

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA E  
PARASITOLOGIA APLICADAS**

*MON  
513:636.5.033  
P324 i  
TES/2001*

**Identificação e caracterização molecular do vírus da doença  
infecciosa da bolsa cloacal em um lote de frangos de corte em  
Buriti Alegre, GO – Brasil, no ano de 2001.**

Dissertação apresentada ao Colegiado do  
Programa de Pós-graduação em Imunologia  
e Parasitologia Aplicadas para obtenção do  
título de mestre

**Márcia Beatriz Cardoso de Paula**

**Uberlândia**

**2003**

**SISBI/UFU**



1000209176

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA E  
PARASITOLOGIA APLICADAS**

**Identificação e caracterização molecular do vírus da doença  
infecciosa da bolsa cloacal em um lote de frangos de corte em  
Buriti Alegre, GO – Brasil, no ano de 2001.**

Dissertação apresentada ao Colegiado do  
Programa de Pós-graduação em Imunologia  
e Parasitologia Aplicadas para obtenção do  
título de mestre

**Márcia Beatriz Cardoso de Paula**  
**Orientadora: Profa. Dra. Divina Aparecida Oliveira Queiróz**  
**Co-orientador: Prof. Dr. Jonny Yokosawa**

**Uberlândia  
2003**

*Dedico este trabalho:*

*Aos meus pais, Arlindo e Clerce, que  
inúmeras vezes renunciaram aos seus  
sonhos em favor dos meus;*

*Aos meus filhos Vinicius, Gustavo e  
Marcelo;*

*Ao meu querido companheiro Alan.*

*"De tudo ficaram três coisas...  
A certeza de que estamos sempre começando...  
A certeza de que é preciso continuar...  
A certeza de que podemos ser interrompidos antes de terminar...  
Façamos da interrupção um caminho novo...  
Da queda um passo de dança...  
Do medo uma escada...  
Do sonho uma ponte...  
Da procura um encontro ! "*

*(Fernando Sabino)*

## AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Paulo Lourenço da Silva pelo incentivo a iniciação deste mestrado.

À minha orientadora, Profa. Dra. Divina Aparecida O. Queiróz, pelo apoio, pela confiança e pela dedicação e esforço durante toda a execução deste projeto. Agradeço também pelo empenho na minha qualificação profissional.

Ao meu co-orientador, Dr. Jonny Yokosawa, pelo seu acompanhamento dedicado e cuidadoso, principalmente da parte molecular deste trabalho.

A José Eustáquio da Costa por sua grande ajuda na colheita dos espécimes clínicos.

Aos colegas do Laboratório de Virologia pelo apoio, incentivo e por tudo aquilo que de alguma forma colaborou para que este trabalho pudesse ser realizado.

Aos funcionários de secretaria do Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas pela simpatia e atenção a mim dispensadas em todos os momentos.

A todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas, pelos ensinamentos teóricos e práticos ao longo do curso.

Aos amigos e colegas do Laudo Laboratório Avícola de Uberlândia, principalmente nas pessoas de Márcio Danilo Botrel Coutinho e Rogério Avelar Ferraz, pela amizade, confiança e oportunidade da realização de parte do projeto.

Aos Profs. Drs. Leonilda Stanziola, José Antônio Galo e Cezar Laerte Natal (área de Ciências Fisiológicas/UFU) e ao Prof. Dr. Luiz Ricardo Goulart Filho (Laboratório de Genética Molecular/UFU) pelo valioso empréstimo de equipamentos sem os quais não teria sido possível executar a parte molecular deste estudo.

Aos Drs. Humberto Eustáquio Coelho e Marcelo Beletti, da Faculdade de Medicina Veterinária/UFU, pela assistência nas análises histopatológicas.

À Dra. Ana Alice Diniz dos Santos, área de morfologia do ICBIM/UFU, pelo valioso auxílio na documentação das fotografias de resultados histopatológicos.

À Profa. Dra. Daise Rossi, do Laboratório de Biotecnologia Animal Aplicada da Faculdade de Medicina Veterinária / UFU, pelo empréstimo da máquina de PCR, otimizando a execução deste trabalho

A Dra. Márcia Cristina Cury do Laboratório de Parasitologia/UFU pela valiosa ajuda na obtenção de algumas referências bibliográfica e transporte de uma enzima de restrição de Belo Horizonte para Uberlândia

A Profa. Maria Raquel Carvalho do Departamento de Patologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais pela gentil doação de uma enzima de restrição.

A Deus, pelo dom da vida e por todas as oportunidades de trabalho e de crescimento interior

Aos meus pais pelo incentivo, pela ajuda e pela preocupação, tanto por mim quanto por meus filhos durante os períodos de maior dedicação ao trabalho.

Aos meus filhos, dádivas divinas, fonte de carinho e afeto.

Ao meu marido e companheiro Alan de Paula, por tudo que vivemos até que esse trabalho pudesse ser concluído.

## SUMÁRIO

Lista de abreviaturas	
Lista de figuras	
Lista de tabelas	
Resumo	
Summary	
1. Introdução.....	01
2. Objetivos.....	12
3. Material e Métodos.....	13
3.1. Histórico do caso.....	13
3.2. Amostras clínicas.....	13
3.3. Exame histopatológico.....	14
3.4. Isolamento viral.....	14
3.5. Extração do RNA.....	15
3.6. "Primers" .....	16
3.7. Transcrição reversa.....	16
3.8. <i>Nested</i> – reação em cadeia da polimerase ( <i>nested</i> – PCR).....	17
3.9. Polimorfismo do tamanho do fragmento de restrição ( <i>Restriction</i> <i>Fragment Length Polymorphism</i> - RFLP).....	18
4. Resultados.....	19
4.1. Exame histopatológico.....	19
4.2. Isolamento viral.....	21
4.3. Detecção do RNA viral por RT-PCR.....	22
4.4. Análise do RFLP.....	23
5. Discussão.....	26
6. Conclusões.....	30
7. Referências bibliográficas.....	31
8. Anexos.....	38



### Lista de Abreviaturas

<b>CMSP</b>	- Células mononucleares do sangue periférico
<b>DEPC</b>	- Dietilpirocarbonato
<b>DMSO</b>	- Dimetilsulfóxido
<b>DIB</b>	- Doença infecciosa da bolsa cloacal
<b>EDTA</b>	- Ácido etilenodiaminotetracético
<b>H.E</b>	- Hematoxilina – eosina
<b>hvVDIB</b>	- Vírus da doença infecciosa da bolsa cloacal hiper virulento
<b>MAb</b>	- Anticorpo monoclonal
<b>MCA</b>	- Membrana corioalantóide
<b>ORF</b>	- <i>Open reading frame</i>
<b>pb</b>	- Pares de bases
<b>RFLP</b>	- <i>Restriction fragment length polymorphism</i>
<b>RT-PCR</b>	- <i>Reverse transcriptase – polymerase chain reaction</i>
<b>SPF</b>	- <i>Specific pathogen free</i>
<b>TPB</b>	- <i>Tryptose phosphate broth</i>
<b>VDIB</b>	- Vírus da doença infecciosa da bolsa cloacal
<b>VP</b>	- Proteína viral
<b>vvIBDV</b>	- <i>Very virulent infectious bursal disease virus</i>

## Lista de Figuras

FIGURA 1 - Família <i>Birnaviridae</i> , gênero <i>Birnavirus</i> . Vírus da doença infecciosa da bolsa cloacal. Fotomicrografia eletrônica. ( <a href="http://life.anu.edu.au:80/viruses/lctv/Index.html">http://life.anu.edu.au:80/viruses/lctv/Index.html</a> ).....	03
FIGURA 2 - Genoma do vírus da doença infecciosa da bolsa cloacal: organização estrutural (MURPHY et al., 1999).....	04
FIGURA 3 - Fotomicrografia de bolsa cloacal de frango de corte, 34 dias de idade, corada pela técnica de H. E. Presença de folículos linfóides normais (54X).....	19
FIGURA 4 - Fotomicrografia de bolsa cloacal de frango de corte, 34 dias de idade, corada pela técnica de H. E, apresentando bursite infecciosa. Observar cistos (c) e hipotrofia dos folículos linfóides (45X).....	20
FIGURA 5 - Fotomicrografia de bolsa cloacal de frango de corte, 34 dias de idade, corada pela técnica de H. E, apresentando bursite infecciosa. Observar necrose (n) e invasão de heterófilos (350X).....	20
FIGURA 6 - Detecção do RNA viral, pela reação de <i>nested</i> RT-PCR, a partir de bolsas cloacais e maceradas de embriões provenientes do isolamento viral. Coluna MW – marcador de peso molecular 100pb (Roche); Coluna 1 – fragmento obtido da bolsa cloacal; Coluna 2 – fragmento obtido da bolsa; Coluna 3 – fragmento obtido a partir de macerado de embriões; coluna 4 – H <sub>2</sub> O (controle negativo).....	22

