

FRANCISNEY SILVA FÉLIX

IDENTIFICAÇÃO DE NOVAS POSSÍVEIS VARIANTES DO *INFECTIOUS BURSAL
DISEASE VIRUS* (IBDV)

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa
como parte das exigências do Programa de Pós-graduação
em Bioquímica Agrícola para obtenção do título de
Magister Scientiae.

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2010

FRANCISNEY SILVA FÉLIX

IDENTIFICAÇÃO DE NOVAS POSSÍVEIS VARIANTES DO *INFECTIOUS BURSAL DISEASE VIRUS* (IBDV)

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Bioquímica Agrícola, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 08 de julho de 2010.

Dra. Ethel Fernandes de Oliveira Peternelli
(Coorientadora)

Prof. Abelardo Silva Júnior
(Coorientador)

Prof. George Henrique Kling de Moraes

Prof. Luciano Gomes Fietto

Prof. Márcia Rogéria de Almeida Lamêgo
(Orientadora)

**“O insucesso é apenas uma oportunidade para
recomeçar de novo com mais inteligência**

AGRADECIMENTOS

- Agradeço primeiramente a Deus pela conquista.
- A minha mãe que sempre acreditou em mim, e por me ajudar nos momentos difíceis.
- Ao meu irmão Franklin e sua esposa por me acolher e me apoiar.
- Aos meus avós por presenciarem esse momento da minha vida.
- A Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular por essa oportunidade.
- À minha orientadora professora Márcia Rogéria por me receber em seu laboratório, por ter conseguido as amostras, pelo carinho, pela concessão da bolsa.
- A minha co-orientadora professora Juliana Fietto pelas dicas valiosas, por ser cativante e atenciosa.
- Ao meu co-orientador professor Abelardo Silva Júnior pela preocupação com os meus experimentos, por ter me cedido amostras virais para o experimento, por ter me mostrado o caminho e dado dicas que me auxiliaram.
- A Ethel Peternelli pelas correções, co-orientação do trabalho e por sempre mostrar disposição em ajudar.
- À Fernanda Miquelitto e Luciana Myrrha pela grande colaboração na detecção molecular e na clonagem das amostras.
- Ao Pedro Marcus Vidigal e ao Marcelo Depollo pela ajuda nas análises filogenéticas.
- A Mariana Fausto, pela colaboração na revisão da minha dissertação.
- Ao Sr. Valdir por sempre colaborar com a esterilização dos materiais a serem utilizados nos experimentos.
- Aos amigos do BIOAGRO, Ramom, Matheus, Gustavo, Ronny, Rodrigo, Myrian, Lucas, Cris e Raphael, Mikael, Luana, Yasmin, Orlando, Luciana Coutinho, Monique e Rafael. A todos, o meu muito obrigado.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	Vi
LISTA DE FIGURAS	Vii
LISTA DE ABREVIATURAS	Viii
RESUMO	Xi
ABSTRACT	Xiii
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	2
2.1. <i>Infectious Bursal Disease Virus</i> (IBDV).....	2
2.1.1. <i>O IBDV e suas características moleculares</i>	2
2.1.2. <i>Sorotipos</i>	6
2.1.3 <i>Epidemiologia</i>	7
2.1.4 <i>Patogenia</i>	10
2.1.5. <i>Controle e Prevenção</i>	11
2.1.6 <i>Diagnóstico</i>	13
2.1.7. <i>Impacto econômico</i>	14
3. OBJETIVO GERAL	16
3.1 OBJETIVOS ESPECIFICOS	16
4. METODOLOGIA	17
4.1. Amostras virais.....	17
4.2. Extração do RNA total.....	18
4.3 Oligonucleotídeos.....	18
4.4. RT-PCR.....	19
4.5. Purificação e clonagem do fragmento do material genético viral.....	19
4.6. Transformação.....	20
4.7. Extração do DNA plasmidial.....	20
4.8 Sequenciamento das regiões amplificadas do material genético viral.....	20
4.9. Agrupamento por meio de Métodos Filogenéticos.....	21
4.9.1. <i>Análise e alinhamento das sequências</i>	21
4.9.2. <i>Análises filogenéticas</i>	21
5. RESULTADO E DISCUSSÃO	22
5.1. Processamento do RNA total.....	22

