

Uso das técnicas de RT-PCR e elisa no diagnóstico da bronquite infecciosa em frangos de corte ao abate*

Davi de Oliveira Almeida¹, Rogerio Tortely², Elmiro Rosendo do Nascimento³⁺, Mazhar Khan⁴, Virginia Léo de Almeida Pereira⁵ e Sankhiros Babapoor⁶

ABSTRACT. Almeida D.O., Tortely R., Nascimento E.R., Khan M., Pereira V.L.A & Babapoor S. [Use of RT-PCR and elisa techniques for the diagnostic of infectious bronchitis virus in broilers at slaughter.] Uso das técnicas de RT-PCR e elisa no diagnóstico da bronquite infecciosa em frangos de corte ao abate. *Revista Brasileira de Medicina Veterinária*, 37(1):55-59, 2015. Departamento de Saúde Coletiva Veterinária e Saúde Pública, Universidade Federal Fluminense, Rua Vital Brazil Filho, 64, Santa Rosa, Niterói, RJ 24230-340, Brasil. E-mail: elmiro@vm.uff.br

Avian infectious bronchitis (IB) is a viral, acute and highly contagious disease caused by infectious bronchitis virus (IBV). The disease affects broilers improvement and performance causing major economic losses in the world poultry industry. Generally, IBV infections can be diagnosed by detection of IBV itself or the specific antibody response. This study aimed to detect IBV in broilers under Sanitary Inspection by RT-PCR and ELISA, comparing the results and relating them with the average weight of the flock. Samples were collected from 40 vaccinated broiler flocks under Sanitary Inspection at slaughter. Ten birds from every flock were randomly selected and blood samples were collected for ELISA as well three birds had their trachea and caecal tonsils collected for RT-PCR test. From 40 flocks, 30 were IBV positive by ELISA and 26 by RT-PCR, in which 15 were detected simultaneously in trachea and caecal tonsil and 5 in each sample. There was no agreement between ELISA and RT-PCR results regarding IBV diagnosis as well positivity in both tests was not statistically significant with the average weight of the flock. There was an improvement on IBV diagnosis when caecal tonsils and tracheas were used instead of just one of them. Considering the only vaccine serotype allowed by Brazilian government is the Mass serotype and its persistence in broilers would only be detected up to 28 days, possibly the studied broilers were challenge with a field strain.

KEY WORDS. Infectious bronchitis, RT-PCR, ELISA, broilers.

RESUMO. A bronquite infecciosa das galinhas (BI) é uma doença viral, aguda e altamente contagiosa causada pelo vírus da bronquite infecciosa (VBI). A

doença afeta os índices zootécnicos dos frangos de corte, o que gera grandes perdas econômicas na indústria avícola mundial. Em geral, as infecções pelo

* Recebido em 12 de janeiro de 2013.

Aceito para publicação em 6 de março de 2014.

¹ Médico-veterinário, DSc, Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Universidade Federal Fluminense (UFF), Rua Vital Brazil Filho, 64, Santa Rosa, Niterói, RJ 24230-340, Brasil. E-mail: davibber@yahoo.com.br

² Médico-veterinário, DSc, Departamento de Clínica Veterinária, UFF, Rua Vital Brazil Filho, 64, Santa Rosa, Niterói, RJ 24230-340.

³ Médico-veterinário, PhD, Departamento de Saúde Coletiva Veterinária e Saúde Pública, UFF, Rua Vital Brazil Filho, 64, Santa Rosa, Niterói, RJ 24230-340. * Autor para correspondência, E-mail: elmiro@vm.uff.br

⁴ Médico-veterinário, PhD, Department of Pathobiology and Veterinary Science, University of Connecticut (UConn), 61 North Eagleville Road, Unit-3089, Storrs, CT, USA. E-mail: mazhar.khan@uconn.edu

⁵ Médica-veterinária, DSc, Departamento de Saúde Coletiva Veterinária e Saúde Pública, UFF, Rua Vital Brazil Filho, 64, Santa Rosa, Niterói, RJ 24230-340. E-mail: virginialeo@vm.uff.br

