extensively against virus storage buffer (137mM NaCl, 5mM KCl, 10mM Tris, 1mM MgCl₂) and stored in small aliquots at -80°C after addition of 10% glycerol. Virus titers were determined in HEK-293A cells and expressed as TCID₅₀ (tissue culture infectious dose) and the final product was used on immunization strategies (Table 1) at a dose of 10⁷ TCID₅₀/0,1mL.

2.3. Animal experiments

2.3.1. Immunization of chickens

The present study was conducted in accordance with Brazilian and International Standards on animal welfare being evaluated and approved by the Embrapa's Swine and Poultry Ethics Committee on Animal Utilization (CEUA) under protocol number 010/2010.

SPF chicken embryonated eggs (White Leghorn lineage) were obtained from Vallo Biomedica (Minas Gerais, Brazil) and post-hatching, the chickens were housed in positive-pressure isolators and divided randomly into seven groups ($n=10$), which were inoculated through a nasal-ocular route according to the immunization strategies summarized in Table 1. Chickens were individually inoculated at 1-day-old. Group 1 was maintained as negative control, while group 2 was only challenged with M41 as positive control. Groups 3 and 4 were inoculated with Ad5_N vector vaccine. Groups 5 and 6 were vaccinated with commercial vaccine Mass-I (Zoetis®), according to the manufacturer's instructions. Groups 4 and 6 were boosted with the same dose of Ad5_N at 14 days after the initial inoculation. Group 7 was inoculated with empty vector, without N gene, to access the security of vector.

Table 1. Immunization strategies and serum sample collection.

Group	Vaccination		IBV Challenge		Serum samples collection
	1 day old	14 days	21 dpv*	35 dpv*	Age of birds (days)
G1 – negative control	-	-	-	-	1
G2 – positive control	-	-	M41	-	26
G3	Ad5_N	-	M41	-	21;26
G4	Ad5_N	Ad5_N	-	M41	7;14;21;40
G5	H120	-	M41	-	21;26
G6	H120	Ad5_N	-	M41	7;14;21;40
G7	Empty Ad5	-	-	-	26

*dpv: days post vaccination

2.3.2. Detection of anti-IBV specific antibody

The birds were bled from wing vein according to the Table 1. Pre-vaccination sera were collected for the control chickens. Blood was also collected before and after booster vaccination as well as after challenge. Sera were stored at -20°C for serologic analysis. Specific antibodies for IBV were measured by enzyme-linked immunoassay kit (IDEXX IBV antibody ELISA kit, Westbrook, MA, USA), according to the manufacturer's instructions. The optical density at 650nm was measured in a microplate reader (Biotek® model ELx 800). Negative and positive control sera were included in each assay and the total serum IBV-specific antibodies were represented by the value of optical density.

2.3.3. Assessment of protection against challenge

Chickens were challenged at 21 (G2, G3, G5) or 35 (G4 and G6) days post vaccination (dpv), with 10^3 EID₅₀ of IBV M41 strain through a nasal-ocular route and examined daily for the clinical signs of BI. Five days after challenge, birds were euthanized and immediately necropsied, followed by collection of trachea and lung tissues for analysis.

2.3.4. Pathological examination

Tracheal and lung samples were collected from each group and submitted to technical process for histopathological analysis. The scores of lesions were determined according to recommendations described previously (Andrade et al, 1982; Yachida et al, 1985).

2.3.5. Ciliary activity

Trachea samples were carefully removed from each bird. Transverse sections were made and divided trachea into 3 portions (proximal, medial and distal), making a total of 9 rings from each bird. Each portion was individual examined by microscopy for evidence of ciliary activity and the scores were determined according to previously described recommendations (Darbyshire, 1980): zero, all cilia beating; 1, 75% beating; 2, 50% beating; 3, 25% beating; and 4, none beating (100% ciliostasis). The final score zero, 1 or 2 was deemed to have been protected by the vaccine against the challenge strain.

2.3.6. Real-time quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-qPCR)

Total RNA extractions from the proximal third from tracheal samples of experimentally infected chickens were performed using Trizol Reagent (Invitrogen) followed by purification using RNeasy Mini Kit (Qiagen). The RNA quality was analyzed in 1% gel and quantified by ultraviolet (UV) absorbance at 260 nm (A260). The purity of RNA was evaluated by ratio 260/280nm (samples with ratio below 1.9 were repeated).

For quantification of IFN γ transcripts, the cDNA was synthesized according to instructions provided with High Capacity cDNA Reverse Transcription (Life Technologies) and using OligodT primers (IDT). The real-time PCR using the SYBR Green I marker was used for the relative quantification of mRNA, similarly as described by Okino et al. (2014) (primers in table 2). The relative expression of the IFN γ gene in the tracheal samples of infected chicks was quantified as the fold change relative to the mock infected group (negative control), and the gene expression from each sample were standardized using the Cq value of the GAPDH mRNA for the same sample, according to the recommendations (Pfaffl, 2001). Primers used for gene expression were designed for spanning exon-exon junction.

Absolute quantification of viral load of IBV from total extracted RNA, was performed using AgPath ID One-step RT-PCR kit (Ambion®) and primers and probe previously described (Chousalkar et al., 2009) for 3'UTR of IBV. The standard curve was constructed using RNA transcribed from plasmidial DNA containing 3'UTR fragment of IBV produced at Embrapa Swine and Poultry.

Table 2. Primers used in Real time PCR.

Gene	Primers (5'- 3')	Product size (Bp)	Reference	Efficiency
GAPDH	F: AGCTGAATGGGAAGCTTACTGG R: GCAGGTCAGGTCAACAACAGAG	74	Designed	101.77
IFN γ	F: AGCCGCACATCAAACACATA R: AAGTCGTTTCATCGGGAGCTT	115	Designed	101.94
IBV-3'UTR	F: ATAGGCATGTAGCTTGATTACC R: GTTCCAGGCTACTAAGTAGAC	76	Chousalkar et al., 2009	
IBV-Probe	LNA probe-5' (FAM) agAcaTttCccTggcg (BHQ-2)-3'	76	Chousalkar et al., 2009	

Bp, Base pairs; F, forward; R, reverse.

2.4. Statistical analysis

The statistical analysis was performed using the Graph Pad software and the values were considered statistically significant when $p \leq 0.05$. The comparisons of the mean antibody levels and tracheal pathological changes (viral replication, histopathology, and ciliostasis) between the experimental groups were performed using the Kruskal-Wallis test, followed by Dunn's test.

3. RESULTS

3.1. Construction and generation of recombinant adenovirus

The vectors containing the IBV N gene under the control of CMV early promoter were constructed as shown in Figure 1A. The N gene was ligated into pAd5 in *Clal/XbaI* sites. The orientation of the insert was confirmed by digestion with *HindIII* (Figure 1B) and by sequencing (data not show).

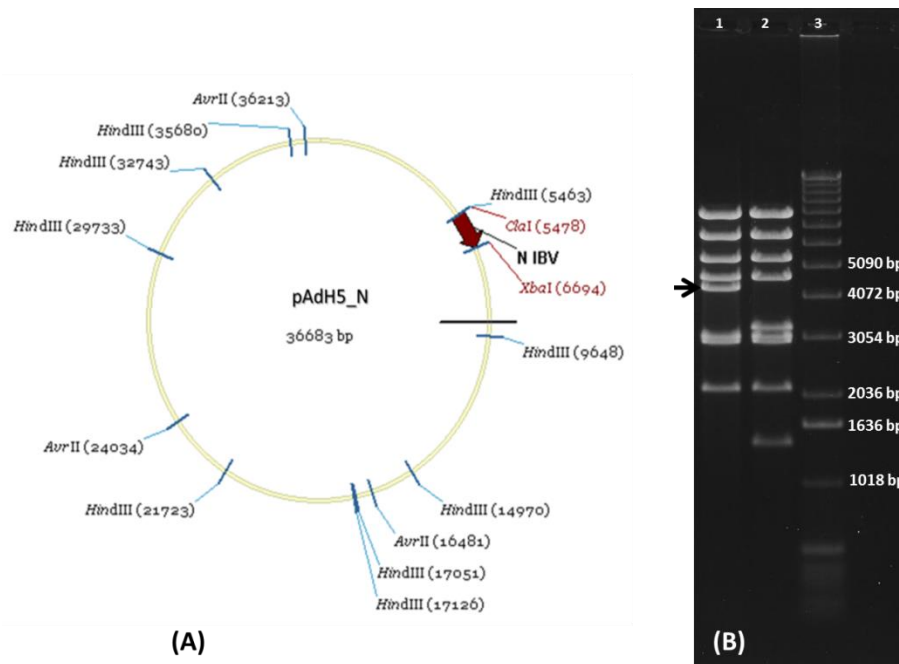


Figure 1. (A) Schematic design of recombinant adenovirus vector pAd5-Blue showing clivage sites for the restriction enzymes. (B) *Hind*III digestion of recombinant adenovirus with the insert of N gene (lane 1), recombinant adenovirus empty (lane 2) and DNA Ladder 1Kb plus (Invitrogen ®) (lane 3). The arrow show the presence of a 4300 bp band indicanting the insertion of N gene.