5.2. Análise filogenética das sequências.....	23
5.3. Análise e alinhamento das sequências de aminoácidos.....	26
5.4. Análises de aminoácidos da região hipervariável nas sequências do presente estudo e sequências vacinais disponíveis no GenBank	30
6. CONCLUSÕES.....	36
7. PERSPECTIVAS.....	36
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	37

LISTA DE TABELAS

TABELA 1- Número de aves acometidas no Brasil pelo IBDV entre os anos de 2005 e 2009.....	15
TABELA 2- Número de acesso da região codificadora da proteína VP2 do IBDV selecionadas no GenBank.....	33
TABELA 3- Isolados virais de IBDV caracterizados na literatura.....	35

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1- Representação esquemática do genoma do IBDV e sua estratégia de transcrição.....	2
FIGURA 2- Padrão eletroforético dos produtos amplificados de 472pb do gene que codifica a proteína VP2 do IBDV pela reação da RT-PCR.....	22
FIGURA 3- Árvore filogenética das sequências de nucleotídeos da região hipervariável da VP2.....	25
FIGURA 4- Alinhamento de aminoácidos presentes na literatura com as amostras UFV.....	26
FIGURA 5- Análise de aminoácidos da região hipervariável das amostras sequenciadas no presente estudo e das amostras vacinais disponíveis no GenBank (aminoácidos 226-306).....	32

LISTA DE ABREVIATURAS

- AC - ELISA – *Antigen-capture enzyme linked immunosorbent antibodies*
- atIBDV - Linhagem atenuada do IBDV
- avIBDV - Linhagem variante antigênica do vírus da doença infecciosa da bursa
- BLAST – *Basic local alignment search too.*
- BSC - Linhagem celular para cultivo viral
- BspMI - Enzima de restrição que cliva o DNA em regiões características
- cDNA - Fita de DNA complementar
- CEF - Células de fibroblasto de embrião de galinha
- Cos-1 - Linhagem celular pra cultivo viral
- cvIBDV - Linhagem clássica do IBDV
- dATP - Desoxiadenosina trifosfato
- dCTP - Desoxicitidina trifosfato
- dGTP - Desoxiguanosina trifosfato
- DIB- Doença infecciosa da bursa (*Infectious Bursal Disease*)
- dNTP - Didesoxiribonucleotídeos
- dTTP - Desoxitimina trifosfato
- dsRNA - RNA de fita dupla
- DTT - Dithiothreitol
- FDA - *Food and Drug Administration*
- IBDV - Vírus da doença infecciosa da bursa (*Infectious Bursal Disease Vírus*)
- IgG - imunoglobulina G
- IPNV – Vírus da pancreatite necrótica infecciosa (*Infectious Pancreatic Necrosis Vírus*)
- IPTG - isopropil-tiogalactopiranosídeo
- LB - *Luria-Bertani* (meio para cultivo de bactérias)
- MAb - Anticorpo monoclonal
- MboI - Enzima de restrição que cliva o DNA em regiões características
- NCR - Região não-codificante
- ORF - *Open Reading Frame*
- PBC - sequência de aminoácidos encontrada na região hipervariável da proteína externa do capsídeo do vírus da doença infecciosa da bursa

