



ANÁLISE FILODINÂMICA DO VÍRUS DA BRONquite INFECCIOSA DAS GALINHAS NO BRASIL

Cleiton Schneider Pereira¹
Aline Padilha de Fraga²
Tiago Gräf²
Nilo Ikuta²
Vagner Ricardo Lunge²

Resumo

O vírus da bronquite infecciosa (VBI) é o agente etiológico de uma doença altamente contagiosa, que resulta em grandes perdas econômicas na avicultura brasileira e mundial. A proteína da espícula do VBI, que contém as subunidades S1 e S2, é a principal responsável pela diversidade viral, com a ocorrência de muitos sorotipos/genótipos nas diferentes regiões geográficas de produção avícola no mundo. Recentemente a classificação do VBI foi padronizada em um estudo filogenético utilizando o gene da subunidade S1 com sequências do mundo inteiro. O presente estudo teve como objetivo revisar a diversidade molecular e a história evolutiva do VBI no Brasil. Todas as sequências do gene S1 do VBI com informações de local e ano de coleta do GenBank foram obtidas. Análises filogenéticas baseadas no método de máxima verossimilhança foram realizadas para classificação dos genótipos do Brasil. Depois análises Bayesianas foram realizadas com sequências do clado brasileiro (sendo incluídas sequências geneticamente próximas de outros locais do mundo) para determinar a história evolutiva do vírus no Brasil. Um total de 143 sequências brasileiras foi classificado como grupo sul-americano (GI-11) e 46 como genótipo vacinal Mass (GI-1). Análises filodinâmicas possibilitaram inferir que o VBI foi introduzido no Brasil no início da década de 1950 (1951, 1917-1975 95% HPD), de acordo com a primeira descrição da doença no país em 1957. A análise de dinâmica populacional demonstrou aumentos nos tamanhos das populações efetivas (N_e) na década de 1980 nas décadas de 1990 e 2010.

Palavras chave: avicultura; dinâmica populacional; análise Bayesiana; coronavírus

INTRODUÇÃO

O Brasil é o segundo maior produtor e o principal exportador de galinhas (*Gallus gallus*) do mundo. Os lotes de aves são criados em sistemas intensivos, favorecendo a disseminação de infecções respiratórias, como a bronquite infecciosa das galinhas. O agente desta doença é o vírus da bronquite infecciosa (VBI) que pertence à família Coronaviridae e está amplamente disseminado no Brasil (COLVERO et al., 2015).

O genoma do VBI é de RNA fita-simples com 27,6 Kb e que codifica quatro proteínas estruturais: nucleocapsídeo (N), proteína da membrana (M), envelope (E) e espícula

1 Aluno do curso de graduação de Medicina Veterinária – Bolsista PROBIC/Fapergs – cleitonspereira.com

2 Laboratório de Diagnóstico Molecular ULBRA – vagner.lunge@gmail.com

(S) (JACKWOOD, 2012). A proteína S é clivada em duas subunidades: S1 e S2. Especificamente S1 é importante na adsorção ao receptor celular e entrada do vírus na célula hospedeira, além de induzir a formação de anticorpos neutralizantes. O gene S1 é altamente variável nas diferentes cepas, possuindo relação com a diversidade de tipos antigênicos (CAVANAGH, 2007). Esta diversidade foi demonstrada em diferentes regiões avícolas do mundo com a demonstração de diferentes sorotipos. Massachusetts (Mass) e Connecticut (Conn) foram os primeiros a serem isolados nos Estados Unidos nas décadas de 1940 e 1950. Desde então, outras variantes do VBI foram identificadas e associadas à doença no mundo inteiro (DE WIT et al., 2011). Especificamente no Brasil, a ocorrência de vários tipos antigênicos (Mass, Conn e variantes locais) foi descrita a partir dos anos 90, com destaque para uma ampla disseminação de variantes locais denominadas de genótipo BR (CHACÓN et al., 2011; FRAGA et al., 2013; VILLARREAL et al., 2010). Cepas similares também circulavam na Argentina e no Uruguai, portanto este grupo genético foi também denominado Sul Americano I ou SAI (MARANDINO et al., 2015).

A identificação dos sorotipos/genótipos foi realizada sem critérios bem definidos quanto à nomenclatura e procedimento de análise por muito tempo. Como consequência, grupos de VBI relacionados foram classificados como sorotipos/genótipos diferentes e vice-versa. Recentemente, um sistema de classificação mais robusto foi definido. O método divide o VBI em 32 linhagens genéticas agrupadas em seis genótipos principais (VALASTRO et al., 2016). O presente estudo teve como objetivo revisar a diversidade molecular do VBI com foco nas variantes sul-americanas e realizar análises filodinâmicas para determinar o estabelecimento e a histórica demográfica da epidemia de BI no Brasil e na América do Sul.