3.2. Expression of recombinant proteins

To examine the expression of the N protein by the recombinant adenovirus, HEK293 cells were infected with rAd5_N and immunoperoxidase assay with anti-N antibodies was used for recombinant detection. The cells were fixed and incubated with a mouse monoclonal antibody anti-N of IBV, followed by immunostaining with anti-mouse conjugated with peroxidase. The results indicated that the cells infected by rAd5-N shown intense red staining, due to the presence of the expressed protein (Figure 2).

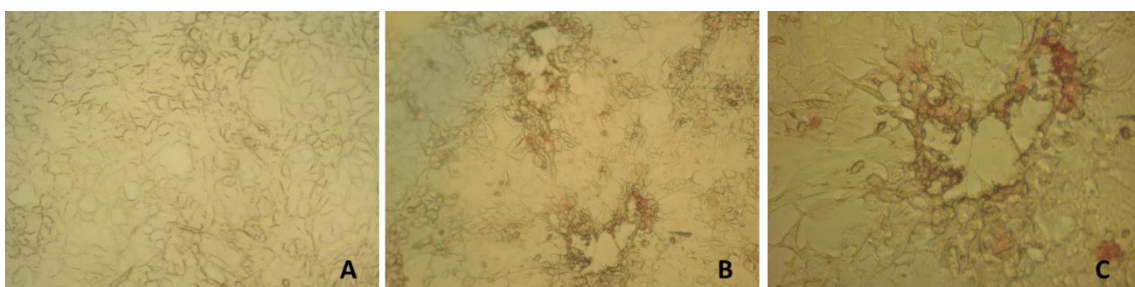


Figure 2. Immunoperoxidase monolayer assay: HEK293A cells, monoclonal antibody anti N IBV. A) Cells negative control, 200X magnification; B) rAd5_N inoculated cells, 100X magnification; C) rAd5_N inoculated cells, 400X magnification.

3.3. Induction of antibodies

The concentrations of serum anti-IBV antibodies were measured with an ELISA. The recombinant vaccine Ad5_N do not induced detectable antibodies to IBV in chickens three weeks after injection and there was no specific antibody response in the group of chickens receiving two doses of recombinant Ad5_N. On the other hand, there was specific antibody response elicited by commercial vaccine since the 7th-day after first inoculation in group 6. These results suggest that the recombinant vaccine was unable to induce a significant increase in humoral responses.

3.4. Protection of chickens against IBV challenge

3.4.1. Pathological examination and ciliary activity

Tissues samples were evaluated 5 days post challenge and tracheal fragments were examined by optical microscopy and observed for ciliary loss, degeneration and necrosis of epithelial cells, glandular degeneration, inflammatory cells presence and epithelial hyperplasia. Tracheal lesions and percentage of protection of chickens after challenge are summarized in Table 3. No pathologic alterations of trachea were observed in the uninfected group (G1) and in the empty vector (G7), without IBV gene (Figure 3).

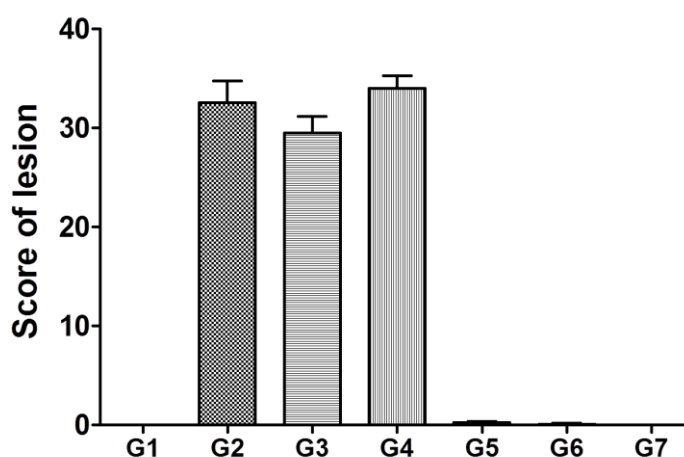


Figure 3. Mean scores of lesions as analyzed by histopathology. The chickens were previously immunized with recombinant Ad5_N vaccine (G3, G4) or with commercial vaccine H120 strain (G5, G6) at one day of age. In Group 6, chickens were booster with recombinant Ad5_N vaccine. Group 2 was left non-immunized and Group 1 was mock vaccinated and infected. In group 7, chickens received only empty vector without IBV gene.

In addition, as shown in Figure 3, chickens vaccinated with recombinant vaccine showed similar score of lesions to the challenge control group (M41 only), indicating that the vaccine seemed to be ineffective. Meanwhile, in G5, where the birds were vaccinated with the commercial vaccine, the scores of lesions were similar to those observed in the negative control group, suggesting that in the experimental conditions used in this study, the commercial vaccine was able to induce protection against to homologous IBV challenge.

In lung fragments analyzed, it was observed that few birds in groups 3 and 4 (5/20) had mild heterophils infiltration of the bronchial mucosa, indicating that the IBV

injuries in the lung tissue are not common, at least until 40 days of age and 5 days post challenge, stressing that the election of tissue for this analysis should be the trachea.

In ciliostasis evaluation, as shown in Figure 4, all chickens that received one or two doses of Ad5_N vaccine shown ciliostasis score 3, indicating that those cilia were no longer functional and, as consequence, birds were not protected against challenge.

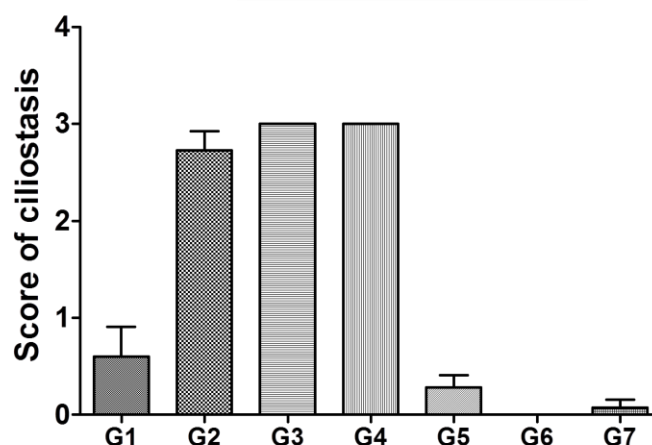


Figure 4. Mean scores of the lesions as analyzed by ciliostasis. The chickens were previously immunized with recombinant Ad5_N vaccine (G3, G4) or with commercial vaccine H120 strain (G5, G6) at one day of age. In Group 6, chickens were booster with recombinant Ad5_N vaccine. Group 2 was left non-immunized and Group 1 was mock vaccinated and infected. In group 7, chickens received only empty vector without IBV gene.

In groups 5 and 6, all chickens that received the commercial vaccine shown ciliostasis score zero or one, indicating that vaccine protected birds against challenge (Table 3).

Table 3. The incidence of ciliostasis in the trachea and cross protection rate from different groups challenged by virulent IBV M41 strain.

Groups	Number of chickens challenged	Ciliary activity: number of chickens and score	Protection (%)
G2_positive control	10	10/10: 3 and 4	0
G3_Ad5_N_1 dose	10	10/10: 3	0
G4_Ad5_N_2 doses	10	10/10: 3	0
G5_H120	10	10/10: zero and 1	100
G6_H120+Ad5_N	10	10/10: zero	100

3.4.2. Real time quantitative reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR)

The real-time quantitative reverse transcription polymerase chain reaction was employed in order to evaluate the relative expression of IFN γ in tracheal samples at 5 days post IBV challenge. Additionally, absolute quantification was used to detect the viral load in tracheal samples at the same time point. The results showed that the mean level of IFN γ was not significantly higher in chickens inoculated with recombinant Ad5_N vaccine (Figure 5) as compared to that of control group ($P < 0.05$).