- PDE - sequência de aminoácidos encontrada na região hipervariável da proteína externa do capsídeo do vírus da doença infecciosa da bursa
- PFG - sequência de aminoácidos encontrada na região hipervariável da proteína externa do capsídeo do vírus da doença infecciosa da bursa
- PHI - sequência de aminoácidos encontrada na região hipervariável da proteína externa do capsídeo do vírus da doença infecciosa da bursa
- pVP2 - Proteína do capsídeo externo do IBDV na forma imatura
- qRTPCR - *Real time quantitative reverse transcriptase*
- rAAAV-VP2 - Adenovírus recombinante contendo o gene da VP2
- RdRp - *RNA dependent RNA polymerase motifs*
- Ressortimento - Fenômeno onde ocorre a troca de segmento viral de duas linhagens virais diferentes após ambos infectarem uma célula
- RFLP - *Restriction Fragment Length Polymorphism*
- RNA - Ácido ribonucléico
- RNaseOUT - inibidor de enzimas que degradam RNA
- RT-PCR - *Reverse polymerase chain reaction transcript*
- SacI - Enzima de restrição que cliva o DNA em regiões características
- SPF - Espécie livre de patógeno
- srRNA- Fita simples de RNA
- SspI - Enzima de restrição que cliva o DNA em regiões características
- Taq - Enzima de restrição que cliva o DNA em regiões característica
- VDIB- Vírus da Doença Infecciosa da Bursa
- VP - Proteína viral do vírus
- VP1 - Enzima responsável pela polimerização do material genético do IBDV
- VP2 - Proteína externa do capsídeo ou região genômica que codifica para a VP2
- VP22 - Proteína externa do capsídeo do vírus da doença de Marek's
- VP2F - *Primer* específico para o gene da VP2
- VP2R - *Primer* reverso específico para o gene da VP2.
- VP3 - Proteína interna do capsídeo ou região genômica que codifica para a VP3
- VP4 - Proteína não estrutural
- VP5 - Proteína não estrutural
- VPg - Proteína viral 1 ligada ao genoma

- vvIBDV- Doença infecciosa da bursa de cepas muito virulentas (*Very Virulent Infectious Bursal of Disease*)
- X-Gal - 5-bromo-4 cloro-3 indol-beta-D-galactosídeo

RESUMO

FELIX, Francisney Silva, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, Julho de 2010. **Identificação de novas possíveis variantes do *Infectious Bursal Disease Virus* (IBDV)**. Orientadora: Márcia Rogéria de Almeida Lamêgo. Co-orientadores: Abelardo Silva Júnior, Ethel Fernandes de Oliveira Peternelli e Juliana Lopes Rangel Fietto.

A avicultura brasileira é a líder mundial em exportação de carne de frango. Um dos principais agentes causadores de prejuízos na indústria avícola é o vírus da doença infecciosa da bursa (VDIB) (*Infectious Bursal Disease Virus* - IBDV), pertencente à família *Birnaviridae*. Existem dois sorotipos de IBDV: sorotipos 1 e 2, sendo que todos os vírus capazes de causar a doença nas aves pertencem apenas ao sorotipo 1. No Brasil, esse vírus vem sendo responsável por grandes prejuízos econômicos na avicultura. Entre os anos de 2005 a 2009 causou 237 surtos em plantéis brasileiros levando a morte e o sacrifício de 868.054 aves no país. Uma vez infectada, a ave pode apresentar imunossupressão, diarreia, prostração, penas eriçadas e até mesmo vir a óbito, sendo que a mortalidade pode variar de acordo com a linhagem viral presente, *status* imunitário e idade da ave. A proteína externa do capsídeo (VP2) do IBDV possui uma região denominada como hipervariável que é utilizada para caracterização viral. Atualmente as linhagens virais são classificadas como: atenuada (atIBDV), variante (avIBDV), altamente virulenta (vvIBDV), cepa clássica e cepa selvagem. O objetivo geral desse trabalho foi realizar uma análise comparativa da sequência da região hipervariável da VP2 de linhagens virais obtidas da bursa de Fabrício de aves com suspeita do IBD, provenientes de três municípios no estado de Minas Gerais. E avaliar a possível ocorrência de novas linhagens variantes virais circulantes em campo. A presença do vírus foi confirmada depois que uma sequência de 472pb do gene que codifica a VP2 foi amplificada por RT-PCR e seqüenciada. Das oito amostras avaliadas, seis foram positivas para o vírus e tiveram suas seqüências comparadas com outras 98 disponíveis no GenBank, através do programa ClustalW, para o estudo da diversidade genética dessas linhagens. Para analisar as variações dos resíduos de aminoácidos, as seqüências obtidas a partir desses isolados foram alinhadas com as seqüências de aminoácidos de outros isolados caracterizados pela literatura utilizando o programa CLC Main Workbench Version 5.5 (CLC Bio). A hipótese filogenética foi inferida por Inferência Bayesiana (BI) através do programa MrBayes v3.1. Os resultados mostraram que as seqüências de nucleotídeos foram agrupados em um clado exclusivo na árvore filogenética devido a variações de aminoácidos da VP2, diferente de seqüências muito virulentas, cepas selvagem, cepas clássica e cepas atenuadas. Além disso,