⁶ Médico-veterinário, DSc, Department of Pathobiology and Veterinary Science, University of Connecticut (UConn), 61 North Eagleville Road, Unit-3089, Storrs, CT, USA. E-mail: s.babapoor@uconn.edu

VBI podem ser diagnosticadas pela detecção do vírus e pela resposta de anticorpos específicos. O presente trabalho teve como objetivo detectar o VBI em frangos de corte ao abate pela realização da RT-PCR e de anticorpos anti-VBI ao ELISA, comparando os resultados e relacionando-os com o peso médio dos lotes. Foram coletadas amostras de um total de 40 lotes de frangos de corte vacinados ao primeiro dia de idade em abatedouro sob Inspeção Sanitária Federal. De cada lote, 10 aves foram selecionadas para coleta de sangue para realização do ELISA e três para necropsia em que coletou-se traqueia e tonsilas cecais para a RT-PCR. Dos 40 lotes estudados, 30 foram considerados positivos (75%) para BI ao ELISA e 25 (62,5%) na RT-PCR, sendo 15 positivos detectados na traqueia e tonsilas cecais e cinco em cada um dos espécimes. Não houve concordância entre os resultados de ELISA e RT-PCR no diagnóstico da BI, assim como a relação da positividade ao ELISA e na RT-PCR com o peso médio dos frangos não foi estatisticamente significativa. Houve um incremento no diagnóstico quando se utilizou simultaneamente espécimes da tonsila cecal e traqueia ao invés de somente um deles. Possivelmente os frangos ao abate foram desafiados por uma cepa de campo considerando que a cepa vacinal utilizada no Brasil (Mass) só seria detectada até os 28 dias.

PALAVRAS-CHAVE. Bronquite infecciosa, RT-PCR, ELISA, frangos de corte.

INTRODUÇÃO

A bronquite infecciosa das galinhas (BI) é uma doença viral, aguda e altamente contagiosa causada pelo vírus da bronquite infecciosa (VBI). A BI é caracterizada por doença respiratória, nefrite, queda na produção e qualidade dos ovos nas poedeiras e dos índices zootécnicos em frangos de corte, o que gera grandes perdas econômicas na indústria avícola mundial (De Wit 2000).

As aves acometidas pela BI tornam-se mais predispostas às infecções secundárias. O VBI se replica primariamente no sistema respiratório, seguido por viremia em diversos locais, como sistema reprodutivo, urinário e digestivo (Dhinakar Raj & Jones 1997).

O VBI pertence ao grupo III do gênero coronavirus da família Coronaviridae, seu genoma é composto por um RNA de fita simples não segmentado com 27.6 Kb de comprimento que codifica quatro proteínas estruturais: glicoproteína de espícula (S), glicoproteína de membrana (M), nucleocapsídeo (N) e proteína do envelope (E) (Cavanagh & Naqui 2003, Cavanagh 2007).

Há uma divisão sobre a ocorrência de patótipos do VBI no Brasil. Patótipos respiratórios tem maior prevalência na região norte e nordeste do país; patótipos renais e entéricos são evidentes com maior frequência de ocorrência na região sudeste do país e patótipos reprodutivos com maior representatividade na região sul do Brasil (Villareal 2008).

Em geral, as infecções pelo VBI podem ser diagnosticadas pela detecção do vírus, ou parte deste, e pela resposta de anticorpos específicos. As infecções são detectadas sorologicamente pelo surgimento ou aumento nos títulos de anticorpos VBI específicos. Geralmente, para se correlacionar um problema clínico com a infecção pelo VBI, a sorologia pareada é necessária. Testes comumente usados são a inibição da hemaglutinação (HI), precipitação em agar gel e ELISA. (De Wit 2000).