FIGURA 7 - Detecção do RNA viral, pela reação de *nested* RT-PCR, de CMSP. Coluna MW – marcador de peso molecular 100pb (Roche); Coluna 1 – produto amplificado de CMSP; Coluna 2) H<sub>2</sub>O (controle negativo)..... 23

FIGURA 8 - Ensaio de RFLP: digestão total do fragmento amplificado pela *nested*-PCR com enzimas de restrição *SacI* *TaqI* *SspI* *DraI* *MvaI* e *StyI*. As setas indicam bandas resultantes de digestão parcial pelas enzimas *StyI* e *SspI*..... 24

### Lista de Tabelas

TABELA 1 - Mortalidade embrionária observada entre dois e quatro dias após a inoculação de ovos SPF com o VDIB.....	21
TABELA 2 - Lesões observadas nos embriões entre dois e quatro dias após a inoculação de ovos SPF com o VDIB.....	21
TABELA 3 - Enzimas de restrição utilizadas na digestão do VDIB isolado.....	24
TABELA 4 - Padrões de RFLP para isolados do VDIB.....	25

## RESUMO

Com o objetivo de identificar e caracterizar o agente etiológico de um quadro clínico sugestivo de doença infecciosa da bolsa cloacal (DIB), que afetou um plantel de frangos de corte com 34 dias de idade, em Buriti Alegre (estado de Goiás, centro-oeste do Brasil), no ano de 2001, procedeu-se uma combinação de métodos virológicos clássicos e modernos. Análises histopatológicas de bolsas cloacais revelaram necrose, depleção de folículos linfóides, infiltração de heterófilos, edema e formação de cavidades císticas, lesões compatíveis com as observadas na DIB. A inoculação de uma suspensão de macerado de amostras de bolsas cloacais em ovos embrionados de galinhas SPF (*specific-pathogen-free*) resultou em mortalidade embrionária e lesões macroscópicas compatíveis com aquelas provocadas pelo VDIB. Amostras de bolsas cloacais foram submetidas à técnica de transcrição reversa-reação em cadeia da polimerase (RT-PCR), utilizando-se "primers" específicos para o VDIB. Essa reação amplificou um fragmento do tamanho esperado, que foi digerido por enzimas de restrição, revelando um padrão de "polimorfismo do tamanho do fragmento de restrição" (RFLP) que não se enquadrou em nenhum dos 17 padrões de RFLP descritos anteriormente. Esses resultados indicaram que o agente etiológico isolado foi o VDIB e que os métodos moleculares utilizados foram essenciais na obtenção do conclusivo diagnóstico laboratorial da doença. Neste estudo, a presença de lesões macroscópicas e microscópicas em bolsas cloacais sugerem que a doença que ocorreu no plantel de frangos de corte foi causada pelo VDIB. A observação de um padrão de RFLP diferente daqueles observados por outros pesquisadores indicou se tratar de um novo isolado.

**Palavras-chave:** Doença infecciosa da bolsa cloacal, doença de Gumboro, vírus da doença infecciosa da bolsa cloacal, galinhas, RT-PCR/RFLP.

## SUMMARY

In order to identify and characterize the causative agent of a suggestive clinical case of infectious bursal disease (IBD) that affected a 34-day-old commercial broiler chickens flock in Buriti Alegre (Goiás State, Midwestern Brazil), in the year 2001 we carried out a combination of classic and modern virological methods. Histopathological analysis of the bursa revealed necrosis, presence of depleted follicles, and some infiltration of heterophils, edema and formation of cystic cavities that are the compatible lesions observed in IBD. Inoculation of embryonated eggs of *specific-pathogen-free* (SPF) chickens with macerated bursa suspension resulted in embryo mortality and gross lesions compatible with that caused by IBDV. Samples of bursa were submitted to a nested reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) procedure with IBDV specific primers. This reaction amplified a fragment with expected size, which was digested with restriction enzymes and revealed a restriction fragment length polymorphism (RFLP) pattern that did not match any of the 17 RFLP patterns described previously (Ikuta *et al.*, 2001). All these results indicated that the isolated etiological agent was the IBDV and the molecular method was essential to obtain a conclusive laboratorial diagnostic of the disease. In this study, the presence of gross and microscopical lesions in bursa is an indication that the disease that occurred in the commercial broiler chicken flock was caused by the IBDV. The detection of a new RFLP pattern indicated that this agent is a new isolate.

**Key words:** Infectious bursal disease, Gumboro disease, Infectious bursal disease virus, chickens, RT-PCR/RFLP.

## 1. INTRODUÇÃO

O vírus da doença infecciosa da bolsa cloacal (VDIB) é o agente causador da doença de Gumboro (DG), uma infecção aguda e altamente contagiosa que afeta principalmente aves jovens (COSGROVE, 1962). Este vírus infecta e destrói células B em divisão, que expressam IgM em sua superfície (HIRAI et al., 1981; NAKAI; HIRAI, 1981; SHARMA et al., 2000) e, o seu principal sítio de replicação é a bolsa cloacal, onde picos de multiplicação podem ser detectados entre 3 e 5 dias após a infecção em aves susceptíveis (KAUFER; WEISS, 1980; TANIMURA; SHARMA, 1998).

A doença infecciosa da bolsa cloacal (DIB) apresenta grande importância econômica para a avicultura industrial pelo reflexo de duas situações em aves susceptíveis: (i) doença clínica ou DIB clássica, caracterizada por inflamação e necrose da bolsa cloacal, cuja severidade está diretamente relacionada ao número de células suscetíveis presentes nesse órgão. Ocorre quando o vírus infecta aves entre três e seis semanas de idade, período em que a bolsa cloacal atinge seu desenvolvimento máximo. A morbidade é em torno de 10% e a mortalidade varia de 1 a 10% para o vírus clássico (LASHER; DAVIS, 1997), enquanto que para cepas variantes e altamente virulentas, a mortalidade pode chegar a 30% em frangos de corte (LASHER; SHANE, 1994); e (ii) doença sub-clínica, que se

apresenta como um quadro de imunodepressão, podendo ser temporária ou permanente com aumento da suscetibilidade para infecções bacterianas, virais e por protozoários (LASHER; SHANE, 1994) e respostas vacinais diminuídas (SIMON; ISHIZUKA, 2000; SILVA, 2001). Esta forma ocorre em aves com menos de três semanas de idade e a severidade depende da precocidade da infecção e das cepas envolvidas. Quanto mais precoce for a infecção, mais graves e irreversíveis serão os danos causados na bolsa cloacal elevando assim a chance da imunodepressão se tornar permanente (BERNARDINO, 2001).

O VDIB tem sido identificado em quase todas as áreas importantes em produção avícola e poucos lotes de frangos de corte estão livres do vírus. A doença tem sido considerada como uma das principais causas de perdas econômicas devido à mortalidade e aos efeitos negativos no desempenho dos plantéis avícolas (LASHER; SHANE, 1994; MURPHY et al., 1999 ; SIMON; ISHIZUKA, 2000).

A DIB foi observada inicialmente em 1957 por Cosgrove (COSGROVE, 1962) em uma fazenda de frangos de corte perto da comunidade de Gumboro, estado de Delaware, EUA, e foi chamada inicialmente de nefrose aviária. Posteriormente, ficou conhecida como doença de Gumboro e é atualmente denominada como bursite infecciosa ou doença infecciosa da bolsa cloacal (LASHER; DAVIS, 1997).

O VDIB pertence à família *Birnaviridae*, gênero *Birnavirus*, possui simetria icosaédrica (Figura 1), não apresenta envelope e seu diâmetro varia



de 55 a 65nm (BÖTTCHER et al., 1997; LASHER; DAVIS, 1997; MURPHY et al., 1999).