diferenças na região hipervariável da VP2 dessas sequências, quando comparadas com as sequências de 4 linhagens vacinais disponíveis no GenBank, mostrou que estas podem tratar-se de novas variantes virais que estão em circulação em granjas comerciais não possuindo, portanto origem vacinal. Dessa forma, protocolos de vacinação devem ser reavaliados nesses plantéis.

ABSTRACT

FÉLIX, Francisney Silva, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa. July 2010. **Identification of possible new variants of *Infectious Bursal Disease Virus (IBDV)***. Adviser: Márcia Rogéria de Almeida Lamêgo. Co-adviser: Abelardo Silva Júnior, Ethel Fernandes de Oliveria Peternelli and Juliana Lopes Rangel Fietto

The Brazilian poultry industry is the world's leading exporter of chickens meat. One of main agents causing losses is the virus of infectious bursal disease-IBDV, belonging to the family Birnaviridae. There are two serotypes of IBDV: serotypes 1 and 2, and all the viruses able to cause disease in birds belong to serotype 1. In Brazil, the virus has been responsible for large economic losses in poultry where only between 2005 and 2009 caused 237 outbreaks in Brazilian herds leading to death and sacrifice of 868,054 chickens. Infected, the chicken may have immunosuppression, diarrhea, prostration, ruffled feathers and even come to death, and that mortality can vary depending on the viral strain, immune status and age of chicken. The outer capsid protein (VP2) of IBDV has a region that is called hypervariable which is used to characterization viral. Actually, the viral strains are classified as attenuated, (atIBDV), variant (avIBDV), highly virulent (vvIBDV), classical strain and wild type strain. The aim general of this study was to analyse the hypervariable region of VP2 in viral strain isolated from the bursa of Fabricius of chickens with suspect disease, from the tree municipality State of Minas Gerais. And to evaluate the possible occurrence of new variant lineages circulating in field. The virus was confirmed after a sequence of 472pb gene encoding VP2 was amplified by RT-PCR and sequenced. Of the eight evaluated samples, six of these samples which were positive for the virus had their sequences compared to other 98 available in Genbank, using the program ClustalW, to study the genetic diversity of these lineages. To analyse variations of amino acid residues, the sequence from these isolates were aligned with the amino acid sequence of other isolates characterized in the literature using the program CC Main Workbench Version 5.5 (CLC bio). The phylogenetic hypothesis was inferred by Bayesian Inference (BI) through the program MrBayes v3.1. The results showed that sequences of nucleotides taken from UFV were grouped into a unique clade in the phylogenetic tree due to variations in amino acids of VP2, differences sample of very virulent, wild type strains, classical strains and attenuated strains. Furthermore, differences in the hypervariable region of VP2 of these sequences samples when compared with the sequences of four vaccine strains available in GenBank showed that they can be treated to

new viral variants that are circulating on commercial farms not having thus vaccination. Therefore, vaccination protocols should be reviewed in these herds.