Embora mais rápidos e simples que o isolamento viral, alguns imunoenaios pecam pela falta de sensibilidade e especificidade, e nenhum deles detecta todos os tipos do VBI. O ELISA indireto utilizando antígenos para o VBI é realizado em todo mundo para conferir o nível de anticorpos VBI específicos. Apesar de não ser específico, pois a maioria das provas existentes no mercado são genéricas para o VBI, não identificando sorotipos ou variantes e a grande parte mede os títulos da imunoglobulina G (IgG), tem grande valor para monitoramento da resposta vacinal em situações de campo (Monreal et al. 1985, De Wit 2000). Diversos kits comerciais de ELISA estão disponíveis comercialmente e estes são baseados em diferentes estratégias para a detecção dos anticorpos. (OIE 2008, Di Fabio & Villareal 2009).

Para a detecção do VBI baseada na evidênciação do RNA viral específico, a técnica de RT-PCR teve sua utilização aumentada nos últimos anos em função da sua especificidade e sensibilidade para o diagnóstico e a possibilidade de tipificação das amostras (Di Fabio & Villareal 2009).

A doença pode ser controlada através da vacinação dos lotes, entretanto, surtos continuarão ocorrendo devido a falta de proteção cruzada contra variantes e sorotipos do vírus não relacionados antigenicamente. Um diagnóstico rápido e acurado do sorotipo envolvido no surto é necessário para traçar a melhor estratégia de vacinação, evitando-se assim perdas econômicas de maior magnitude (Cavanagh 2003).

O presente trabalho teve como objetivo, detectar o VBI em frangos de corte ao abate pela realização da RT-PCR e do ELISA, comparando os resultados e relacionando-os com o peso médio dos lotes.

MATERIAL E MÉTODOS

Coleta das amostras

Foram coletadas amostras de um total de 40 lotes de frangos de corte vacinados no primeiro dia de idade, em abatedouro sob Inspeção Sanitária Federal localizado no estado de Santa Catarina. Dados referentes ao peso médio e número de aves por lote também foram coletados. De cada lote, 10 aves foram selecionadas aleatoriamente para coleta de sangue para realização do ELISA. As amostras de sangue foram coletadas por punção na veia braquial com agulhas e seringas descartáveis, em volume aproximado de 3 mL. Após obtenção, o soro foi congelado e enviado para análise. Ainda foram selecionadas três aves por lote para necropsia em que se coletou traqueia e tonsilas cecais para a RT-PCR. Os órgãos coletados foram imediatamente acondicionados, individualmente, em recipiente isotérmico e mantidos congelados até o processamento em laboratório.

ELISA

As amostras de soros coletadas foram diluídas em proporção 1:500 com diluente de amostra e testadas para a presença de anticorpo anti VBI utilizando o kit comercial FlockChek® (IDEXX Laboratories) para Bronquite Infecciosa, seguindo as orientações do fabricante. Foram considerados positivos soros com coeficiente de absorvância (S/P) $\geq 0,2$.

Extração Viral

Sob condições ideais, foi feito um suabe traqueal de três amostras do mesmo lote, formando um *pool* de três traqueias por lote. Estas amostras foram acondicionadas em solução de PBS pH 7,2. As tonsilas cecais foram maceradas em "pool de três", com graal e pistilo utilizando Trizol® Reagent (Invitrogen), e uma alíquota foi separada para nova maceração e posterior extração viral, enquanto as amostras originais foram estocadas em freezer -20°C.

O RNA viral foi extraído do volume de 300 μ L de amostra (*pool* de traqueia ou de tonsila cecal), utilizando Trizol® Reagent (Invitrogen), seguindo o protocolo do fabricante. Resumidamente, o RNA da fase aquosa foi precipitado pela adição de isopropanol e o *pellet* foi formado pela centrifugação a 13.000 rpm a 6°C por 20 minutos. A amostra foi secada por 5-10 min, ressuspensa em 25 μ L de água livre de Rnase e estocada em freezer -20°C até o momento do uso.

RT-PCR

Os oligonucleotídeos utilizados para detectar o VBI foram IBV5GL533 *reverse* 5' GCCATGTTGTCAGTCTCTATT 3' e IBV5GU391 *forward* 5' GCTTTTGAGCC-TAGCGTT 3' que codificam um fragmento de 143 pb da região 5'UTR (região não traduzida) dos coronavírus aviários (Callison et al. 2006).