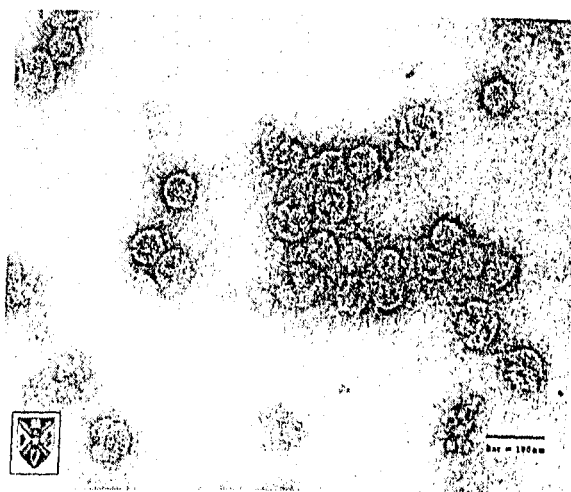


Figura 1 - Família *Birnaviridae*, gênero *Birnavirus*. Vírus da doença infecciosa da bolsa cloacal. Fotomicrografia eletrônica. (<http://life.anu.edu.au:80/viruses/lctv/Index.htm>)

A Figura 2 mostra o genoma viral que consiste de dois segmentos de RNA linear de dupla fita: o segmento A, de 3,2Kpb, contém dois "open reading frames" (ORFs) parcialmente sobrepostos (Fig. 2). O maior ORF codifica uma poliproteína que é clivada em três proteínas maduras: VP2 (48 kDa) e VP3 (33 kDa), proteínas estruturais, e VP4 (29 kDa), uma protease viral responsável pela clivagem dessa poliproteína (COSTA et al., 2002). Além do fato da VP2 conter o maior sítio antigênico responsável pela indução de anticorpos neutralizantes protetores, estudos têm demonstrado que a virulência, o tropismo celular e os marcadores fenotípicos patogênicos do VDIB localizam-se nesta proteína (BRANDT et al., 2001). A VP3 contém sítios de neutralização de menor importância (MURPHY et al., 1999). O menor ORF codifica a proteína VP5 (11 kDa), de função ainda desconhecida

uma RNA polimerase dependente de RNA (LUKERT; SAIF, 1997; MURPHY et al., 1999).

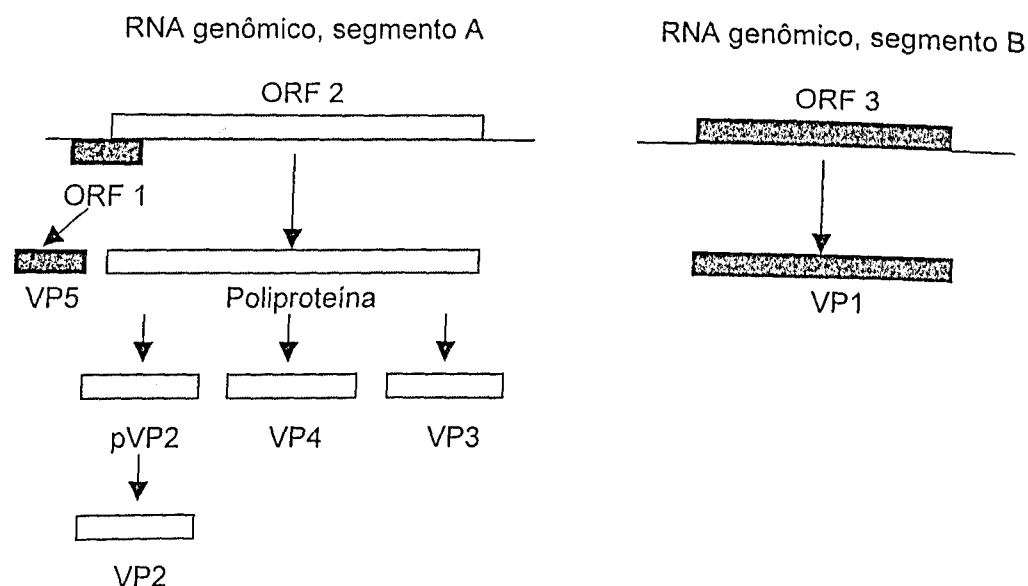


Figura 2 - Genoma do vírus da doença infecciosa da bolsa cloacal: organização estrutural (MURPHY et al., 1999).

Existem dois sorotipos do vírus que apresentam uma proteção cruzada mínima e podem ser diferenciados por testes sorológicos: o sorotipo 1, patogênico somente para galinhas e que tem sido isolado de patos e perus sem a doença; e o sorotipo 2, encontrado principalmente em perus. Este sorotipo não tem mostrado ser patogênico ou imunossupressivo para qualquer espécie aviária (LASHER; SHANE, 1994; LUKERT; SAIF, 1997; MURPHY et al., 1999; ITO et al., 2001).

De acordo com diferenças nos padrões de patogenicidade os vírus da DIB do sorotipo 1 são subdivididos em cepas clássicas, variantes americanas, descritas nos EUA, Venezuela e Argentina a partir de 1985 (ITO et al., 2001), variantes brasileiras G15 e G16 (grupos moleculares 15 e 16)

(ITO et al., 2001) ) e cepas muito virulentas (vvIBDV – very virulent [vv] infectious bursal disease virus (ITO et al., 2001; IKUTA et al., 2001), que foram detectadas na Europa a partir de 1988 e, no Brasil, a partir de 1997 (BERNARDINO, 2000; ITO et al., 2001). Quando estas variantes não coincidem com a estrutura antigênica das cepas usadas em vacinas, ocorrem falhas de vacinação. Cepas virulentas de campo têm sido isoladas de aves imunizadas em grandes indústrias de produção avícola (DORMITÓRIO et al., 1997) e podem ser caracterizadas utilizando-se anticorpos monoclonais (MAb) e técnicas moleculares como a transcrição reversa - reação em cadeia da polimerase (RT-PCR), seguida por digestão com enzimas de restrição, conhecida como polimorfismo do comprimento do fragmento de restrição (RT-PCR/RFLP) (DORMITORIO et al., 1997; JACKWOOD; SAIF, 1989; KIBENGE et al., 1990; JACKWOOD; JACKWOOD, 1994).

Os subtipos ou cepas de cada sorotipo são formados através de mutações que resultam em substituições de aminoácidos localizados na região central da VP2 (resíduos 206 – 350), que constitui a região hipervariável e onde os epitopos neutralizantes estão agrupados (DORMITORIO et al., 1997; SIMON; ISHIZUKA, 2000; ITO et al., 2001).

A principal porta de entrada do vírus é a via oral, podendo também penetrar pela via conjuntival e respiratória. Por outro lado, o VDIB é excretado nas fezes por um período de 2 a 14 dias (MURPHY et al., 1999; SIMON; ISHIZUKA, 2000). A transmissão do vírus entre lotes sucessivos ocorre principalmente pelo contato com aves infectadas e fômites contaminados, onde persiste por mais de quatro meses e em rações por até sete semanas (MURPHY et al., 1999). Não existem evidências de

transmissão vertical e a disseminação aerógena do agente viral não é importante. Insetos, pássaros silvestres, roedores, veículos contaminados e o homem podem transmitir mecanicamente o VDIB (SIMON; ISHIZUKA, 2000; SILVA, 2001). O vírus é resistente a vários agentes químicos e muito estável no meio ambiente o que explica sua persistência nos galpões de aves, mesmo após a adoção de procedimentos de limpeza e desinfecções (LUKERT; SAIF, 1997; MURPHY et al., 1999; SILVA, 2001).

Na ave, o vírus infecta células linfóides e macrófagos das mucosas do trato digestório, principalmente intestino, onde faz uma replicação primária nas placas de Payer. A partir daí, o vírus alcança a veia porta e dentro de poucas horas atinge a bolsa cloacal onde se dissemina rapidamente, através dos folículos linfóides bursais, provocando uma extensa destruição na medula e córtex desta região. Este processo de destruição celular pode ser acentuado por apoptose de células circunvizinhas infectadas pelo VDIB. A fase aguda lítica do vírus está associada com uma redução de células B circulantes. Linfócitos T são resistentes à infecção pelo VDIB, mas, há relatos de infiltração de células T no sítio e ao redor da área de replicação viral levando a uma intensificação das lesões causadas pelo vírus (SHARMA et al., 2000).

O período de incubação do VDIB é muito curto e os sinais clínicos são observados dentro de dois a quatro dias após a exposição (LASHER; SHANE, 1994). Geralmente, na DIB clínica as aves tendem a bicar a região da cloaca e comumente as penas desta região apresentam-se manchadas com uratos. Em suas descrições iniciais, Cosgrove (1962) observou diarreia,

anorexia, depressão, tremores, penas eriçadas, severa prostração e finalmente morte.

Quando necrópsiadas as aves apresentam desidratação e hemorragia na musculatura peitoral (LASHER; SHANE, 1994; SHARMA et al., 2000). A bolsa cloacal pode apresentar um transudato gelatinoso e amarelado recobrando a superfície serosa, necrose e hemorragia na superfície mucosa, alterações inflamatórias e edema. Cepas altamente virulentas podem causar diminuição de peso do timo e lesões severas no baço, tonsilas cecais e glândula de Harder que podem apresentar diferentes graus de necrose das células linfóides (SILVA, 2001).