1. INTRODUÇÃO

A avicultura brasileira é líder mundial em exportação de carne de frango. O Brasil exportou em 2009, 3.634.503 toneladas, sendo o estado de Santa Catarina o maior exportador com um total de 986.257 toneladas. O Oriente Médio é o maior consumidor da carne de frango brasileira, representando 38% das exportações, e a Europa o menor, com apenas 4% (Fonte: www.abef.com.br).

Um dos principais agentes causadores de prejuízos na indústria avícola é o VDIB (*Infectious Bursal Disease Virus* - IBDV). No Brasil, a partir dos primeiros surtos em 1997 a doença infecciosa da bursa (*Infectious Bursal Disease* - IBD) vem sendo responsável por danos econômicos ao setor (Di Fabio, 1999). Entre os anos de 2005 a 2009, a presença do vírus em plantéis comerciais causou 237 surtos levando à morte e o sacrifício de 868.054 aves, comprometendo assim a produção (Fonte: <http://www.oie.int>). Tal fato está ligado a falhas nos programas de vacinação, assim como falhas nos programas de higienização, uma vez que o vírus pode resistir a métodos rigorosos de desinfecção acarretando na sua permanência nos plantéis (Hernandez et al., 2006; Dormitório et al., 2007).

O IBDV, pertencente à família *Birnaviridae*, é icosaédrico, não-envelopado, com 59,2 nm de diâmetro e contém dois segmentos genômicos de RNA denominados A e B. Existem dois sorotipos de IBDV: sorotipos 1 e 2, sendo que todos os vírus capazes de causar a doença nas aves pertencem ao sorotipo 1 (McFerran et al., 1980; Jackwood et al., 1982). Uma vez infectada, a ave pode apresentar imunossupressão, diarreia, prostração, penas eriçadas e até mesmo vir a óbito. As lesões internas incluem atrofia da bursa, desidratação, descoloração do músculo peitoral, podendo também apresentar hemorragias nessas regiões (Sharma et al., 2000).

A proteína externa do capsídeo (VP2) do IBDV contém 441 resíduos de aminoácidos e sofre mutações em vários locais, principalmente na região hipervariável, que está localizada entre os aminoácidos 206-350. Essa região fica exposta ao sistema imune e é responsável pela caracterização viral, sendo as linhagens virais classificadas atualmente como: atenuada (atIBDV), variante (avIBDV), altamente virulenta (vvIBDV), cepa clássica e cepa selvagem (Letzel et al., 2007; Razmyar & Peighambari, 2008). O alvo de estudo foi realizar uma comparação da região hipervariável da VP2 de linhagens virais obtidas através de amostras da bursa de Fabrício. Essas amostras foram obtidas de plantéis de três municípios da Zona da Mata de Minas Gerais. Suas sequências foram comparadas com outras disponíveis no GenBank, buscando assim determinar a diversidade genética dessas linhagens virais.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 *Infectious Bursal Disease Virus* (IBDV)

2.1.1. *O IBDV e suas características moleculares.*

Os birnavírus são vírus pertencentes à família *Birnaviridae* que é constituída por 3 gêneros: *Aquabirnavirus*, onde estão classificados vírus que infectam peixes, moluscos e crustáceos, e entre eles se destaca o vírus da necrose pancreática infecciosa VNPI (*Infectious Pancreatic Necrosis Vírus* - IPNV) que infecta peixes. O gênero *Avibirnavirus* constituído somente pelo vírus da doença infecciosa da bursa -VDIB- (*Infectious Bursal Disease Vírus* - IBDV) que infecta galinhas (*Gallus gallus*) e perus (*Meleagris gallopavo*); e o gênero *Entombirnavirus* que congrega vírus que infectam insetos como a mosca *Drosophila melanogaster* (Dobos et al., 1979).