Para a RT-PCR foi utilizado o kit AccessQuick™ RT-PCR System (Promega) de acordo com as instruções do fabricante. Em 50 μ L de reação, foram adicionados 25 μ L de 2x AccessQuick™ Master Mix, 20 pmol dos primers forward e reverse, 3 μ L da amostra, 1 μ L da enzima AMV (5 unidades) e água livre de RNases até completar o volume de 50 μ L.

O ciclo da RT-PCR foi conduzido nas seguintes temperaturas e tempos: uma etapa de transcrição reversa a 40°C por 50 min e a PCR com uma desnaturação inicial a 95°C por 2 min, 35 ciclos de desnaturação a 95°C por 1 min, anelamento a 55°C por 1min e extensão por 72°C por 30 seg. A extensão final a 72°C por 5 min e o resfriamento a 4°C concluíram o ciclo.

A presença do produto da PCR foi obtida através da eletroforese em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídeo, observado sob transiluminador UV.

Análise estatística

As comparações e associações entre os parâmetros estudados foram realizadas pelos testes estatísticos de regressão logística e linear simples, Qui-quadrado de Fisher e concordância por Kappa, todos com base em intervalo de confiança de 95% (Trthusfield 2003).

RESULTADOS

ELISA

Dos 40 lotes estudados, 30 foram considerados positivos (75%) para a BI (Coeficiente de absorvância S/P $\geq 0,2$) (Figura 1).

RT-PCR

Independente da amostra utilizada na análise, traqueia ou tonsila cecal, foi observado o fragmento amplificado de 143pb (Figura 2) em 25 lotes estudados (62,5%), 15 positivos detectados na traqueia e tonsilas cecais e cinco de cada um dos espécimes, totalizando 25 positivos. Foi possível detectar o VBI em 50% de cada tipo de amostra analisada. Pelo Qui-quadrado exato de Fisher, houve um incremento no diagnóstico quando se utilizou simultaneamente espécimes da tonsila cecal e traqueia ao invés de somente um deles (Tabela 1).

A concordância observada entre os métodos de RT-PCR e ELISA foi 50%, considerada fraca sendo a associação entre ambos não significativa (Tabela 2), A co-positividade (45%) e a co-negatividade (7,5%) para os dois testes foi obtida.

A relação entre a positividade para a BI ao ELISA e pela RT-PCR e o peso médio dos lotes, por

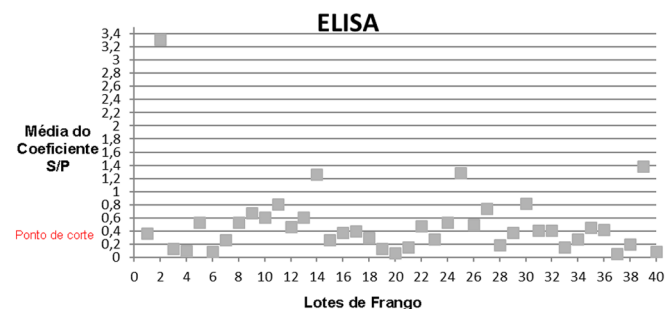


Figura 1. Dispersão por média do coeficiente S/P ao ELISA nos 40 lotes de frango de corte investigados ao abate.