A gravidade dos sinais clínicos está relacionada à cepa viral (LUKERT; SAIF, 1997) e a fatores estressantes como os climáticos, ambientais, nutricionais, fisiológicos e sociais. A imunodepressão associada à forma clínica da doença parece ser mínima e transitória e, na maioria dos casos, tem uma importância econômica menor (SILVA, 2001).

A doença sub-clínica é considerada como sendo a forma mais importante da doença em todo o mundo, pois, de maneira geral, o desempenho do lote apresenta-se reduzido. Lotes imunodeprimidos tendem a sofrer um aumento na incidência de infecções secundárias, particularmente por vírus respiratórios, vírus da anemia infecciosa das galinhas e *Escherichia coli*, além de baixa conversão alimentar, falhas nas respostas às vacinações, aumento no uso de antibióticos e um aumento na taxa de condenação de carcaças no abatedouro. Embora os mecanismos da imunodepressão induzida pelo VDIB não estejam completamente entendidos, os mesmos têm sido bem documentados. Criadores de frangos de corte têm sofrido perdas

econômicas sucessivas devidas à imunodepressão causada pelo VDIB em lotes extensivamente vacinados (SHARMA et al., 2000; SILVA, 2001).

A partir de 1966 a prevalência da DIB clínica foi reduzida nos EUA após a introdução de vacinas atenuadas. Uma década mais tarde houve uma diminuição do impacto econômico da doença devido à administração de vacinas inativadas em reprodutoras (aumento da transferência de anticorpos maternos à progênie) e à instituição de programas de monitoramento sorológico (LASHER; SHANE, 1994). Por outro lado, em 1983, apesar do uso de vacinas atenuadas convencionais contra os VDIB, documentou-se um aumento na severidade da doença clínica em Delmarva, EUA, e investigações subseqüentes detectaram variantes do sorotipo 1 em aves sentinelas imunizadas contra as cepas de VDIB clássicas (LASHER; SHANE, 1994). Quatro anos mais tarde foi detectada uma cepa altamente patogênica do sorotipo 1 (849 VB) circulando na Holanda e na Bélgica. O aparecimento destas cepas variantes resultou em mortalidade superior a 30% em frangos de corte e de até 70% em poedeiras comerciais, e foi responsabilizada pela condição clínica designada por "vvIBDV" (LASHER; SHANE, 1994). Em 1988, essas cepas variantes se disseminaram pela Europa e Oriente Médio (Jordânia, Arábia Saudita, Egito, etc), e, em 1989, pela Grécia, Portugal, Israel, Índia e África do Sul.

Na Europa, a cepa denominada DV86 foi identificada como sendo a responsável pelos surtos de DIB. Em 1990 e 1993, pesquisadores descreveram surtos de Gumboro por cepas vvIBDV na China e Rússia, respectivamente (LASHER; SHANE, 1994).

No Brasil, os primeiros casos clínicos ocorreram no final de 1997, em frangos de corte, no sul de Minas Gerais e na região de Campinas, SP. Esses surtos foram causados por uma cepa clássica de VDIB, já conhecida mundialmente, e de presença marcante na Europa e Japão, pertencente ao grupo molecular 11 (G11). Foi referido que esse subtipo seria mais patogênico e mais virulento que o subtipo molecular G15, que estaria circulando normalmente pelo país e sendo relacionado a casos sub-clínicos (BERNARDINO, 2000).

No ano de 1998 a enfermidade foi detectada em granjas de corte no Maranhão, Ceará e em Goiás, entretanto, na oportunidade os vírus não foram genotipados. A partir de 1999, lotes de postura comercial de algumas regiões de São Paulo foram afetados e a doença se disseminou para vários estados do Nordeste - Piauí, Pernambuco, Paraíba, Alagoas e Sergipe (BERNARDINO, 2000). O subtipo G11 foi detectado nos estados de Santa Catarina e Rio Grande do Sul em abril de 2000.

O controle efetivo da DIB baseia-se na utilização de medidas profiláticas, complementares, que devem ocorrer simultaneamente: (I) adoção de medidas de biossegurança que impeçam a entrada e/ou saída de agentes disseminadores de patógenos, aliada a um sistema de diagnóstico precoce e de pronto atendimento para a eliminação de aves doentes; e (II) prevenção por vacinas atenuadas e/ou inativadas, preparadas a partir de cepas clássicas. As vacinas atenuadas são preparadas em embriões de pintos ou em cultivo celular, com diferentes graus de atenuação: "suaves", "intermediárias" ou "quentes" (fortes). As vacinas inativadas também são preparadas em embriões de pintos, cultivo celular ou em bolsa cloacal, sendo

que a vacinação é geralmente recomendada como reforço para reprodutoras, cujo objetivo é a transferência de imunidade passiva à progênie (LASHER; SHANE, 1994; LUKERT; SAIF, 1997; MURPHY et al., 1999; ITO et al., 2001).

Apesar da adoção de programas de vacinações intensivas a doença continua a ser um problema em várias partes do mundo, pois cepas européias emergentes têm sido isoladas de lotes imunizados com vacinas produzidas a partir de vírus clássicos. Em adição, estudos têm demonstrado que cepas de vvVDIB causam doença mesmo quando altos títulos de anticorpos contra cepas clássicas estão presentes (MURPHY et al., 1999). Portanto, a vacinação realizada com um determinado subtipo do sorotipo 1 nem sempre tem protegido pintinhos de desafios com outro subtipo do mesmo sorotipo (JACKWOOD; JACKWOOD, 1994). Tem sido relatado que essas cepas variantes são antigenicamente semelhantes às cepas clássicas, mas se apresentam muito mais virulentas (VAN DEN BERG; MEULEMANS, 1991). Diante do exposto, a caracterização em subtipos de VDIB constitui uma importante ferramenta na escolha de cepas vacinais que devem ser utilizadas em um programa de vacinação para uma determinada região (JACKWOOD; SAIF, 1987; JACKWOOD; JACKWOOD, 1994).

Métodos laboratoriais convencionais como a reação de imunofluorescência, virusneutralização, isolamento viral, ELISA e outros podem detectar a presença de VDIB em uma amostra clínica. Jackwood e Saif (1987), utilizando teste de virusneutralização cruzada, descreveram seis subtipos do VDIB do sorotipo 1. Entretanto, esse método requer a adaptação do vírus em cultura de células e produção de anti-soros específicos contra cepas de VDIB hiper virulentas (hvVDIB). Exames histopatológicos permitem



uma fácil visualização microscópica de bolsas cloacais infectadas e, em associação com os sinais clínicos, têm sido utilizados para diagnosticar a DIB (BORDIM, 2001), apesar do relato de que outros agentes podem causar lesões semelhantes na bolsa cloacal (RIDDELL, 1987). Porém, esses procedimentos são laboriosos, requerem muitos dias para serem realizados e não identificam o sorotipo ou o subtipo antigênico do vírus (RIDDELL, 1987; LUKERT; SAIF, 1997).

A utilização de métodos moleculares de diagnóstico permite a caracterização do VDIB em subtipos e pode fornecer informações epidemiológicas importantes sobre a circulação desses diferentes vírus, tanto para a região de Uberlândia, considerada atualmente como um pólo de criação e comercialização de aves industriais, como para regiões circunvizinhas.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. OBJETIVO PRINCIPAL**

Identificar o VDIB causador de lesões presentes em bolsas cloacais provenientes de um lote de frangos de corte com diagnóstico clínico de doença infecciosa da bolsa cloacal (DIB), em Buriti Alegre (GO-Brasil) no ano de 2001, através de métodos clássicos e moleculares.

### **2.2. OBJETIVO ESPECÍFICO**

Caracterizar o agente através de métodos moleculares (RT-PCR/RFLP).

### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1. Histórico do caso**

A doença infecciosa da bolsa cloacal, que ocorreu em um plantel de uma granja comercial constituída de três galpões de frangos de corte, no município de Buriti Alegre, Goiás, foi investigada. A DIB ocorreu naturalmente em fevereiro de 2001 e foi diagnosticada clinicamente através da associação dos sinais clínicos e de lesões sugestivas da doença observadas à necrópsia como presença de hemorragia bursal e de um transudato gelatinoso e amarelado recobrimdo esse órgão. As perdas econômicas, caracterizadas por elevada mortalidade e diminuição no desempenho produtivo do lote observado ao abate, foram graves.

#### **3.2. Amostras clínicas**

Quarenta e uma aves doentes de um dos galpões de uma granja de frangos de corte com 34 dias de idade foram necropsiadas e as bolsas cloacais, com as respectivas amostras de sangue periférico, com e sem anticoagulante (EDTA), foram coletadas. As bolsas cloacais e o soro foram estocados individualmente a  $-70^{\circ}\text{C}$ .