METODOLOGIA

As sequências brasileiras do gene S1 do VBI foram obtidas no GenBank e alinhadas com o *dataset* de referência (VALASTRO et al., 2016) utilizando o programa Mafft e inspeção visual no AliView. Sequências idênticas foram removidas e árvores de máxima verossimilhança (MV) foram construídas com o programa RAxML. O modelo geral reversível no tempo (GTR) com taxa de heterogeneidade de distribuição gama mais proporção de sítios invariáveis (GTR+G+I) foi escolhido e após análises de recombinação foram realizadas pelo programa Simplot. Árvores de aproximação de vizinhos foram construídas pelo modelo de dois parâmetros de Kimura. Regiões do gene S1 que mostraram padrões de recombinação foram sujeitas a pesquisa no BLAST numa tentativa de identificar a fonte dos fragmentos de potencial recombinação. O sinal temporal das sequências foi investigado com o programa TempEst. A árvore filogenética de tempo em escala foi reconstruída usando o programa BEAST/BEAGLE.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Um total de 192 sequências brasileiras do gene S1 foi obtido para as análises filogenéticas. A reconstrução da árvore de MV classificou 143 (74,5%) sequências brasileiras como linhagem GI-11, 46 (24%) como GI-1 (Mass), 2 (1%) como GI-13 (793B) e 1 (0,5%) como GI-9 (Arkansas). Após uma árvore foi construída com 199 sequências de referência e 1435 sequências do mundo todo. O clado GI-11 foi composto por sequências brasileiras, argentinas e uruguaias. Análises de recombinação foram feitas para todas 101 sequências classificadas na linhagem GI-11 e determinaram que seis sequências argentinas (sub-grupo 1) apresentaram recombinações. Adicionalmente, observou-se um padrão distinto em um outro sub-grupo (2) de isolados de VBI do estado do Mato Grosso (MT), Brasil.

As análises filodinâmicas das sequências da linhagem GI-11 “pura” estimaram o estabelecimento do grupo como um todo em 1951 (1917-1975, 95% HPD). A taxa média de evolução do fragmento do gene S1 analisado foi de $4,1 \times 10^{-3}$ substituições/sítio/ano ($2,3 \times 10^{-3}$

$3-6,1 \times 10^{-3}$, 95% HPD). Os dados também demonstraram que o tamanho da população efetiva (N_e) apresentou poucas variações desde a introdução do VBI no Brasil na década de 1950. Mas observa-se um aumento no N_e até o início dos anos 1980, com uma subsequente estabilização. A origem dos outros dois sub-*clusters* foi estimada pela reinserção dos dados no alinhamento da linhagem GI-11 “pura” e pela construção de árvores de escala temporal pelo BEAST com a data estimada da origem do VBI GI-11 como raiz. A origem do sub-grupo 2 foi estabelecida em 1994 (1981-2005, 95% HPD) e do sub-grupo 1 em 1993 (1984-1999, 95% HPD).

Desde o primeiro isolamento do VBI no Brasil em 1957, os estudos têm demonstrado o aumento majoritário do genótipo local em comparação com o genótipo vacinal Mass; essas variantes virais foram reportadas em todas as regiões de produção avícola do país e em alguns países vizinhos (FELIPPE et al., 2010; FRAGA et al., 2013; VILLARREAL et al., 2007). As variantes brasileiras são significativamente diferentes das cepas Mass, apresentando uma baixa similaridade de nucleotídeos e aminoácidos (FRAGA et al., 2013). A linhagem GI-1, com 46 sequências (24%), corresponde à Mass. Até 1989 a maioria dos isolados brasileiros pertencia a esse sorotipo (MENDONÇA et al., 2009); essa frequência pode ser observada provavelmente pela disseminação viral relacionada às práticas de vacinação com o sorotipo Mass, como inferiram BALESTRIN et al. (2014).

A linhagem GI-11 compreendeu a maioria das sequências brasileiras (74,5%). DI FÁBIO et al. (2000) reportaram pela primeira vez a ocorrência de cepas pertencentes a grupos antigênicos diferentes do Mass no Brasil. Estudos posteriores (VILLARREAL et al., 2007; MONTASSIER et al., 2008) mostraram a prevalências de cepas de campo locais em relação ao genótipo Mass. Uma caracterização filogenética consistente dos genótipos das cepas locais foi realizada somente em estudos mais recentes (VILLARREAL et al., 2010; CHACÓN et al., 2011; FRAGA et al., 2013; MARANDINO et al., 2015; VALASTRO et al., 2016).