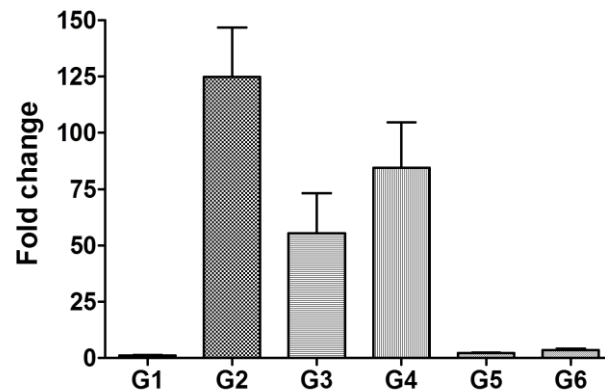


Figure 5. Mean fold changes in the mRNA expression of the IFN̳ gene in tracheal samples collected at 5 days post-infection from chickens experimentally challenged with the M41 strain of infectious bronchitis virus. The chickens were previously immunized with recombinant Ad5_N vaccine (G3, G4) or with commercial vaccine H120 strain (G5, G6) at one day of age. In Group 6, chickens were booster with recombinant Ad5_N vaccine. Group 2 was left non-immunized and Group 1 was mock vaccinated and infected. Significant differences between the groups were detected using the Kruskal-Wallis test, followed by Dunn's mean test ($p < 0.05$).

The quantification of viral load in the tracheas of challenged birds shown that, although the N protein is recognized as highly immunogenic, it did not provide protection against virulent challenge and 100% of chickens in G3 and G4 had virus present in trachea 5 days after challenge with virulent IBV (Figure 6). Samples from group 7, that chickens received only empty vector without IBV gene, were not analyzed by real time PCR.

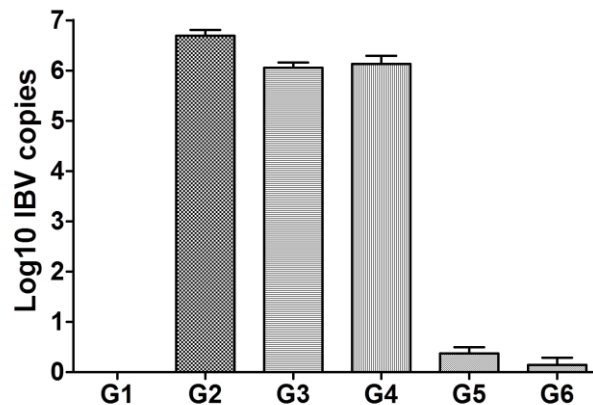


Figure 6. Log of IBV copy numbers measured by Real Time RT-PCR with the SYBR Green I marker. The chickens were previously immunized with recombinant Ad5_N vaccine (G3, G4) or with commercial vaccine H120 strain (G5, G6) at one day of age. In Group 6, chickens were booster with recombinant Ad5_N vaccine. Group 2 was left non-immunized and Group 1 was mock vaccinated and infected. Significant differences between the groups were detected using the Kruskal-Wallis test, followed by Dunn's mean test ($p < 0.05$).

4. DISCUSSION

Construction of recombinant viral-vector based vaccines has shown to be a valuable alternative as vaccine against infectious pathogens showing ability to induce protective efficacy against a variety of avian diseases (Toro et al, 2007; Greenall, 2010; Zhang et al, 2012). Besides, the use of adenovirus vectors to express foreign antigens in animals has been motivated by efficient transduction of a wide variety of cell types and for the delivery of antigens to induce mucosal and cell mediated immunity (Russel, 2000). Previous studies have demonstrated the use of adenovirus as vectors in the production of vaccines against the avian influenza virus by testing different doses and routes of administration, inducing humoral and cellular immune response in vaccinated chickens (Toro et al, 2007; Singh et al, 2010; Steitz et al, 2010).

Studies performed in order to increase the efficiency of immunization procedures to control IBV infection, had demonstrated that the utilization of such type of vaccines are able to protect birds of IBV field variants. Such studies employed the recombinant vaccine approach in order to develop a vaccine against IBV and the results have been variable, reporting protection induced by S1 gene, with partial or complete protection in vaccinated chickens (Johnson et al, 2003; Wang et al, 2009; Zeshan et al, 2010, 2011; Zhang et al, 2012).

In the present study, a replication defective human Ad5 vector expressing the complete N gene of IBV was constructed and the immune response was detected in SPF chickens. The IBV N protein is highly conserved among strains and carries epitopes that induces CTL responses, which are critical for preventing IBV infection in poultry (Seo and Collisson, 1997; Ignjatovic and Sapats, 2005; Tang et al, 2008). Herein the complete N gene was amplified and identified by sequencing, following by the plasmid construction by cloning into human adenovirus vector. The recombinant adenovirus was inoculated into chickens and tested in a protection-challenge experiment, where SPF birds were split in seven groups.

The results here obtained showed that the recombinant vaccine Ad5-N does not causes detectable positive serological responses by commercial Elisa test in vaccinated chickens. The vaccination with Ad5_N alone induced a very weak immune response demonstrated by the absence of antibodies in comparison with commercial vaccine. Is important to note that the Elisa used to measure the antibody response was a usual commercial test, where the antigen used is the whole IBV and not a recombinant Elisa using the N protein like antigen. At this moment, our team is developing a recombinant N/IBV Elisa, where the serum samples collected from the experimental vaccinated chickens may be re-evaluated. Besides, is important to note too that some reports have shown that the circulating antibodies are not directly correlate with protection from IBV infection (Gelb et al., 1998; Raggi and Lee, 1965), while other studies have demonstrated that humoral immunity plays an important role in disease recovery and virus clearance (Raggi and Lee, 1965; Cook et al., 1991; Toro and Fernandez, 1994; Thompson et al., 1997; Gelb et al., 1998). Therefore, the precise role of antibodies for the control of IBV infection remains unclear, suggesting an important role of the cell mediated immunity (Collisson et al., 2000).

In order to evaluate cellular immune response, trachea samples were collected and analyzed to relative expression of INF γ , since during the course of viral infections, some mediators produced by CD8 + effector T cells (CTLs), such as INF γ , have been associated to the destruction of virally infected cells (Göbel et al, 2001; McElhaney et

al, 2009). The results obtained here indicated that the level of IFN γ in the tracheas was slightly higher in groups vaccinated with Ad5_N as compared to the control group, however such difference was not significant. It is suggested that the recombinant vaccine induced a poor cellular immune response, which did not induce protection to IBV challenge. One possible explanation for this outcome could be that the recombinant vaccine, although immunogenic, was not able to induce protection in chickens against IBV challenge and would require further investigations about doses and routes of administration.

To investigate the level of protection elicited in vaccinated chickens, ciliary activity and histopathological lesions were analyzed in trachea samples. These results suggested that vaccination with the adenovirus recombinant vaccine expressing IBV N protein did not reduce the scores of lesions and fail to induce a protective immune response in the challenged vaccinated chickens.

The use of N gene has been widely demonstrated in studies using DNA vaccines, with protection rates ranging between 50 and 86% (Tang et al, 2008; Guo et al, 2010; Yan et al, 2013). Our observations are in agreement with some previous studies that report the development of experimental DNA vaccines, where despite the recognized immunogenic, the N protein did not result in a detectable proliferative response to IBV in vaccinated chickens (Boots et al, 1992) and vaccine provided no significant protection against challenge (Ignjatovic, et al, 1994).

In summary, we have demonstrated the construction and in vivo evaluation of a recombinant adenovirus expressing N gene of IBV. Our results indicate that the vaccine seemed to be ineffective and did not induce sufficient protection to vaccinated chickens challenged with IBV. Further studies are being conducted in order to construct and evaluate a recombinant adenovirus expressing S1 gene, for further analysis with different immunization protocols and combinations, in order to develop an alternative to improve the levels of protection in commercial birds against the infection by IBV.

5. ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by CAPES Foundation and Embrapa Swine and Poultry (Project number 01/2009). We would like to thank Dr. Marvin J. Grubman and Abelardo Silva Junior, for providing the Ad5 vector. Special thanks are due to the colleagues at Embrapa, for their care with the chickens used in this study.

6. REFERENCES

Ahmad, S., Bassiri, M., Banerjee, A.K., Yilma, T. 1993. Immunological characterisation of the VSV nucleocapsid (N) protein expressed by recombinant baculovirus in *Spodoptera exigua* larva: Use in differential diagnosis between vaccinated and infected animals. *Virology* 192, 207–216.

Andrade, L. F.; Villegas, A. P.; Flecher, O. J.; Laudencia, R. 1982. Evaluation of ciliary movement in tracheal rings to assess immunity against infectious bronchitis virus. *Avian Dis.*, v.26 (4), p.805-14.

Ariane, R., Ratna, M., Dennis, T., Gert, G., Jerome, C., Maria, G.P., Jaco, K., Sampa, S., Harikrishnan, B., Norman, L.L., Jaap, G., Katarina, R. 2009. Evaluation of a prime-

boost vaccine schedule with distinct adenovirus vectors against malaria in rhesus monkeys. *Vaccine* 27, 6226–6233.