Células mononucleares do sangue periférico (CMSP) foram separadas de um volume de aproximadamente 2mL de sangue, por centrifugação utilizando Ficoll-Paque<sup>TM</sup> Plus (Amersham Biosciences Corp., Piscataway, NJ), de acordo com as recomendações do fabricante, misturadas com soro fetal bovino a 90% (Invitrogen Corp., Carisbad, CA) e 10% de dimetilsulfóxido - DMSO (Sigma, St. Louis, MO) e estocadas em nitrogênio líquido.

### 3.3. Exame histopatológico

Quatro bolsas cloacais que apresentavam hemorragia de mucosa foram colhidas à necrópsia e fixadas em formalina tamponada a 10% por 24 horas. Após esse procedimento, as amostras foram desidratadas em solução alcoólica de concentrações crescentes (85%, 95% e 100%), diafanizadas em xilol (duas vezes por 15 minutos) e incluídas em parafina (45 minutos) para obtenção de cortes de cinco micrômetros ( $\mu$ M) que foram coradas pela hematoxilina e eosina (H. E) e submetidas ao exame histopatológico.

A DIB foi diagnosticada com base nas alterações sugestivas observadas nas Figuras 1a, 1b e 1c, semelhantes às descritas por Riddell (1987).

### 3.4. Isolamento viral

Fragmentos de cinco bolsas cloacais foram macerados e uma suspensão a 10% foi preparada em TPB (Tryptose Phosphate Broth, Difco Laboratories – Franklin Lakes, NJ) com antibióticos nas seguintes concentrações: 1mg/mL de sulfato de estreptomicina (INLAB – Brasil),

0,4mg/mL de sulfato de gentamicina (Schering Plough – Kenilworth, NJ) e 1000 UI/mL de penicilina (Ariston – São Paulo, Brasil). Quinze ovos embrionados, provenientes de galinhas SPF, com 11 dias de incubação foram inoculados com 0,1 mL dessa suspensão via membrana corioalantóide (MCA). A inoculação nos ovos embrionados foi realizada segundo a técnica descrita por Simoni (2001). Os embriões mortos nas primeiras 24 horas após a inoculação foram descartados e os embriões restantes foram observados diariamente. Quatro dias após a inoculação os ovos foram examinados quanto à presença de lesões características para o VDIB, nos embriões e na MCA. Embriões infectados e MCA foram coletados, macerados e o RNA total foi extraído para a detecção do ácido nucléico viral através da *nested* PCR.

### 3.5. Extração do RNA

O RNA total foi extraído com trizol (Roche Molecular Biochemicals, Indianápolis, IN) de 0,5mg de bolsa cloacal e de CMSP (a quantidade de células não foi determinada) de aves infectadas, conforme recomendações do fabricante, e dissolvido com 11µL de água tratada com dietilpirocarbonato - DEPC (Ambion, Inc. Austin, TX).

### 3.6. "Primers"

Os "primers" utilizados na reação de RT-PCR foram os descritos por Liu et al. (1994), com modificações. Esses amplificam a região hipervariável do gene para VP2 (AZAD et al., 1985). A sequência dos "primers" usados foi a seguinte:

P1: 5' – TCA CCG TCC TCA GCT TAC – 3' (correspondente à posição dos nucleotídeos 587-604 do segmento A)

P2: 5' – TCA GGA TTT GGG ATC AGC – 3' (correspondente à posição 1212-1220)

P3: 5' – GCC CAG AGT CTA CAC CAT AAC T – 3' (correspondente à posição 703-726)

P4: 5' – GCG ACC GTA ACG ACG GAT CC – 3' (correspondente à posição 1174-1193).

A reação de PCR utilizando os "primers" P1 e P2 amplificou um fragmento de 643pb enquanto que a reação de *nested* PCR utilizando os "primers" P3 e P4 amplificou um fragmento de 491pb.

### 3.7. Transcrição reversa

Dois microlitros do RNA total foi combinado com "primer" P2 na concentração final de 5 $\mu$ M, 0,25mM de cada desoxirribonucleotideo (Roche Molecular Biochemicals) em 13,5 $\mu$ L de volume e incubado a 95°C por 10 minutos. Após a desnaturação a 95°C por 10 minutos e resfriamento, 20

unidades de inibidor de ribonuclease (Roche Molecular Biochemicals), 40 unidades da transcriptase reversa M-MuLV (Roche Molecular Biochemicals) e solução tampão fornecida pelo fabricante, foram adicionados à mistura em um volume total de 20 $\mu$ L. A reação foi incubada a 37°C por 60 minutos e interrompida por incubação a 95°C por 10 minutos.

### 3.8. “*Nested*” - reação em cadeia da polimerase (*nested*-PCR)

Após a reação de transcrição reversa o cDNA obtido foi usado na primeira reação de PCR com os “primers” P1 e P2. Os “primers” P3 e P4 foram usados na reação de *nested*-PCR. Para ambas as reações (PCR e *nested* PCR) foram utilizadas as seguintes condições: 0,2mM de cada desoxirribonucleotideo, 0,3 $\mu$ M de cada “primer”, 2,5 unidades de Taq DNA polymerase (Roche) e solução tampão fornecida pelo fabricante (a concentração final do tampão foi 10mM Tris-HCl, 1,5mM MgCl<sub>2</sub>, 50mM KCl, pH 8,3), em um volume total de 50 $\mu$ l. As reações foram incubadas como se segue: 94°C por 10 min, seguido por 30 ciclos a 94°C por 45s, 50°C por 30s e 72°C por 1min, e um passo final de extensão a 72°C por 5 min. Cinco microlitros do produto da *nested*-PCR foi misturado com 1 $\mu$ l de tampão de corrida 6X loading buffer (SAMBROOK; RUSSEL, 2001) e separado em gel de agarose a 1% corado com brometo de etídio (0,3 $\mu$ g/mL). O gel de agarose foi visualizado e fotografado por um sistema digital (ImageMaster VDS, Amersham Biosciences Corp.).

### 3.9. Polimorfismo do tamanho do fragmento de restrição (Restriction fragment length polymorphism - RFLP)

O produto da PCR obtido a partir de uma bolsa cloacal foi purificado com o Kit de purificação QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen Inc. Valencia, CA) e digerido com as enzimas *DraI*, *SacI*, *MvaI*, *TaqI*, *SfiI* e *SspI*, conforme descrito por Ikuta et al. (2001). O fragmento de restrição foi separado em gel de agarose a 2% corado com brometo de etídio (0,3µg/mL).



## 4. RESULTADOS

### 4.1. Exames histopatológicos

Bolsas cloacais de aves doentes (Figuras. 3b e 3c) com lesões típicas de bursite infecciosa mostraram presença de cistos (c), hipotrofia de folículos linfóides, necrose (n) e invasão de heterófilos (seta).



Figura 3 – Fotomicrografia de bolsa cloacal de frango de corte, 34 dias de idade, corada pela técnica de H.E. Presença de folículos linfóides normais (54X).



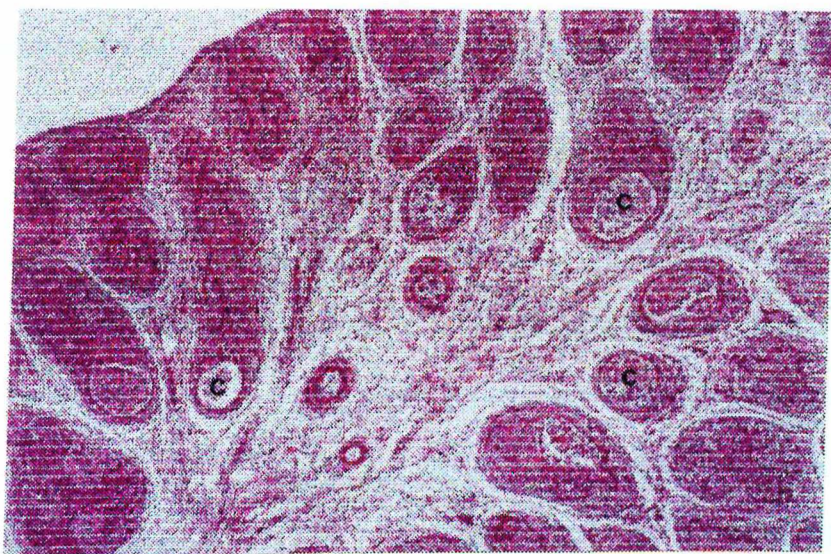


Figura 4 – Fotomicrografia de bolsa cloacal de frango de corte, 34 dias de idade, corada pela técnica de H.E, apresentando bursite infecciosa. Observar cistos(c) e hipotrofia dos folículos linfóides (45X).