Os resultados estimaram a introdução do VBI no Brasil na década de 1950. Isso pode ser explicado pelo início dos sistemas de criação de aves industriais intensivos no Brasil na mesma década. A análise demográfica mostrou um aumento na população do VBI desde a sua introdução até os anos 1980, quando passa a ficar estável; isso pode estar relacionado à introdução oficial das vacinas contra o vírus em 1979 (MONTASSIER et al., 2008).

CONCLUSÕES OU CONSIDERAÇÕES FINAIS

A BI é uma doença importante no Brasil por ser endêmica e causar prejuízos econômicos. Os dados desse estudo sugerem a entrada do vírus no país em 1950 e sua permanência até os dias atuais. Esses dados contribuem para um melhor entendimento da epidemiologia do agente e da doença no Brasil.

REFERÊNCIAS

BALESTRIN, E.; FRAGA, A. P.; IKUTA, N.; CANAL, C. W.; FONSECA, A. S.; LUNGE, V. R. Infectious bronchitis virus in different avian physiological systems: a field study in Brazilian poultry flocks. **Poultry Science**, Oxford, v. 93, n. 8, p. 1922-1929, jul. 2014.

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

CHACÓN, J. L.; RODRIGUES, J. N.; ASSAYAG JR., 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**, Cambridgeshire, v. 40, n. 2, p. 153-162, abr. 2011.

COLVERO, L. P.; VILLARREAL, L. Y. B.; TORRES, C. A.; BRANDÃO, P. E. Assessing the economic burden of avian infectious bronchitis on poultry farms in Brazil. **Scientific and**

Technical Review of the Office International des Epizooties, Paris, v. 34, n. 1911, p. 1-14, dez. 2015.

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

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

FELIPPE, P. A. N.; SILVA, L. H. A.; SANTOS, M. M. A. B.; SPILKI, F. R.; ARNS, C. W. Genetic Diversity of Avian Infectious Bronchitis Virus Isolated from Domestic Chicken Flocks and Coronaviruses from Feral Pigeons in Brazil Between 2003 and 2009. **Avian Diseases**, Jacksonville, v. 5, n. 4, p. e11-e12, dez. 2010.

FRAGA, A. P.; BALESTRIN, E.; IKUTA, N.; FONSECA, A. S.; SPILKI F. R.; CANAL, C. W.; LUNGE, V. R. Emergence of a new genotype of avian infectious bronchitis virus in Brazil. **Avian Diseases**, Jacksonville, v. 57, n. 2, p. 225-232, jun. 2013.

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

MARANDINO, A.; PEREDA, A.; TOMÁS, G.; HERNÁNDEZ, M.; IRAOLA, G.; CRAIG, M. I.; HERNÁNDEZ, D.; BANDA, A.; VILLEGAS, P.; PANZERA, Y.; PÉREZ, R. Phylodynamic analysis of avian infectious bronchitis virus in South America. **Journal of General Virology**, Londres v. 96, n. 6, p. 1340-1346, fev. 2015.

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

MONTASSIER, M. D. F. S.; BRENTANO, L.; MONTASSIER, H. J.; RICHTZENHAIN, L. J. Genetic grouping of avian infectious bronchitis virus isolated in Brazil based on RT-PCR/RFLP analysis of the S1 gene. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 28, n. 3, p. 190-194, mar. 2008.

VALASTRO, V.; HOLMES, E. C.; BRITTON, P.; FUSARO, A.; JACKWOOD, M. W.; CATTOLI, G.; MONNE, I. S1 gene-based phylogeny of infectious bronchitis virus: An attempt to harmonize virus classification. **Infection, Genetics and Evolution**, Amsterdão, v. 39, p. 349-364, fev. 2016.

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**, Jacksonville, v. 51, n. 4, p. 974-978, dez. 2007.

VILLARREAL, L. Y. B.; SANDRI, T. L.; SOUZA, S. P.; RICHTZENHAIN, L. J.; DE WIT, J. J.; BRANDÃO, P. E. Molecular epidemiology of avian infectious bronchitis in Brazil from 2007 to 2008 in breeders, broilers, and layers. **Avian Diseases**, Jacksonville, v. 54, n. 2, p. 894-898, jun. 2010.