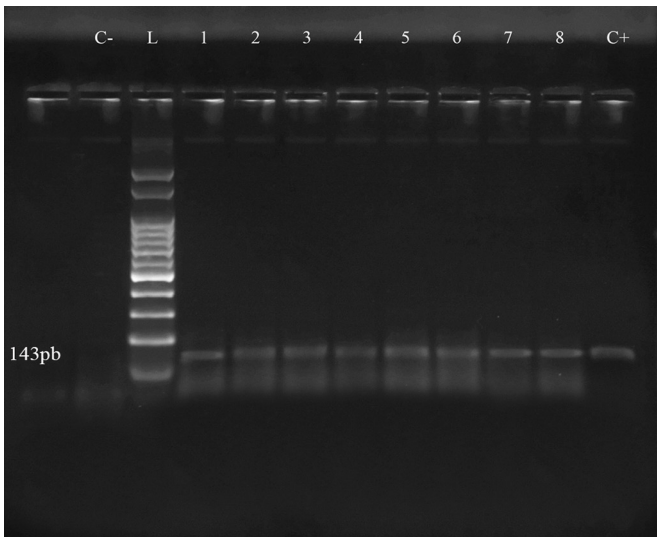


Figura 2. Amostras positivas na RT-PCR. Sendo: L= Ladder 100pb, 1-8= amostras, C+= controle positivo e C-= controle negativo.

Tabela 1. Positividade do vírus da bronquite infecciosa (VBI) de acordo com a amostra utilizada na RT-PCR em lotes de frango sob Inspeção Sanitária.*

Amostra utilizada		Tonsilas		
		positivos	negativos	total
Traqueia	positivos	15	5	20
	negativos	5	15	20
	total	20	20	40

* χ^2 (p<0,05).

Tabela 2. Concordância entre o ELISA e a RT-PCR no diagnóstico da BI em lotes de frango de corte ao abate sob Inspeção Sanitária.*

Método		RT-PCR		
		Positivo	Negativo	total
ELISA	Positivo	18	12	30
	Negativo	7	3	10
	total	25	15	40

*Kappa = -0,176 (p>0,05).

Tabela 3. Faixa de peso e positividade ao ELISA e na RT-PCR em frangos de corte sob Inspeção Sanitária.*

Faixa de Peso	ELISA		RT-PCR	
	Positivos	Negativos	Positivos	Negativos
Lotes igual ou superior a média ^a	12	5	10	8
Lotes abaixo da média ^a	18	5	15	7
Total	30	10	25	15

^a Média do peso = 2,89 Kg.

* χ^2 (p>0,05).

análise de regressão e Qui-quadrado, não foi significativa (Tabela 3 e 4).

DISCUSSÃO

Embora a BI não seja considerada uma doença de importância para a Saúde Coletiva, o seu signifi-

Tabela 4. Número total de aves e peso médio por lote versus positividade no ELISA e na RT-PCR.

Lotes (L)	No total de aves	Peso médio (Kg) ^a	Coefficiente S/P médio ^{a,b,c}	RT-PCR ^b
L1	8.456	3,1	0,362	POS.
L2	8.434	2,95	3,309	POS.
L3	11.656	3,11	0,129	POS.
L4	11.112	3,26	0,098	POS.
L5	11.465	3,16	0,535	POS.
L6	11.456	3,23	0,082	POS.
L7	11.196	3,1	0,261	NEG.
L8	11.568	3,02	0,536	POS.
L9	14.535	2,97	0,674	NEG.
L10	9.568	2,73	0,605	NEG.
L11	6.366	2,77	0,804	POS.
L12	12.536	2,95	0,461	NEG.
L13	11.662	3,04	0,612	NEG.
L14	11.688	3,04	1,257	NEG.
L15	11.520	3,09	0,264	POS.
L16	13.800	2,82	0,378	NEG.
L17	11.661	2,58	0,393	NEG.
L18	9.221	2,76	0,302	POS.
L19	11.112	2,94	0,132	NEG.
L20	5.774	2,64	0,061	NEG.
L21	13.749	2,96	0,158	NEG.
L22	11.579	2,76	0,478	POS.
L23	14.068	2,85	0,279	NEG.
L24	11.577	2,9	0,536	POS.
L25	5.696	2,84	1,279	POS.
L26	11.368	2,87	0,494	NEG.
L27	11.676	2,78	0,742	POS.
L28	11.552	2,74	0,183	POS.
L29	11.392	2,95	0,376	POS.
L30	5.728	2,88	0,817	POS.
L31	14.507	2,77	0,408	NEG.
L32	5.728	2,89	0,409	NEG.
L33	5.792	2,81	0,158	POS.
L34	11.598	2,75	0,270	POS.
L35	11.480	2,83	0,450	POS.
L36	14.328	2,79	0,420	POS.
L37	8.584	2,6	0,052	POS.
L38	11.504	2,83	0,202	POS.
L39	11.634	2,81	1,380	POS.
L40	11.560	2,86	0,088	POS.