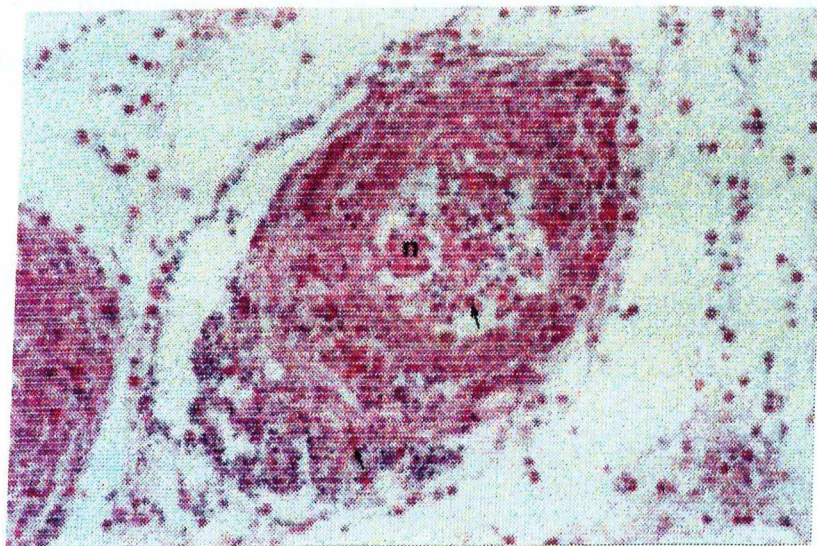


Figura 5 – Fotomicrografia de bolsa cloacal de frango de corte, 34 dias de idade, corada pela técnica de H.E, apresentando bursite infecciosa. Observar necrose (n) e invasão de heterófilos (seta) (350X).

#### 4.2. Isolamento viral

A inoculação de uma suspensão do macerado das bolsas cloacais em 15 ovos embrionados provenientes de galinhas SPF produziu mortalidade embrionária em 2 a 4 dias após a inoculação (Tabela 1). Os embriões apresentaram distensão do abdome por edema e congestão cutânea. Dois embriões que permaneceram vivos no quarto dia apresentaram lesões hepáticas e distrofia muscular que podem ser considerados sugestivos da DIB (Tabela 2) (LUKERT; SAIF, 1997). Apesar de amostras muito virulentas de VDIB não se multiplicarem bem em ovos embrionados de galinhas SPF e de causarem taxa de mortalidade embrionária menor do que vírus atenuados, nesse estudo observou-se 86,6% (13/15) de mortalidade embrionária.

**Tabela 1 – Mortalidade embrionária observada entre dois e quatro dias após a inoculação de ovos SPF com o VDIB**

	Mortalidade embrionária				TOTAL
	1º dia	2º dia	3º dia	4º dia	
Mortos	00	02	11	00	13
Vivos	15	13	02	02	02

**Tabela 2 – Lesões observadas nos embriões entre dois e quatro dias após a inoculação de ovos SPF com o VDIB**

Lesões	Mortos	Vivos
Congestão epitelial generalizada	13	00
Edema subcutâneo	13	00
Fígado mosqueado ou esverdeado	00	02

#### 4.3. Detecção do RNA viral por RT-PCR

Uma reação de amplificação realizada em dois passos foi usada para amplificar um fragmento de 491pb (aminoácidos nas posições 202 a 365) da região hipervariável do gene para VP2 (LIU et al., 1994). Este ensaio foi realizado utilizando bolsas cloacais, macerado de embriões proveniente do isolamento viral e CMSP como amostras clínicas. Foi amplificado um fragmento que tinha o tamanho esperado (Figuras 4 e 5).

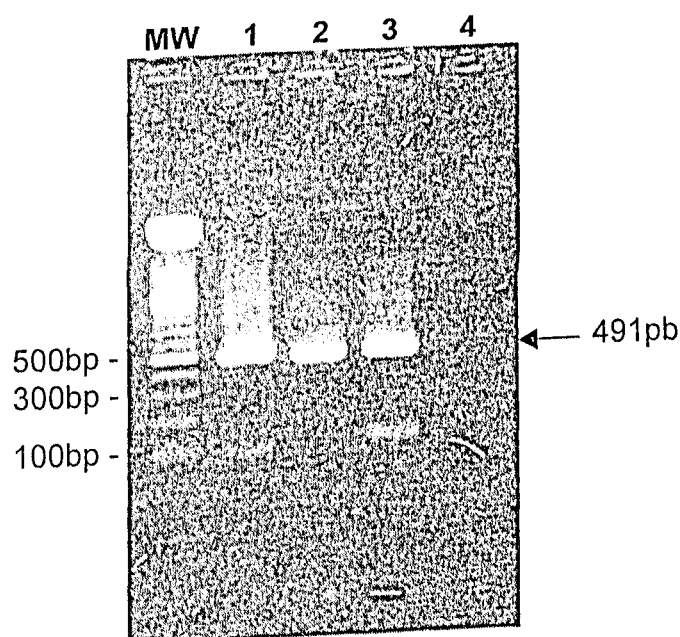


Figura 6 – Detecção do RNA viral, pela reação de *nested* RT-PCR, a partir de bolsas cloacais e macerado de embriões provenientes do isolamento viral. Coluna MW – marcador de peso molecular 100pb (Roche); Coluna 1) – produto amplificado obtido da bolsa cloacal ; Coluna 2) – fragmento obtido da bolsa cloacal ; Coluna 3) fragmento obtido a partir de macerado de embriões; 4) H<sub>2</sub>O (controle negativo).

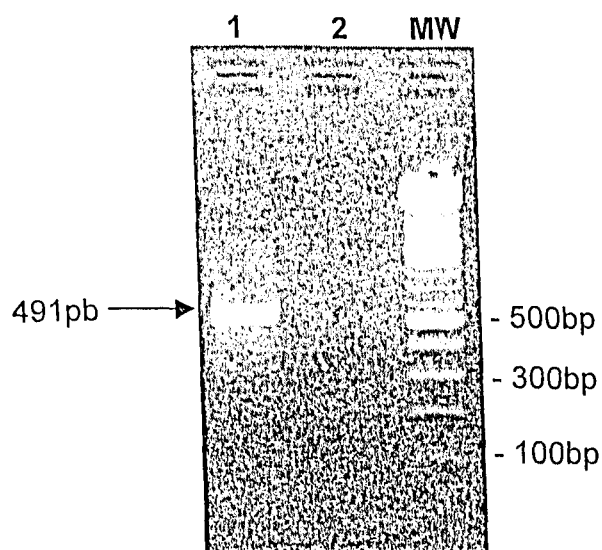


Fig. 7– Detecção do RNA viral, pela reação de *nested* RT-PCR, de CMSP. MW – marcador de peso molecular 100bp (Roche); Coluna 1) – produto amplificado de CMSP; Coluna 2) – H<sub>2</sub>O (controle negativo).

#### 4.4. Análise do RFLP

O 'amplicon' obtido de uma amostra de bolsa cloacal foi digerido com um grupo de endonucleases conforme em Material e Métodos. Sítios para as enzimas *MvaI*, *TaqI*, *SspI* e *StyI* estavam presentes no fragmento enquanto sítios para *SacI* e *DraI* não estavam presentes (Figura 6 e Tabela 3). O fragmento amplificado nesse estudo foi clivado pela *SspI*, indicando que uma amostra de vvVDIB causou a doença no plantel de frangos de corte em Buriti Alegre. O padrão de RFLP obtido pela digestão do produto da PCR com seis enzimas de restrição foi comparado aos 17 padrões propostos por Ikuta et al. (2001) (Tabela 4) e revelou ser um padrão diferente.