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

Bijlenga, G., Cook, J.K.A., Gelb, J. Jr., de Wit, J.J. 2004. Development and use of the H strain of avian infectious bronchitis virus from the Netherlands as a vaccine: a review. *Avian Pathol* 33, 550-557.

Boots, A.M.H.; Benaissa-Trouw, B.J.; Hesselink, W.; Rijke, E.; Schrier, C.; Hensen, E.J. 1992. Induction of anti-viral immune responses by immunization with recombinant-DNA encoded avian coronavirus nucleocapsid protein. *Vaccine*, Vol. 10, Issue 2, 119-124.

Bournell, M. E.; Brown, T.D.; Foulds, I.J.; Green, P.F.; Tomley, F.M.; Binns, M.M. 1987. Completion of the sequences of the genome of the coronavirus avian infectious bronchitis virus. *J. Gen. Virol.*, v. 68 (1), p. 57-77.

Cavanagh, D. 1981. Structural polypeptides of coronavirus IBV. *J. Gen. Virol.*, v.53, n.1, p.93-103.

Cavanagh, D., Darbyshire, J.H., Davis, P., Peters, R.W. 1984. Induction of humoral neutralising and haemagglutination inhibiting antibody by the spike protein of avian infectious bronchitis virus. *Avian Pathol*, 13, 573-583.

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.

Cavanagh, D. 2007. Coronavirus avian infectious bronchitis virus. *Vet. Res.* 38, 281–297.

Chacón, J.L.; Rodrigues, J.N.; Assayag Júnior, M.S.; Peloso, C.; Pedroso, A.C.; Ferreira, A.J.P. 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.; Cheetham, B.F.; Roberts, J.R. 2009. LNA probe-based real-time RT-PCR for the detection of infectious bronchitis virus from the oviduct of unvaccinated and vaccinated laying hens. *Journal of Virological Methods*, 155, 67–71.

Collisson, E.W., Pei, J., Zielawa, J., Seo, S.H. 2000. Cytotoxic T lymphocytes are critical in the control of infectious bronchitis in poultry. *Dev. Comp. Immunol.* 24, 187–200.

Cook, J.K., Davison, T.F., Huggins, M.B., McLauthlan, P. 1991. Effect of in vivo bursectomy on the course of an infectious bronchitis virus infection in line C White Leghorn chickens. *Arch Virol*, 118:225–34.

Cook, J.K., Smith, H.W., Huggins, M.B. 1986. Infectious bronchitis immunity: its study in chickens experimentally infected with mixtures of infectious bronchitis virus and *Escherichia coli*. *J. Gen. Virol.* 67, 1427–1434.

- Darbyshire, J. H. 1980. Assessment of cross-immunity in chickens to strains of avian infectious bronchitis virus using tracheal organ cultures. *Avian Pathology*, 9: 179-184.
- Errington, W., Steward, M., Emmerson, P. 1995. A diagnostic immunoassay for Newcastle disease virus based on the nucleocapsid protein expressed by a recombinant baculovirus. *J. Virol. Methods* 55: 357–365.
- Fraga, A.P.; Balestrin, E.; Ikuta, N.; Fonseca, A.S.K.; Spilki, F.R.; Canal, C.W.; Lunge, V.R. 2013. Emergence of a new genotype of avian infectious bronchitis virus in Brazil. *Avian Diseases*, 57:225–232.
- Gelb Jr., J., Nix, W.A., Gellman, S.D. 1998. Infectious bronchitis virus antibodies in tears and their relationship to immunity. *Avian Dis*, 42:364–74.
- Göbel, T.W., Kaspers, B., Stangassinger, M. 2001. NK and T cells constitute two major, functionally distinct intestinal epithelial lymphocyte subsets in the chicken. *Int Immunol*; 13:757–762.
- Gough, R.E., Alexander, D.J. 1979. Comparison of duration of immunity in chickens infected with a live infectious bronchitis vaccine by three different routes. *Res Vet Sci*, 26:329–32.
- Greenall, S.A., Tyack, S.G., Johnson, M.A., Sapats, S.I. 2010. Antibody fragments, expressed by a fowl adenovirus vector, are able to neutralize infectious bursal disease virus. *Avian Pathology*, 39(5), 339-348.
- Guo, Z.; Wang, H.; Yang, T.; Wang, X.; Lu, D.; Li, Y.; Zhang, Y. 2010. Priming with a DNA vaccine and boosting with an inactivated vaccine enhance the immune response against infectious bronchitis virus. *Journal of Virological Methods*, 167, 84–89.
- Hummel, K.B., Erdman, D.D., Heath, J., Bellini, W.J. 1992. Baculovirus expression of the nucleocapsid gene of measles virus and utility of the recombinant protein in diagnostic enzyme immunoassays. *J. Clin. Microbiol.* 30, 2280–2874.
- Ignjatovic, J. & Galli, L. 1994. The S1 glycoprotein but not the N or M proteins of avian infectious bronchitis virus induces protection in vaccinated chickens, *Arch. Virol.* 138:117–134.
- Ignjatovic, J. & Sapats, S. 2005. Identification of previously unknown antigenic epitopes on the S and N proteins of avian infectious bronchitis virus. *Arch Virol*, 150, 1813-1831.
- Johnson, M.A., Pooley, C., Ignjatovic, J., Tyack, S.G. 2003. A recombinant fowl adenovirus expressing the S1 gene of infectious bronchitis virus protects against challenge with infectious bronchitis virus, *Vaccine* 21: 2730–2736.
- Lai, M. M. C.; Cavanagh, D. 1997. The molecular biology of coronaviruses. *Adv. Virus Res.* v.48, n.1, p.1-77.
- Linde, G.A., Granstrom, M., Orvell, C. 1987. Immunoglobulin class and immunoglobulin G subclass enzyme-linked immunosorbent assays compared with microneutralisation assay for sero-diagnosis of mumps infection and determination of immunity. *J. Clin. Microbiol.* 25, 1653–1658.
- Livak, K.J. and Schmittgen, T.D. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-Delta Delta C(T)} method. *Methods* 25: 402–408.

- McElhaney, J.E., Ewen, C., Zhou, X. et al. 2009. Granzyme B: Correlates with protection and enhanced CTL response to influenza vaccination in older adults. *Vaccine*, 27: 2418–2425.
- McKinley, E.T., Hilt, D.A., Jackwood, M.W. 2008. Avian coronavirus infectious bronchitis attenuated live vaccines undergo selection of subpopulations and mutations following vaccination. *Vaccine* 26, 1274-1284.
- Moraes, M. P.; Mayr, G. A.; Grubman, M. J. 2001. pAd5-Blue: Direct Ligation System for Engineering Recombinant Adenovirus Constructs. *BioTechniques* V. 31 (5), 1050-1056.
- Ndifuna, A., Waters, A. K., Zhou, M., Collisson, E. W. 1998. Recombinant nucleocapsid protein is potentially an inexpensive, effective serodiagnostic reagent for infectious bronchitis virus. *Journal of Virological Methods*, 70, 37–44.
- Okino, C.H.; Santos, I.L.; Fernando, F.S.; Alessi, A.C.; Wang, X.; Montassier, H.J. 2014. Inflammatory and Cell-Mediated immune responses in the respiratory tract of chickens to infection with Avian Infectious Bronchitis Virus. *Viral Immunology*, v. 27, n. 8.
- Owen, R., Cowen, B.S., Hattel, A., Naqi, S.A., Wilson, R.A. 1991. Detection of viral antigen following exposure of one-day-old chickens to the Holland-52 strain of IBV. *Avian Pathol*, 20: 663–673.
- Pfaffl, M.W. 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research*, vol. 29, 2002-2007.
- Precausta, P.M.; Simatos, D.; Le Pemp, M.; Devaux, B.; Kato, F. 1980. Influence of Residual Moisture and Sealing Atmosphere on Viability of Two Freeze-Dried Viral Vaccines. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 12, n. 4, p. 483-489.
- Reed, L.J., and Muench, H. 1938. A simple method of estimating fifty per cent end points. *American Journal of Hygiene*, 27:493–497.
- Reid-Sanden, F.L., Sumner, J.W., Smith, J.S., Fekadu, M., Shaddock, J.H., Bellini, W.J. 1990. Rabies diagnostic reagents prepared from a rabies N gene recombinant expressed in baculovirus. *J. Clin. Microbiol.* 28, 858–863.
- Russell, W.C. 2000. Update on adenovirus and its vectors. *J Gen Virol*; 81: 2573–2604.
- Seo, S.H., Collisson, E.W. 1997. Specific cytotoxic T lymphocytes are involved in in vivo clearance of infectious bronchitis virus. *J. Virol.* 71, 5173–5177.
- Seo, S.H., Wang, L., Smith, R., Collisson, E.W. 1997. The carboxyl-terminal 120-residue polypeptide of infectious bronchitis virus nucleocapsid induces cytotoxic T lymphocytes and protects chickens from acute infection. *J. Virol.* 71, 7889–7894.
- Siddel, S.; Wege, H.; Meulen, V. T. 1983. The biology of coronaviruses. *J. Gen. Virol.*, v.64, n.4, p.761-776.