O IBDV é um vírus não envelopado, que possui um capsídeo de simetria icosaédrica medindo 59,2 nm de diâmetro. Seu genoma consiste em dois segmentos (A e B) de RNA fita dupla. O segmento A possui 3,2 kb e apresenta duas janelas de leitura aberta *Open Reading Frame* - ORFs. A maior ORF codifica uma poliproteína, de 110 KDa, que através de um processo de auto-proteólise [é processada na proteína externa do capsídeo viral (VP2) com 40 kDa, na proteína interna do capsídeo viral (VP3) com 32 kDa e na protease viral (VP4) de 28 kDa, que está envolvida no processamento dessa poliproteína (figura 1) (Dobos et al., 1979; Azad et al., 1985; Hudson et al., 1986; Azad et al., 1987; Jagadish et al., 1988; Tacken et al., 2002)].

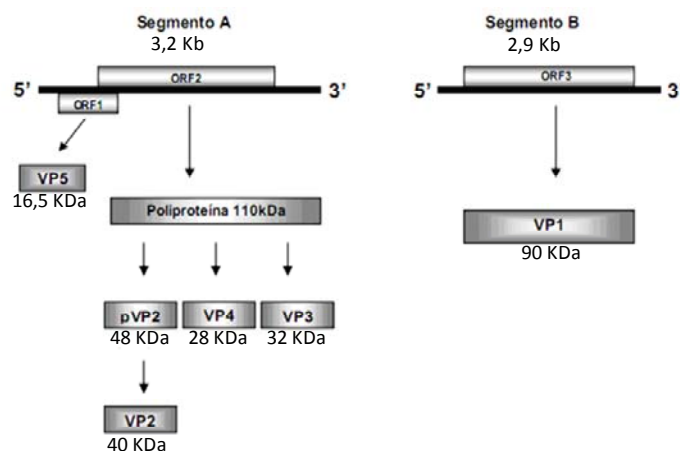


Figura 1- Representação esquemática do genoma do IBDV e sua estratégia de transcrição (Murphy et al., 1999, com modificações).

A partir de trabalhos utilizando mutagênese sítio-dirigida, os sítios de clivagem entre a VP2-VP4 (511 leucina [L]-alanina-[A]-alanina [A] 513) e VP4-VP3 (754 metionina [M]-alanina [A]-alanina [A] 756), foram descritos por Sanchez & Rodriguez (1999) e Lejal et al. (2000) demonstraram que a serina (S) 652 e leucina (L) 692 da VP4 são essenciais para a atividade catalítica viral. A mutação da isoleucina (I) para leucina (L) na posição 451, que está próximo ao sítio de clivagem entre a VP2-VP4, e as mutações prolina (P) substituindo serina (S) na posição 715 (VP3) e aspartato (D) substituindo histidina (H) na posição 751 (VP4), também próximos ao sítio de clivagem entre VP4-VP3, indicou uma melhora na eficiência da replicação e na patogenicidade viral, uma vez que essas mutações foram encontradas apenas em cepas muito virulentas causadoras da doença infecciosa da bursa (vvIBDV) (Yamaguchi et al., 1997).

A VP3 também é comum entre os sorotipos, linhagens e isolados virais, que essa porção carboxiterminal contenha um aminoácido glutamato (E) na posição 257, sendo este importante para o agrupamento e para o processo de morfogênese do capsídeo viral, conforme verificado em estudos anteriores (Pitcovski et al., 1998; Chevalier et al., 2004). Além disso, substituições de aminoácidos nas posições 990 (alanina [A] substituindo valina [V]) e na posição 1005 (tirosina [Y] substituído por alanina [A]) foi encontrada em vvIBDV. Isso indica que essas mutações melhoram a eficiência do agrupamento da proteína do capsídeo potencializando a replicação viral (Yamaguchi et al., 1997).