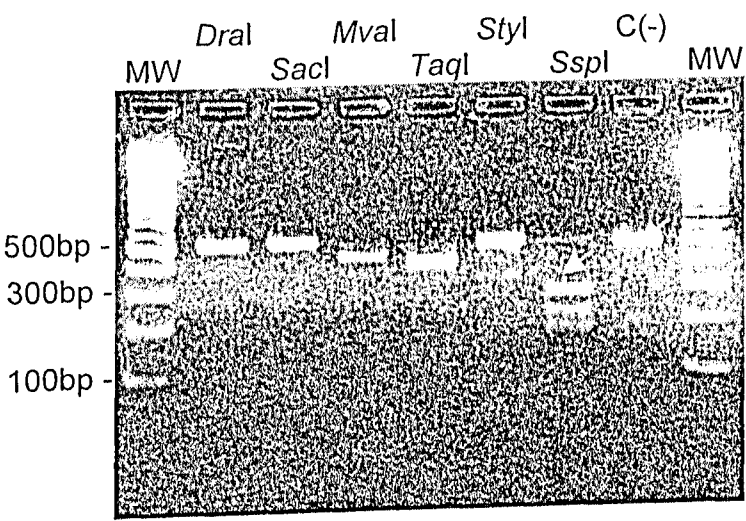


Figura 8 – Ensaio de RFLP: digestão total do fragmento amplificado pela *nested* PCR com enzimas de restrição *SacI* *TaqI* *SspI* *DraI* *MvaI* e *Styl*. As setas indicam bandas resultantes de digestão parcial pelas enzimas *Styl* e *SspI*

Tabela 3 - Enzimas de restrição utilizadas na digestão do VDIB isolado

Isolado	Enzimas de restrição					
	<i>DraI</i>	<i>SacI</i>	<i>Styl</i>	<i>SspI</i>	<i>TaqI</i>	<i>MvaI</i>
VDIB	( - )	( - )	( + )	( + )	( + )	( + )

Tabela 4 – Padrões de RFLP para isolados do VDIB

Seqüência dos VDIB	Enzimas de restrição						Padrões de RFLP
	DraI	SacI	StyI	SspI	TaqI	MvaI	
Variant A-U	+	-	-	-	+	-	1
Variant E-US, U28-US	-	+	-	-	+	-	2
Av. F-Br, Maternalin-Br	-	+	+	-	-	+	3
Gumb. Vet-BR, Gumb. Nob-BR, Gumb.CT-BR, Bur706-BR, Av. I-BR	-	+	-	-	-	+	4
Lukert-US,Ultravac-BR, Bur2-BR	-	+	+	-	+	-	5
Gumborvax-BR	-	+	-	-	+	+	6
Edgar-US, Miss-US	-	+	+	-	-	-	9
Ca586-BR, Des603-BR, MC597-BR, MC599-BR	-	-	+	+	+	-	11
G72-BR	-	+	-	-	-	-	7
G79-BR	-	-	-	-	+	-	14
G02-BR, G07-BR, G11-BR, G48-BR, G52-BR, G71-BR	-	+	-	-	+	+	15
G67-BR, G68-BR, G81-BR, G2369-BR	-	-	-	-	+	-	16
G75-BR	-	+	-	-	+	+	17
Buriti Alegre, GO-Br	-	-	+	+	+	+	

Fonte: Ikuta et al.( 2001)

+ / -: indica presença / ausência do respectivo sítio de restrição



## DISCUSSÃO

O diagnóstico clínico da DIB vem sendo realizado pela associação do histórico e do desempenho de lotes anteriores, com idade das aves, sinais clínicos e lesões, principalmente na bolsa cloacal, observadas em necrópsia de aves provenientes de lotes em andamento. Algumas doenças infecciosas, como a de Marek, produzem hipotrofia de bolsa semelhante à provocada pelo VDIB e, assim como outras enfermidades (hepatite por corpúsculo de inclusão, bronquite infecciosa, coccidiose e síndrome hemorrágica), necessitam ser diferenciadas da DIB. Somado a isso, a avaliação sorológica das aves deve ser realizada com o objetivo de auxiliar no diagnóstico da doença, de traçar o perfil imunológico do plantel e de avaliar a eficiência de programas vacinais.

No local da ocorrência do surto, região de Buriti Alegre (GO), não havia histórico de doença de Gumboro e nem de vacinação contra o VDIB. As lesões observadas, como hemorragia da bolsa e presença de transudado amarelado e gelatinoso recobrimdo o órgão, constituíram evidências clínicas sugestivas da DIB. A associação dos sinais clínicos com os resultados histopatológicos e o baixo desempenho do lote, em termos de ganho de peso, observado ao abate, sugeriram que a doença foi causada pelo VDIB.



Considerando que outros diferentes vírus apresentam tropismo específico para tecidos linfóides (RIDDELL, 1987), o isolamento do VDIB em ovos embrionados de galinhas SPF foi realizado com o objetivo de se obter indicações mais conclusivas sobre o agente. Nesse estudo, observou-se uma taxa de 86,6% (13/15) de mortalidade embrionária e as lesões nos embriões foram sugestivas para o VDIB. No entanto, os sinais clínicos nas aves sugeriram que o agente causal seria uma amostra de VDIB hiper virulenta (hvVDIB). Porém, a elevada taxa de mortalidade embrionária detectada, está em desacordo com o publicado na literatura, que demonstrou que amostras de VDIB muito virulentas não se multiplicam adequadamente em ovos embrionados de galinhas SPF e induzem taxa de mortalidade embrionária menor do que a induzida por vírus atenuados (HASSAN; SAIF, 1996; ITO et al., 2001).

Diante da dificuldade de identificar conclusivamente o agente causador da doença pelos métodos clássicos empregados, métodos moleculares foram utilizados para identificá-lo.

A amplificação, através da reação de *nested* PCR, de um fragmento do tamanho esperado, permitiu a identificação do agente como sendo o VDIB. O ensaio, realizado em duas etapas (primeira e segunda PCRs) e envolvendo a utilização de dois pares de oligonucleotídeos de seqüências específicas para o vírus, tornou a metodologia mais específica e resultou na amplificação de um único fragmento, observado como banda única em gel de agarose. Este ensaio foi realizado com sucesso utilizando amostras de bolsa cloacal, macerado de embriões proveniente do isolamento viral e CMSP.

Além de permitir a identificação do vírus causador do surto a RT-PCR possibilitou a caracterização molecular do VDIB através da análise do polimorfismo do tamanho dos fragmentos gerados por digestão com enzimas de restrição (RFLP).

Em suas observações Zieremberg et al. (2001) observaram que todas as cepas clássicas virulentas de VDIB por eles investigadas apresentaram sítios para a enzima de restrição *SacI*. Nesse estudo, a ausência de sítio para esta enzima permitiu determinar que o isolado do vírus de Buriti Alegre não pertence ao grupo de cepas clássicas virulentas. Outros pesquisadores têm utilizado a presença do sítio para a enzima de restrição *SspI* para a identificação de VDIB muito virulentos (LIN et al., 1993; JACKWOOD ; JACKWOOD, 1997; JACKWOOD; SOMMER, 1999). Nesse estudo a presença do sítio para a enzima *SspI* permitiu identificar o isolado como pertencente ao grupo molecular das cepas muito virulentas.

Em adição, o padrão de RFLP obtido nesse experimento revelou ser diferente dos 17 padrões propostos (Tabela 4) e/ou observados por Ikuta et al. (2001). É possível que o agente encontrado em Buriti Alegre, GO, seja um novo isolado, com um comportamento diferente no ensaio do isolamento viral onde apresentou uma alta taxa de mortalidade embrionária.

A realização da subtipagem dos VDIB é importante, pois, quando programas de vacinação indicados aos vírus circulantes não são implantados e monitorados, as perdas econômicas podem ser significantes. A RT-PCR seguida pela análise do RFLP é um método rápido e sensível que permite a detecção e caracterização de subtipos de VDIB, pois, apresentam potencial para investigar mudanças nas seqüências de nucleotídeos em posições

chaves, que caracterizam o aparecimento de cepas variantes de VDIB.

Essas informações podem ser úteis em estratégias de vacinação.

Acredita-se que o ensaio de RT-PCR em CMSP de aves pode constituir uma ferramenta útil para o diagnóstico/monitoramento da circulação do VDIB em granjas e/ou indústrias avícolas.

## CONCLUSÕES

1. A reação de *nested* RT-PCR/RFLP permite a detecção do genoma viral presente em bolsas cloacais;
2. O isolado do VDIB foi caracterizado por RFLP, indicando se tratar de um novo isolado;
3. Os ensaios de RT-PCR/RFLP podem ser usados na identificação e caracterização rápida de VDIB diretamente de amostras de bolsa cloacal e CMSP.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AZAD, A. A.; BARRETTE, S. A.; FAYE, K.J. Characterization and molecular cloning of the double-stranded RNA genome of an Australian strain of infectious bursal disease. **Virology**, New York, n.143, p.35-44, 1985.

BANDA, A.; VILLEGAS, P.; EL-ATTRACHE, J.; ESTÉVEZ, C. Molecular characterization of seven field isolates of infectious bursal disease virus obtained from commercial broiler chickens. **Avian Diseases**, Kennett Square, n.45, p.620-630, 2001.

BERNARDINO, A. Gumboro: experiência brasileira. **Revista do Conselho Federal de Medicina Veterinária**, Brasília, n.20, p.37 - 44, maio - ago. 2000.

BORDIM, E. L. Algumas considerações sobre alterações anatomopatológicas e diagnóstico. In: SIMPÓSIO DA DOENÇA DE GUMBORO, 2., 2001, Campinas. **Anais...** Campinas: Fundação APINCO de Ciências e Tecnologia Avícolas, 2001. p.75-77.