- Silva, E.N. 2010. Infectious Bronchitis in Brazilian Chickens: Current Data and Observations of Field Service Personnel. *Brazilian Journal of Poultry Science*, v.12 / n.3 / 197 – 203.
- Singh, S.; Toro, H.; Tang, D.; Briles, W.E.; Yates, L.M; Kopulos, R.T.; Collisson, E.W. 2010. Non-replicating adenovirus vectors expressing avian influenza virus hemagglutinin and nucleocapsid proteins induce chicken specific effector, memory and effector memory CD8+ T lymphocytes. *Virology*, 405, 62–69.
- Sneed, L.W., Butcher, G.D., Parr, R., Wang, L., Collisson, E.W. 1989. Comparisons of the structural proteins of avian infectious bronchitis virus as determined by Western blot analysis. *Viral Immunol.* 2, 221–227.
- Steitz, J.; Wagner, R.A.; Bristol, T.; Gao, W.; Donis, R.O.; Gambotto, A. 2010. Assessment of route of administration and dose escalation for an adenovirus-based influenza A virus (H5N1) vaccine in chickens. *Clinical and vaccine immunology*, p. 1467–1472.
- Stern, D. F.; Sefton, B. M. 1982. Coronavirus proteins: biogenesis of avian infectious bronchitis virus proteins. *J. Virol.*, v.44, n.3, p. 794-803.
- Tang, M.; Wang, H.; Zhou, S.; Tian, G. 2008. Enhancement of the immunogenicity of an infectious bronchitis virus DNA vaccine by a bicistronic plasmid encoding nucleocapsid protein and interleukin-2. *Journal of Virological Methods*, 149, 42–48.
- Thompson, G., Mohammed, H., Bauman, B., Naqi, S. 1997. Lack of correlation between infectivity, serologic antibody responses to infectious bronchitis virus in chickens inoculated with response and challenge results in immunization with an avian infectious bursal disease virus and control chickens. *Avian Dis*, 41: 519–27.
- Toro, H., Fernandez, I. 1994. Avian infectious bronchitis: specific lachrymal IgA level and resistance against challenge. *Zentralbl. Veterinarmed. B* 41, 467–472.
- Toro, H.; Tang, D.C.; Suarez, D.L.; Sylte, M.J.; Pfeiffer, J.; Van Kampen, K. R. 2007. Protective avian influenza *in ovo* vaccination with non-replicating human adenovirus vector. *Vaccine* 25: 2886–2891.
- Trevisol, I.M.; Jaenish, F.R.; Silva, V.S.; Brentano, L.; Klein, T.A.P.; Ianiski, F.; Caron, L.; Esteves, P.A. 2011. Otimização da avaliação da atividade ciliar em traqueias como parâmetro para determinar a eficácia de vacinas vivas de Bronquite Infeciosa. *Anais do Prêmio Lamas – 2011*.
- Vemula, S.V.; Mittal, S.K. 2010. Production of adenovirus vectors and their use as a delivery system for influenza vaccines. *Expert Opin Biol Ther.* 10(10): 1469–1487.
- Wang, Y.F., Sun, Y.K., Tian, Z.C., Shi, X.M., Tong, G.Z., Liu, S.W., Zhi, H.D., Kong, X.G., Wang, M. 2009. Protection of chickens against infectious bronchitis by a recombinant fowlpox virus co-expressing IBV-S1 and chicken IFN gamma. *Vaccine*, 27:7046–7052.
- Wareing, M.D., Tannock, G.A. 2001. Live attenuated vaccines against influenza; an historical review. *Vaccine* 19, 3320–3330.

Williams, A.K., Wang, L., Sneed, L.W., Collisson, E.W. 1992. Comparative analyses of the nucleocapsid genes of several strains of infectious bronchitis virus and other Coronaviruses. *Virus Res.* 25, 213–222.

Yachida, S.; Aoyama, S.; Sawaguchi, K.; Takahashi, N.; Iritani, Y.; Hayashi, Y. 1985. Relationship between several criteria of challenge-immunity and humoral immunity in chickens vaccinated with avian infectious bronchitis vaccines. *Avian Pathology*, 14: 199-211.

Yan, F.; Zhao, Y.; Hu, Y.; Qiu, J.; Lei, W.; Ji, W.; Li, X.; Wu, Q.; Shi, X.; Li, Z. 2013. Protection of chickens against infectious bronchitis virus with a multivalent DNA vaccine and boosting with an inactivated vaccine. *J. Vet. Sci.* 14 (1), 53-60.

Yang, Z.Y., Kong, W.P., Huang, Y. 2004. A DNA vaccine induces SARS coronavirus neutralization and protective immunity in mice. *Nature* 428, 561–564.

Zhang, X., Wu, Y., Huang, Y., Liu, X. 2012. Protection conferred by a recombinant Marek's disease virus that expresses the spike protein from infectious bronchitis virus in specific pathogen-free chicken. *Virology Journal*, 9:85.

Zeshan, B.; Zhang, L.; Bai, J.; Wang, X.; Xu, J.; Jiang, P. 2010. Immunogenicity and protective efficacy of a replication-defective infectious bronchitis virus vaccine using an adenovirus vector and administered in ovo. *Journal of Virological Methods* 166: 54–59.

Zeshan, B.; Mushtaq, M. H.; Wang, X.; Li, W.; Jiang, P. 2011. Protective immune responses induced by in ovo immunization with recombinant adenoviruses expressing spike (S1) glycoprotein of infectious bronchitis virus fused/co-administered with granulocyte-macrophage colony stimulating factor. *Vet Mic* 148: 8–17.

4 Considerações Finais

- A Bronquite Infecciosa continua sendo um problema sanitário importante nos planteis avícolas brasileiros, tanto em frangos de corte quanto em matrizes e poedeiras, podendo acarretar grandes prejuízos econômicos ao segmento avícola.

- A vacina recombinante carregada por adenovírus defectivo foi construída e avaliada.

- A vacina recombinante não foi capaz de gerar imunidade protetora nas aves vacinadas frente ao desafio com VBI virulento.

Referências

ADZHAR, A.; GOUGH, R. E.; HAYDON, D.; SHAW, K.; BRITTON, P.; CAVANAGH, D. Molecular analysis of the 793/B serotype of infectious bronchitis virus in Great Britain. **Avian Pathology**, 26, 625-640. 1997.

AHMAD, S., BASSIRI, M., BANERJEE, A.K., YILMA, T. Immunological characterisation of the VSV nucleocapsid (N) protein expressed by recombinant baculovirus in *Spodoptera exigua* larva: Use in differential diagnosis between vaccinated and infected animals. **Virology** 192, 207–216. 1993.

ANDRADE, L. F.; VILLEGAS, A. P.; FLECHER, O. J.; LAUDENCIA, R. Evaluation of ciliary movement in tracheal rings to assess immunity against infectious bronchitis virus. **Avian Dis.**, v. 26 (4), p.805-14. 1982.

ARIANE, R., RATNA, M., DENNIS, T., GERT, G., JEROME, C., MARIA, G.P., JACO, K., SAMPA, S., HARIKRISHNAN, B., NORMAN, L.L., JAAP, G., KATARINA, R. Evaluation of a prime-boost vaccine schedule with distinct adenovirus vectors against malaria in rhesus monkeys. **Vaccine** 27, 6226–6233. 2009.

BABIUK, L.A. & TIKOO, S.K. Adenoviruses as vectors for delivering vaccines to mucosal surfaces. **J Biotechnol** 83, 105-113. 2000.

BALESTRIN, E.; FRAGA, A.P.; IKUTA, N.; CANAL, C.W.; FONSECA, A.S.K.; LUNGE, V.R. Infectious bronchitis virus in different avian physiological systems—A field study in Brazilian poultry flocks. **Poultry Science** 93: 1922–1929. 2014.

BETT AJ, HADDARA W, PREVEC L, GRAHAM FL. An efficient and flexible system for construction of adenovirus vectors with insertions or deletions in early regions 1 and 3. **Proc Natl Acad Sci USA**; 91: 8802–6. 1994.