^a Regressão linear simples.

^b Regressão logística simples.

^c Positividade ao ELISA = Coeficiente de absorvância S/P $\geq 0,2$.

ficado econômico para a indústria avícola é muito grande e a enfermidade encontra-se na lista da OIE de enfermidades com notificação obrigatória por ser facilmente transmissível e pelos prejuízos que provoca (OIE 2008).

No presente estudo o peso médio de todos lotes foi considerado excelente, sendo de 2,89 Kg o peso médio por ave, com uma variação de 2,58 Kg a 3,26 Kg. O baixo peso nas aves de produção acarreta prejuízos econômicos, já que a lucratividade é baseada no ganho de peso e na conversão alimentar. Segundo Cavanagh (2007), infecções pelo VBI podem resultar em baixa eficiência alimentar e retardo no crescimento.

Nesta pesquisa não houve associação significativa entre a positividade da BI por ELISA e o peso

dos lotes de frango de corte ao abate. No entanto, resultados obtidos por Barreto (2008), em frangos de corte não vacinados ao abate no estado do RJ, associaram a positividade da BI pelo ELISA ao baixo peso dos frangos, com um risco 2,64 vezes maior das aves positivas apresentarem peso baixo, contudo o desempenho dos frangos deste estudo foi inferior, inclusive com frangos pesando somente 1 Kg. O ELISA tem sido considerado por vários autores como o método de escolha, tanto para monitorar aves quanto a resposta vacinal e infecção (Monreal et al. 1985, De Wit et al. 1997, De Wit 2000).

Neste estudo, a positividade para a BI no ELISA foi de 75%, maior que a de 62,5% obtida na RT-PCR. Tais resultados se assemelham aos de Jackwood et al. (2009) que realizaram diferentes experimentos para avaliar o desempenho de diferentes vacinas. Num dos experimentos, foi encontrada na saída para o abate, a positividade de 75% ao ELISA e de 45% no Real-Time RT-PCR em frangos vacinados contra a BI, ressaltando que o único sorotipo vacinal detectado ao abate foi o Arkansas. Alvarado et al. (2006), observaram que o sorotipo vacinal Massachusetts foi detectado até 28 dias após a vacinação realizada no primeiro dia de idade. Levando em consideração que o único sorotipo permitido para vacinação contra BI no Brasil é o sorotipo Mass, as afirmações realizadas por Alvarado et al. (2006) e Jackwood et al. (2009) sustentam a hipótese de que os frangos do presente estudo sofreram desafio com um VBI de campo e por isso apresentaram altos títulos ao ELISA e positividade pela RT-PCR no momento do abate.

Um fator importante a ser considerado é que os frangos foram vacinados, o que não evita a infecção pelo VBI, porém minimiza os prejuízos decorrentes da manifestação clínica da doença, justificando os resultados de positividade ao ELISA e na RT-PCR, sem relação com o peso dos lotes estudados.

Foi encontrada maior positividade para BI na RT-PCR quando utilizadas tonsilas cecais e traqueias, em detrimento de somente um dos órgãos, o que reforça a recomendação de que uso de amostras de diferentes tecidos amplia as chances de diagnóstico. Dhinakar Raj & Jones (1997) e De Wit (2000) citaram que há uma maior persistência viral nas tonsilas quando comparada à traqueia. No entanto, De Wit (2000) relata que o VBI pode ser isolado a partir de traqueia, tonsilas cecais, tecido renal entre outros muitos órgãos, mas o sucesso na detecção do VBI é influenciado por vários fatores, incluindo o tempo entre o início da infecção e a coleta das amostras, escolha e qualidade dos órgãos e o nível de imunidade da ave no momento da infecção.