BÖTTCHER, B.; KISELEV, N. A.; STELMASHCHUK, V. Y.; PEREVOZCHIKOVA, N. A.; BORISOV, A. V.; CROWTHER, R. A. Three-

dimensional structure of infectious bursal disease virus. **Journal of Virology**, New York, p.325-330, 1997.

BRANDT, M.; YAO, K.; LIU, M.; HECKERT, R. A.; VACKARIA, V.N. Molecular determinants of virulence, cell tropism, and pathogenic phenotype of infectious bursal disease virus. **Journal of Virology**, New York, v.75, n.24, p. 11974 –11982, 2001.

COSGROVE, A. S. An apparently new disease of chickens - avian nephrosis. **Avian Diseases**, Kennett Square, n.6, p.385-389, 1962.

COSTA, B.; CHEVALIER, C.; HENRY, C.; HUET, J-C.; PETIT, S.; LEPAUT, J.; BOOT, H.; DELMAS, B. The capsid of infectious bursal disease virus contains several small peptides arising from the maturation process of pVP2. **Journal of Virology**, New York, v.76, n.5, p. 2393 -2402, 2002.

DORMITORIO, T.V.; GIAMBRONE, J.J.; DUCK, L.W. Sequence comparisons of the variable VP2 region of eight infectious bursal disease virus isolates. **Avian Diseases**, Kennett Square, n.41, p.36-44, 1997.

HASSAN, M. K.; SAIF, Y.M. Influence of the host system on the pathogenicity, immunogenicity and antigenicity of infectious bursal disease virus. **Avian Diseases**, Kennett Square, n.40, p.553-561, 1996.

HIRAI, K.; FUNAKOSHI, T.; NAKAI, T.; SHIMAKURA, S. Sequential changes in the number of surface immunoglobulin-bearing B lymphocytes in infectious bursal disease virus-infected chickens. **Avian Diseases**, Kennett Square, v.25, n.2, p.484-496, 1981.

IKUTA, N.; ÉL- ATTRACHE, J.; VILLEGAS, P.; GARCÍA, M.; LUNGE, V. R.; FONSECA, A. S. K.; OLIVEIRA, C.; MARQUES, E.K. Molecular characterization of Brazilian infectious bursal disease virus. **Avian Diseases**, Kennett Square, n.45, p.297-306, 2001.

ITO, N.M.K.; MIYAJI, C.I.; LIMA, E. A.; OKABAYASHI, S. **Doença de Gumboro**: revisão de literatura, avanços em biotecnologia e novos conhecimentos. Monografia. São Paulo: ELANCO, 2001. 76p.

JACKWOOD, D.H.; SAIF, Y.M. Antigenic diversity of infectious bursal disease viruses. **Avian Diseases**, Kennett Square, n.31, p.766-770, 1987.

JACKWOOD, D.J.; JACKWOOD, R.J. Infectious bursal disease viruses: molecular differentiation of antigenic subtypes among serotype 1 viruses. **Avian Diseases**, Kennett Square, n.38, p. 531-537, 1994.

JACKWOOD, D.J.; JACKWOOD, R.J. Molecular identification of infectious bursal disease virus strains. **Avian Diseases**, Kennett Square, n.41, p. 97-104, 1997.

JACKWOOD, D.J.; SOMMER, S.E. Genetic heterogeneity in the VP2 gene of infectious bursal disease virus detected in commercially reared chickens. **Avian Diseases**, Kennett Square, n.42, p.321-339, 1998.

JACKWOOD, D.J.; SOMMER, S.E. Restriction fragment length polymorphism in the VP2 gene of infectious bursal disease viruses from outside the United States. **Avian Diseases**, Kennett Square, n.43, p.310-314, 1999.

JACKWOOD, D.J.; SOMMER, S.E.; KNOBLIKE, H.V. Amino acid comparison of infectious bursal disease viruses placed in the same or different molecular groups by RT/PCR-RFLP. **Avian Diseases**, Kennett Square, n.45, p.330-339, 2001.

KÄUFER, I.; WEISS, E. Significance of bursa of Fabricius as target organ in infectious bursal disease of chickens. **Infection and Immunity**, Washington, v.27, n.2, p.364-367, 1980.

KIBENGE, F.S.B.; JACKWOOD, D.J.; MERCADO, C.C. Nucleotide sequence analysis of genome segment A of infectious bursal disease virus. **Journal of General Virology**, New York, n.6, p.247 – 259, 1990

LASHER, H.N.; SHANE, S.M. Infectious bursal disease. **World's Poultry Science Journal**, Ithaca, v.50, 1994.



- LASHER, H.N.; DAVIS, V.S. History of infectious bursal disease in the U.S. A - The first two decades. **Avian Diseases**, Kennett Square, n.41, p. 11-19, 1997.
- LIN, Z.; KATO, A.; OTAKI, Y.; NAKAMURA, T.; SASMAZ, E.; UEDA, S. Sequence comparison of a highly virulent infectious bursal disease virus prevalent in Japan. **Avian Diseases**, Kennett Square, n.37, p.315-323, 1993.
- LIU, H.; GIAMBRONE, J.J.; DORMITORIO, T. Detection of genetic variations in serotype I isolates of infectious bursal disease virus using polymerase chain reaction and restriction endonuclease analysis. **Journal of Virological Methods**, Amsterdam, n.48, p. 281-291, 1994.
- LUKERT, P.D.; SAIF, Y.M. Infectious bursal disease. In: CALNEK, B.W. et al. (Eds.). **Diseases of Poultry**, 10<sup>th</sup> ed. Ames, Iowa State University, 1997. p.721-738.
- MEIR, R.; JACKWOOD, D.J.; WEISMAN, Y. Molecular typing of infectious bursal disease virus of Israeli field and vaccine strains by the reverse transcription/polymerase chain reaction/restriction fragment length polymorphism assay. **Avian Diseases**, Kennett Square, n.45, p.223-228. 2001.

MURPHY, F. A.; GIBBS, E. P. J.; HORZINEK, M. C.; STUDDERT, M. J. Birnaviridae. In: \_\_\_\_\_. **Veterinary virology**. 3<sup>rd</sup> ed. Orlando: Academic Press, 1999. p.405-409.

NAKAI, T.; HIRAI, K. In vitro infection of fractionated chicken lymphocytes by infectious bursal disease virus. **Avian Diseases**, Kennett Square, v.25, n.4, p.831-838, 1981.

RIDDELL, C. Lymphoid system. In: RIDDELL, C. **Avian histopathology**. Saskatoon: American Association of Avian Pathologists, 1987. p. 8 -14.

SAMBROOK, J.; RUSSEL, D. W. Gel electrophoresis of DNA and pulse-field agarose gel electrophoresis. In: \_\_\_\_\_. **Molecular cloning a laboratory manual**. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 2001. v.1.

SHARMA, J.M.; KIM, I-J.; RAUTENSCHLEIN, S.; YEH, H-Y. Infectious bursal disease virus of chickens: pathogenesis and immunosuppression. **Developmental And Comparative Immunology**, New York, n.24, p.223 – 235, 2000.

SIMON, V.A.; ISHIZUKA, M.M. Doença infecciosa da Bolsa de Fabrício.- DIB. In: JUNIOR, A.B.; MACARI, M. **Doenças das aves**, Campinas: FACTA – Fundação APINCO de Ciência e Tecnologia, 2000 p.301-314.

SIMONI, I.C. **Utilização de diferentes linhagens celulares para propagação do vírus da doença infecciosa da bursa.** 2001. 78f. Tese (Doutorado em Genética e Biologia Molecular) – Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

SILVA, P.L. Doença infecciosa da bolsa (DIB). **Veterinária Notícias**, Uberlândia, v.7, n.2, p. 139 – 152, 2001.

TANIMURA, N.; SHARMA, J.M. In-situ apoptosis in chickens infected with infectious bursal disease vírus. **Journal of Comparative Pathology**, Edinburgh, v.118, p.15 – 27.

VAN DEN BERG, T.P.; MEULEMANS, G. Acute infectious bursal disease in poultry: protection afforded by maternally derived antibodies and interference with live vaccination. **Avian Pathology**, Huntingdon, n.20, p. 409-421, 1991.

ZIERENBERG, K., RAUE, R., MULLER, H. Rapid identification of "very virulent" strains of infectious bursal disease virus by reverse transcription-polymerase chain reaction combined with restriction enzyme analysis. **Avian Pathology**, Huntingdon, n.30, p.55-62.

## FLUXOGRAMA

## População de estudo / Espécimes clínicos / Métodos