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

- BOOTS, A.M.H.; BENAÏSSA-TROUW, B.J.; HESSELINK, W.; RIJKE, E.; SCHRIER, C.; HENSEN, E.J. Induction of anti-viral immune responses by immunization with recombinant-DNA encoded avian coronavirus nucleocapsid protein. **Vaccine**, Vol. 10, Issue 2, 119-124. 1992.
- BOURSNELL, M. E.; BINNS, M. M.; FOULDS, I. J.; BROWN, T. D. Sequences of the nucleocapsid genes from two strains of avian infectious bronchitis virus. **J. Gen. Virol.** 66 (Part 3), 573-580. 1985.
- BOURSNELL, M. E.; BROWN, T.D.; FOULDS, I.J.; GREEN, P.F.; TOMLEY, F.M.; BINNS, M.M. Completion of the sequences of the genome of the coronavirus avian infectious bronchitis virus. **J. Gen. Virol.**, v. 68 (1), p. 57-77. 1987.
- BRUÑA-ROMERO, O., GONZALEZ-ASEGUINOLAZA, G., HAFALLA, J.C., TSUJI, M., NUSSENZWEIG, R.S. Complete, long-lasting protection against malaria of mice primed and boosted with two distinct viral vectors expressing the same plasmodial antigen. **Proc Natl Acad Sci USA**, 98, 11491-11496. 2001.
- CAVANAGH, D. Structural polypeptides of coronavirus IBV. **J. Gen. Virol.**, v.53, n.1, p.93-103. 1981.
- CAVANAGH, D. Coronavirus IBV: Structural Characterization of the Spike Protein. **J. Gen. Virol.**, 64, 2577-2583. 1983a.
- CAVANAGH, D. Coronavirus IBV: Further Evidence that the Surface Projections are Associated with Two Glycopolypeptides. **J. Gen. Virol.** 64, 1787-1791. 1983b.
- CAVANAGH, D., DARBYSHIRE, J.H., DAVIS, P., PETERS, R.W. Induction of humoral neutralising and haemagglutination inhibiting antibody by the spike protein of avian infectious bronchitis virus. **Avian Pathol**, 13, 573-583. 1984.
- CAVANAGH, D.; DAVIS, J. P.; MOCKETT, A. P. A. Amino acids within hypervariable region 1 of avian coronavirus IBV (Massachusetts serotype) spike glycoprotein are associated with neutralization epitopes. **Virus Research**, 11:141-150. 1988.
- CAVANAGH, D.; DAVIS, P. J.; COOK, J.; LI, D.; KANT, A.; KOCH, G. Location of the amino acid differences in the S1 spike glycoprotein subunit of closely related serotypes of infectious bronchitis virus. **Avian Pathol.** 21: 33-43. 1992a.

CAVANAGH D.; DAVIS P. J.; COOK J. K. A. Infectious bronchitis virus: evidence for recombination within the Massachusetts serotype, **Avian Pathol.** 21:401–408. 1992b.

CAVANAGH, D.; ELUS, M.M. & COOK, J.K.A. 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. 1997.

CAVANAGH, D.; MAWDITT, K.; BRITTON, P.; NAYLOR, C.J. Longitudinal field studies of infectious bronchitis virus and avian pneumovirus in broilers using type-specific polymerase chain reactions, **Avian Pathol.** 28:593–605. 1999.

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

CAVANAGH, D. Coronaviruses in poultry and other birds. **Avian Pathology**, 34 (6), 439-448. 2005.

CAVANAGH, D. Coronavirus avian infectious bronchitis virus. **Vet. Res.** v. 38, n. 22, p. 281-297, 2007.

CAPUA, I.; MINTA, Z.; KARPINSKA, E.; MAWDITT, K.; BRITTON, P.; CAVANAGH, D.; GOUGH, R. E. Cocirculation of four types of infectious bronchitis virus (793/B 624/I B1648 and Massachusetts). **Avian Pathol.** 28: 587–592. 1999.

CASAI R.; DOVE B.; CAVANAGH D.; BRITTON P. Recombinant avian infectious bronchitis virus expressing a heterologous spike gene demonstrates that the spike protein is a determinant of cell tropism. **J. Virol.** 77:9084–9089. 2003.

CHACÓN, J.L.; RODRIGUES, J.N.; ASSAYAG JÚNIOR, M.S.; PELOSO, C.; PEDROSO, A.C.; FERREIRA, A.J.P. Epidemiological survey and molecular characterization of avian infectious bronchitis virus in Brazil between 2003 and 2009. **Avian Pathology**, 40(2), 153-162. 2011.

CHOUSALKAR, K.K.; CHEETHAM, B.F.; ROBERTS, J.R. LNA probe-based real-time RT-PCR for the detection of infectious bronchitis virus from the oviduct of unvaccinated and vaccinated laying hens. **Journal of Virological Methods**, 155, 67–71. 2009.

COLLISSON, E.W., PEI, J., DZIELAWA, J., SEO, S.H. Cytotoxic T lymphocytes are critical in the control of infectious bronchitis in poultry. **Dev. Comp. Immunol.** 24, 187–200. 2000.

COOK, J.K., DAVISON, T.F., HUGGINS, M.B., MCLAUTHLAN, P. Effect of in vivo bursectomy on the course of an infectious bronchitis virus infection in line C White Leghoen chickens. **Arch Virol**, 118:225–34. 1991.

COOK, J.K., SMITH, H.W., HUGGINS, M.B. Infectious bronchitis immunity: its study in chickens experimentally infected with mixtures of infectious bronchitis virus and *Escherichia coli*. **J. Gen. Virol.** 67, 1427–1434. 1986.

CUBILLOS, A.; ULLOA, J.; CUBILLOS, V.; COOK, J. K. A. Characterization of bronchitis virus isolated in Chile. **Avian pathology**. V20, p.85-99. 1991.

DARBYSHIRE, J. H. Assessment of cross-immunity in chickens to strains of avian infectious bronchitis virus using tracheal organ cultures. **Avian Pathology**, 9: 179-184. 1980.

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

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

ERRINGTON, W., STEWARD, M., EMMERSON, P. A diagnostic immunoassay for Newcastle disease virus based on the nucleocapsid protein expressed by a recombinant baculovirus. **J. Virol. Methods** 55: 357–365. 1995.

FRAGA, A.P.; BALESTRIN, E.; IKUTA, N.; FONSECA, A.S.K.; SPILKI, F.R.; CANAL, C.W.; LUNGE, V.R. Emergence of a new genotype of avian infectious bronchitis virus in Brazil. **Avian Diseases**, 57:225–232. 2013.

FERNANDO, F.S.; MONTASSIER, M.F.S.; SILVA, K.R.; OKINO, C.H.; OLIVEIRA, E.S.; FERNANDES, C.C.; BANDARRA, M.B.; GOLÇALVES, M.C.M.; BORZI, M.M.; SANTOS, R.M.; VASCONCELOS, R.O.; ALESSI, A.C.; MONTASSIER, H.J. 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** 12 (11): 639-646, 2013.

FERREIRA, T.B.; ALVES, P.M.; AUNINS, J.G.; CARRONDO, M.J.T. Use of adenoviral vectors as veterinary vaccines. **Gene Therapy**, 12, S73–S83. 2005.

GELB JR, J.; WOLFF, J. B.; MORAN, C. A. Variant serotypes of infectious bronchitis virus isolated from commercial layer and broiler chickens. **Avian Dis.** 35: 82–87. 1991.

GIBERTONI, A.M.; GONÇALVES, M.C.M.; MONTASSIER, M.F.S.; FERNANDES, C.C.; MONTASSIER, H.J. Clonagem, expressão e caracterização da nucleoproteína recombinante do vírus da bronquite infecciosa em *Escherichia coli* e em *Pichia pastoris*. **Arq. Inst. Biol.**, São Paulo, v.77, n.1, p.1-9, jan./mar., 2010.

GILBERT, S.C., SCHNEIDER, J., HANNAN, C.M., HU, J. T., PLEBANSKI, M., SINDEN, R., HILL, A.V.S. Enhanced CD8+ T cell immunogenicity and protective efficacy in a mouse malaria model using a recombinant adenoviral vaccine in heterologous prime-boost immunization regimes. **Vaccine** 20, 1039-1045. 2002.

GÖBEL, T.W., KASPERS, B., STANGASSINGER, M. NK and T cells constitute two major, functionally distinct intestinal epithelial lymphocyte subsets in the chicken. **Int Immunol**; 13:757–762. 2001.

GOUGH, R.E., ALEXANDER, D.J. Comparison of duration of immunity in chickens infected with a live infectious bronchitis vaccine by three different routes. **Res Vet Sci**, 26:329–32. 1979.

GRAHAM, F. L. et al. Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus 5. **J. Gen. Virol.**, v. 36, p. 59-72, 1977.

GRAHAM, F. L., PREVEC, L. Adenovirus-based expression vectors and recombinant vaccines. **Bio/Technology**, v. 20, p. 363-390, 1992.

GRAHAM FL. Adenovirus vectors for high-efficiency gene transfer into mammalian cells. **Trends in Immunology Today**. 21: 426-428. 2000.