CONCLUSÃO

Não houve concordância entre os resultados de ELISA e RT-PCR no diagnóstico da BI.

Nesta pesquisa não houve relação da positividade ao ELISA e na RT-PCR com o peso médio dos frangos.

A frequência de positivos ao ELISA foi maior que na RT-PCR.

Os frangos ao abate (idade média de 42 dias) possivelmente foram desafiados por uma cepa de campo considerando que as cepas vacinais só seriam detectadas até os 28 dias.

REFERÊNCIAS

- Alvarado I.R., Villegas P., El-Attrache J. & Jackwood M.W. Detection of Massachusetts and Arkansas serotypes of infectious bronchitis virus in broilers. *Avian Diseases*, 50:292-297, 2006.
- Barreto M.L. Inspeção e Diagnóstico Laboratorial em Contraste ao Peso de Frangos de Corte ao Abate. Universidade Federal Fluminense. Niterói, 2008. 68p. (Disponível em: http://www.uff.br/higiene_veterinaria/teses_doutorado.htm).
- Callison S.A., Hilt D.A., Boyton T.O., Sample B.F., Robison R., Swayne D.E. & Jackwood M.W. Development and evaluation of a real-time Taqman RT-PCR assay for the detection of infectious bronchitis virus from infected chickens. *J. Virol. Methods*, 138:60-65, 2006.
- Cavanagh D. Severe acute respiratory syndrome vaccine development: experiences of vaccination against avian infectious bronchitis coronavirus. *Avian Pathol.*, 32:567-582, 2003.
- Cavanagh D. & Naqui S.A. Infectious bronchitis, p.101-120. In: Saif Y.M., Barnes H.J., Glisson J.R., Fadly A.M., McDougald L.R. & Swayne D.E. (Eds), *Diseases of Poultry*, 11th ed. Iowa State University Press, Ames, 2003.
- Cavanagh D. Coronavirus avian infectious bronchitis virus. *Vet. Res.*, 38:285-297, 2007.
- Dhinakar Raj G. & Jones R.C. Infectious bronchitis virus: immunopathogenesis of infection in the chicken. *Avian Pathol.*, 26:677-706, 1997.
- De Wit J.J. Detection of infectious bronchitis virus. *Avian Pathol.*, 29:71-93, 2000.
- De Wit J.J., Mekkes D.R., Kouwenhoven B. & Verheijden J.H.M. Sensitivity and specificity of serological tests for infectious bronchitis virus antibodies in broilers. *Avian Pathol.*, 26:105-118, 1997.
- Di Fabio J. & Buitrago L.Y.V. Bronquite infecciosa das galinhas, p.631-648. In: Berchieri Junior A., Silva E.N., Di Fabio J., Sesti L. & Zuanare M.A.F. (Eds), *Doença das Aves*, 2^a ed. FACTA, Campinas, 2009.
- Jackwood M.W., Hilt D.A., McCall A.W., Polizzi C.N., McKinley E.T. & Williams S.M. Infectious bronchitis virus field vaccination coverage and persistence of Arkansas-type viruses in commercial broilers. *Avian Diseases*, 53:175-183, 2009.
- Monreal G., Bauer H.J. & Wiegmann J. Comparison of the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), haemagglutination inhibition test and agar gel precipitation test for detection of antibodies to avian infectious bronchitis virus. *Avian Pathol.*, 14:421-434, 1985.
- OIE. World Organization for Animal Health. Avian Infectious Bronchitis, p. 443-455. In: *OIE Terrestrial Manual*. 2008. (Disponível em: <http://www.oie.int/international-standard-setting/terrestrial-manual/access-online/>).
- Trhusfield M. Epidemiologia Veterinária. 2^a ed. Roca, São Paulo, 2003. 556p.
- Villareal L.Y.B. Impacto dos diferentes patótipos dos vírus da bronquite infecciosa circulantes no Brasil. In: IX Simpósio Brasil Sul de Avicultura, Chapecó, 2008.