GREENALL, S.A., TYACK, S.G., JOHNSON, M.A., SAPATS, S.I. Antibody fragments, expressed by a fowl adenovirus vector, are able to neutralize infectious bursal disease virus. **Avian Pathology**, 39(5), 339-348. 2010.

GUO, Z.; WANG, H.; YANG, T.; WANG, X.; LU, D.; LI, Y.; ZHANG, Y. Priming with a DNA vaccine and boosting with an inactivated vaccine enhance the immune response against infectious bronchitis virus. **Journal of Virological Methods**, 167, 84–89. 2010.

HUMMEL, K.B., ERDMAN, D.D., HEATH, J., BELLINI, W.J. Baculovirus expression of the nucleocapsid gene of measles virus and utility of the recombinant protein in diagnostic enzyme immunoassays. **J. Clin. Microbiol.** 30, 2280–2874. 1992.

IGNJATOVIC, J. & GALLI, L. The S1 glycoprotein but not the N or M proteins of avian infectious bronchitis virus induces protection in vaccinated chickens, **Arch. Virol.** 138:117–134. 1994.

IGNJATOVIC, J. & SAPATS, S. Identification of previously unknown antigenic epitopes on the S and N proteins of avian infectious bronchitis virus. **Arch Virol**, 150, 1813-1831. 2005.

IMLER, J.L. Adenovirus vectors as recombinant viral vaccines. **Vaccine** 13, 1143-1151. 1995.

JACKWOOD, M.W. Review of Infectious Bronchitis Virus Around the World. **Avian diseases** 56:634–641. 2012.

JIA, W.; KARACA, K.; PARRISH, C.R.; NAQI, S.A. A novel variant of avian infectious bronchitis virus resulting from recombination among three different strains. **Arch Virol** 140:259-271. 1995.

JOHNSON, M.A., POOLEY, C., IGNJATOVIC, J., TYACK, S.G. A recombinant fowl adenovirus expressing the S1 gene of infectious bronchitis virus protects against challenge with infectious bronchitis virus, **Vaccine** 21: 2730–2736. 2003.

KUSTERS, J. G.; NIESTERS, H.; LENSTRA, J. A.; HORZINEK, M. C.; VAN DER ZEIJST, B. A. M. Phylogeny of antigenic variants of avian coronavirus IBV. **Virology** 169: 217–221. 1989.

KUSTERS, J. G.; JAGER, E. J.; NIESTERS; H. G. M.; VAN DER ZEIJST, B. A. M. Sequence evidence for RNA recombination in field isolates of avian coronavirus infectious bronchitis virus. **Vaccine** 8: 605–608. 1990.

LADMAN, B.S.; LOUPOS, A.B. and GELB, Jr., J. Infectious bronchitis virus S1 gene sequence comparison is a better predictor of challenge of immunity in chickens than serotyping by virus neutralization. **Avian Pathology** 35(2), 127/133, 2006.

LAI, M. M. C.; CAVANAGH, D. The molecular biology of coronaviruses. **Adv. Virus Res.** v.48, n.1, p.1-77. 1997.

LI WANG A, DAVE JUNKER B, LISA HOCK B, ELHAM EBIARY, ELLEN W. COLLISSON. Evolutionary implications of genetic variations in the S1 gene of infectious bronchitis virus. **Virus Research** 34, 327-338. 1994.

LINDE, G.A., GRANSTROM, M., ORVELL, C. Immunoglobulin class and immunoglobulin G subclass enzyme-linked immunosorbent assays compared with microneutralisation assay for sero-diagnosis of mumps infection and determination of immunity. **J. Clin. Microbiol.** 25, 1653–1658. 1987.

LIVAK, K.J. AND SCHMITTGEN, T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{(-Delta Delta C(T))} method. **Methods** 25: 402–408. 2001.

MACNAUGHTON, M. R.; MADGE, M. G.; DAVIES, H. A.; DOURMASHKN, R. R. Polypeptides of the surface projections and the ribonucleoprotein of avian infectious bronchitis virus. **Journal of Virology** 24, 821-825. 1977.

MAYR, G.A., CHINSANGARAM, J., GRUBMAN, M.J.. Development of replication-defective adenovirus serotype 5 containing the capsid and 3C protease coding regions of foot-and-mouth disease virus as a vaccine candidate. **Virology** 263, 496-506. 1999.

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

MCELHANEY, J.E., EWEN, C., ZHOU, X. et al. Granzyme B: Correlates with protection and enhanced CTL response to influenza vaccination in older adults. **Vaccine**, 27: 2418–2425. 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.

MOOIJ, P. & HEENEY, J.L. Rational development of prophylactic HIV vaccines based on structural and regulatory proteins. **Vaccine** 20, 304-321. 2001.

MONTASSIER, H.J. Molecular epidemiology and evolution of avian infectious bronchitis virus. **Rev. Bras. Cienc. Avic.** v.12, no.2, p. 87-96, 2010.

MORAES, M. P.; MAYR, G. A.; GRUBMAN, M. J. pAd5-Blue: Direct Ligation System for Engineering Recombinant Adenovirus Constructs. **BioTechniques** V. 31 (5), 1050-1056. 2001.

NDIFUNA, A., WATERS, A. K., ZHOU, M., COLLISSON, E. W. Recombinant nucleocapsid protein is potentially an inexpensive, effective serodiagnostic reagent for infectious bronchitis virus. **Journal of Virological Methods**, 70, 37–44. 1998.

OIE. Avian infectious bronchitis. Cap. 2.3.2. In: OIE Terrestrial Manual 2013.

OKINO, C.H.; SANTOS, I.L.; FERNANDO, F.S.; ALESSI, A.C.; WANG, X.; MONTASSIER, H.J. Inflammatory and Cell-Mediated immune responses in the respiratory tract of chickens to infection with Avian Infectious Bronchitis Virus. **Viral Immunology**, v. 27, n. 8. 2014.

OWEN, R., COWEN, B.S., HATTEL, A., NAQI, S.A., WILSON, R.A. Detection of viral antigen following exposure of one-day-old chickens to the Holland-52 strain of IBV. **Avian Pathol**, 20: 663–673. 1991.

PFAFFL, M.W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucleic Acids Research**, vol. 29, p. 2002-2007. 2001.

REED, L.J., AND MUENCH, H. A simple method of estimating fifty per cent end points. **American Journal of Hygiene**, 27:493–497. 1938.

REID-SANDEN, F.L., SUMNER, J.W., SMITH, J.S., FEKADU, M., SHADDOCK, J.H., BELLINI, W.J. Rabies diagnostic reagents prepared from a rabies N gene recombinant expressed in baculovirus. **J. Clin. Microbiol.** 28, 858–863. 1990.

ROY-CHOWDHURY J, HORWITZ M. Evolution of adenoviruses as gene therapy vectors. **Mol Ther**; 5: 340–344. 2002.

RUSSELL, W.C. Update on adenovirus and its vectors. **J Gen Virol**; 81: 2573–2604. 2000.

SCHALK AF, HAWN MC. An apparently new respiratory disease of baby chicks. **Journal of the American Veterinary Medicine Association** :78:413-416, 1931.

SEO, S.H., COLLISSON, E.W. Specific cytotoxic T lymphocytes are involved in in vivo clearance of infectious bronchitis virus. **J. Virol.** 71, 5173–5177. 1997.

SEO, S.H., WANG, L., SMITH, R., COLLISSON, E.W. The carboxyl-terminal 120-residue polypeptide of infectious bronchitis virus nucleocapsid induces cytotoxic T lymphocytes and protects chickens from acute infection. **J. Virol.** 71, 7889–7894. 1997.

SHAW, G., MORSE, S., ARARAT, M., GRAHAM, F.L. Preferential transformation of human neuronal cells by human adenoviruses and the origin of HEK 293 cells. **Faseb J**, 16, 869-871. 2002.

SIDDEL, S.; WEGE, H.; MEULEN, V. T. The biology of coronaviruses. **J. Gen. Virol.**, v.64, n.4, p.761-776. 1983.

SILVA, E.N. Infectious Bronchitis in Brazilian Chickens: Current Data and Observations of Field Service Personnel. **Brazilian Journal of Poultry Science**, v.12 / n.3 / 197 – 203. 2010.

SINGH, S.; TORO, H.; TANG, D.; BRILES, W.E.; YATES, L.M.; KOPULOS, R.T.; COLLISSON, E.W. Non-replicating adenovirus vectors expressing avian influenza virus hemagglutinin and nucleocapsid proteins induce chicken specific effector, memory and effector memory CD8+ T lymphocytes. **Virology**, 405, 62–69. 2010.

SNEED, L.W., BUTCHER, G.D., PARR, R., WANG, L., COLLISSON, E.W. Comparisons of the structural proteins of avian infectious bronchitis virus as determined by Western blot analysis. **Viral Immunol.** 2, 221–227. 1989.

SOUZA, A.P.D., HAUT, L., REYES-SANDOVAL, A., PINTO, A.R. Recombinant viruses as vaccines against viral diseases. **Braz J Med Biolog Res** 38, 509-522. 2005.

STEITZ, J.; WAGNER, R.A.; BRISTOL, T.; GAO, W.; DONIS, R.O.; GAMBOTTO, A. Assessment of route of administration and dose escalation for an adenovirus-based

influenza a virus (h5n1) vaccine in chickens. **Clinical and vaccine immunology**, p. 1467–1472. 2010.

STERN, D. F.; SEFTON, B. M. Coronavirus proteins: biogenesis of avian infectious bronchitis virus proteins. **J. Virol.**, v.44, n.3, p. 794-803. 1982.

SULLIVAN, N.J. SANCHEZ, A., ROLLIN, P.E., YANG, Z.Y., NABEL. G.J. Development of a preventive vaccine for ebola virus infection in primates. **Nature** 30, 605-609. 2000.

SULLIVAN, N.J. et al. Accelerated vaccination for Ebola virus hemorrhagic fever in non-human primates. **Nature** 424, 681-684. 2003.

TANG, M.; WANG, H.; ZHOU, S.; TIAN, G. Enhancement of the immunogenicity of an infectious bronchitis virus DNA vaccine by a bicistronic plasmid encoding nucleocapsid protein and interleukin-2. **Journal of Virological Methods**, 149, 42–48. 2008.

THOMPSON, G., MOHAMMED, H., BAUMAN, B., NAQI, S. Lack of correlation between infectivity, serologic antibody responses to infectious bronchitis virus in chickens inoculated with response and challenge results in immunization with an avian infectious bursal disease virus and control chickens. **Avian Dis**, 41: 519–27. 1997.

TORO, H., FERNANDEZ, I. Avian infectious bronchitis: specific lachrymal IgA level and resistance against challenge. **Zentralbl. Veterinarmed.** B 41, 467–472. 1994.

TORO, H.; TANG, D.C.; SUAREZ, D.L.; SYLTE, M.J.; PFEIFFER, J.; VAN KAMPEN, K. R. Protective avian influenza *in ovo* vaccination with non-replicating human adenovirus vector. **Vaccine** 25: 2886–2891. 2007.

TORO, H.; VAN SANTEN, V.L.; JACKWOOD, M.W. Genetic Diversity and Selection Regulates Evolution of Infectious Bronchitis Virus. **Avian diseases**, 56:449–455. 2012.

TREVISOL, I. M.; JAENISCH, F. B. Bronquite Infecçiosa das galinhas: Crise atual. **Avicult. Indus.** n. 3, p. 14-20. 2010.

TREVISOL, I.M.; JAENISCH, F.R.F.; SILVA, V.S.; BRENTANO, L.; KLEIN, T.A.P.; ESTEVES, P.A. Avaliação de proteção vacinal para amostras variantes de bronquite

infeciosa das galinhas frente a amostra vacinal H120. CD Room - Anais do Prêmio Lamas – 2010. Santos, São Paulo.

TREVISOL, I.M.; JAENISH, F.R.; SILVA, V.S.; BRENTANO, L.; KLEIN, T.A.P.; IANISKI, F.; CARON, L.; ESTEVES, P.A. Otimização da avaliação da atividade ciliar em traqueias como parâmetro para determinar a eficácia de vacinas vivas de Bronquite Infeciosa. **Anais do Prêmio Lamas** – 2011.

TREVISOL, I.M.; ESTEVES, P.A.; BRENTANO, L.; JAENISCH, F.R.F.; MUNHOZ, L.; RITTERBUSCH, G. In vivo assay of vaccine protection to Brazilian variant strains of infectious bronchitis virus. **In: World Poultry Congress, Salvador/Bahia, CR-Room, Book of Abstracts. 2012**

TREVISOL, I.M.; OKINO, C.H.; MORES, M.A.Z.; MATTOS, G.L.M; BRENTANO, L.; ESTEVES, P.A. Proteção vacinal contra desafio com “variante” de Bronquite infecciosa das galinhas. CD Room - **Anais do Prêmio Lamas** –Atibaia, S.P. 2014.

UBABEF, 2014. Relatório anual da união brasileira de avicultura. Disponível em <http://www.ubabef.com.br/publicacoes> Acessado em 08/12/2014.

VEMULA, S.V.; MITTAL, S.K. Production of adenovirus vectors and their use as a delivery system for influenza vaccines. **Expert Opin Biol Ther.** 10(10): 1469–1487. 2010.

VEMULA, S.V.; PANDEYA, A.; SINGHA, N.; KATZ, J.M.; DONIS, R.; SAMBHARA, S.; MITTAL, S.K. Adenoviral vector expressing murine β -defensin 2 enhances immunogenicity of an adenoviral vector based H5N1 influenza vaccine in aged mice. **Virus Research**, 177, 55– 61. 2013.

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

VOLPERS C, KOCHANNEK S. Adenoviral vectors for gene transfer and therapy. **J Gen Virol**; 6: S164–S171. 2004.

WANG, L.; JUNKER, D.; COLLISON, E. W. Evidence of natural recombination within the S1 gene of infectious bronchitis virus. **Virology** 192: 710–716.1993.

WANG, L.; JUNKER, D.; HOCK, L.; EBIARY, E.; COLLISSON, E. W. Evolutionary implications of genetic variations in the S1 gene of infectious bronchitis virus. **Virus Res.** 34:327–338. 1994.

WANG, C.H.; HUANG, Y. C. Relationship between serotypes and genotypes based on the hypervariable region of the S1 gene of infectious bronchitis virus. **Arch. Virol.** 145: 291–300. 2000.

WANG, Y.F., SUN, Y.K., TIAN, Z.C., SHI, X.M., TONG, G.Z., LIU, S.W., ZHI, H.D., KONG, X.G., WANG, M. Protection of chickens against infectious bronchitis by a recombinant fowlpox virus co-expressing IBV-S1 and chicken IFN gamma. **Vaccine**, 27:7046–7052. 2009.

WAREING, M.D., TANNOCK, G.A. Live attenuated vaccines against influenza; an historical review. **Vaccine** 19, 3320–3330. 2001.

WILLIAMS, A. K.; WANG, L.; SNEED, L.W.; COLLISSON, E.W. Comparative analyses of the nucleocapsid genes of several strains of infectious bronchitis virus and other coronaviruses. **Virus Res.** 25 (3), 213-222. 1992.

WU, Q.; MORAES, M. P.; GRUBMAN, M. J. Recombinant adenovirus co-expressing capsid proteins of two serotypes of foot-and- mouth disease virus (FMDV): in vitro characterization and induction of neutralizing antibodies against FMDV in swine. **Virus Res.** 93: 211-219. 2003.

YACHIDA, S.; AOYAMA, S.; SAWAGUCHI, K.; TAKAHASHI, N.; IRITANI, Y.; HAYASHI, Y. Relationship between several criteria of challenge-immunity and humoral immunity in chickens vaccinated with avian infectious bronchitis vaccines. **Avian Pathology**, 14: 199-211. 1985.

YAN, F.; ZHAO, Y.; HU, Y.; QIU, J.; LEI, W.; JI, W.; LI, X.; WU, Q.; SHI, X.; LI, Z. Protection of chickens against infectious bronchitis virus with a multivalent DNA vaccine and boosting with an inactivated vaccine. **J. Vet. Sci.** 14 (1), 53-60. 2013.

YANG, Z.Y., KONG, W.P., HUANG, Y. A DNA vaccine induces SARS coronavirus neutralization and protective immunity in mice. **Nature** 428, 561–564. 2004.

ZHANG, X., WU, Y., HUANG, Y., LIU, X. Protection conferred by a recombinant Marek's disease virus that expresses the spike protein from infectious bronchitis virus in specific pathogen-free chicken. **Virology Journal**, 9:85. 2012.

ZESHAN, B.; ZHANG, L.; BAI, J.; WANG, X.; XU, J.; JIANG, P. Immunogenicity and protective efficacy of a replication-defective infectious bronchitis virus vaccine using an adenovirus vector and administered in ovo. **Journal of Virological Methods** 166: 54–59. 2010.

ZESHAN, B.; MUSHTAQ, M. H.; WANG, X.; LI, W.; JIANG, P. Protective immune responses induced by in ovo immunization with recombinant adenoviruses expressing spike (S1) glycoprotein of infectious bronchitis virus fused/co-administered with granulocyte-macrophage colony stimulating factor. **Vet Mic** 148: 8–17. 2011.