A outra ORF, também localizada no segmento A, codifica uma proteína não estrutural (VP5) de 16.5 kDa, que apresenta 145 resíduos de aminoácidos (Mundt et al., 1995). Trata-se de uma proteína que possui sete resíduos de cisteína (C) e que se encontra conservada em algumas linhagens clássicas do sorotipo I, tais como P2 e Cu-1. Essa proteína é expressa em células infectadas pelo virion e não é necessária para a replicação viral (Mundt et al., 1997). Estudos realizados por Lombardo et al. (2000), utilizando três sistemas de expressão (células CEF, BSC-1 e Cos-1) mostrou que, em todos eles essa proteína foi encontrada no complexo de golgi e na membrana plasmática, causando uma rápida alteração na morfologia celular acompanhada por um declínio em sua viabilidade. A célula também foi permeável a pequenas moléculas tais como *Trypan Blue*, e macromoléculas como a lectina e imunoglobulinas G (IGg), indicando assim, que esta proteína está relacionada com a liberação do vírus de dentro da célula.

O genoma do segmento B possui 2,9Kb e codifica a proteína VP1 de 90KDa, ela é responsável pela replicação e transcrição viral (Azad et al., 1985; Taken et al., 2002). Essa proteína é encontrada na forma livre e ligada ao genoma e desempenha um importante papel na encapsidação da partícula viral (Morgan et al., 1988; Spies et al., 1987; Van Den Berg et al., 2000). A VP1, na forma livre, o seu sítio ativo encontra-se fechado, para ocorrer a polimerização

é necessário que a extremidade carboxiterminal da VP3 que contém cinco resíduos de aminoácidos carregados negativamente se liguem a cinco aminoácidos de carga positiva da VP1, quando essa ligação ocorre, expõe o sítio ativo para iniciar a polimerização, quando ocorre a síntese dos primeiros fragmentos de RNA a VP3 se desliga da VP1 (Garriga et al., 2007). Estudos demonstraram que mudanças de aminoácidos nas posições 4 (isoleucina [I] por valina [V]), 61 (valina [V] por isoleucina [I]), 145 (asparagina [N] por treonina [T]), 287 (treonina [T] por alanina [A]), 508 (arginina [R] por lisina [K]), 511 (arginina [R] por asparagina [N] ou serina [S]), 646 (glicina [G] por serina [S]) em 687 serina (S) ou arginina (R) por prolina (P), todos localizados fora do *RNA dependent RNA polymerase motifs* RdRp (aminoácidos 411-422, 483-499, 427-440), podem alterar a conformação e a atividade dessa proteína, contribuindo dessa maneira para o aumento da virulência do vvIBDV (Yamaguchi et al., 1997).

O genoma da linhagem vvIBDV *Harbin* possui em seu segmento A uma região não codificante (NCR) 5' que contém 96 nucleotídeos e a região 3' com 95 nucleotídeos. Já no segmento B, a região 5' NCR contém 111 pb e a região 3' contém 79 pb. A NCR 3' do genoma do IBDV contém elementos regulatórios que são importantes para a replicação do RNA e expressão gênica, além de possuírem alças que protegem o genoma viral do ataque de exonucleases (Boot & Pritz-Verschuren., 2004; Xia et al., 2008).

Estudos anteriores mostraram que a linhagem vvIBDV possui seis mudanças de nucleotídeos nesta região, sendo quatro no segmento A [45 uracila (U), 47 adenina (A), 86U e 3205 citosina (C)] e duas no segmento B (63 A e 2786 C), causando assim, uma transformação na estrutura da região NCR. Essas mudanças nucleotídicas e estruturais podem ser parcialmente responsáveis pelo aumento na virulência das linhagens vvIBDV além de poder ser utilizada como referência para a identificação das mesmas. No segmento A de todos vvIBDV, a alça em forma de grampo nas regiões 3174-3188 pode funcionar como um terminal reconhecido pela VP1; já no segmento B, a estrutura *flask-shaped* da porção 5', o não pareamento 9 U e 90 U e a pequena estrutura de alça em forma de grampo formado pelos nucleotídeos 7-22 são conservados em todos os IBDV (Xia et al., 2008).

A estrutura em raio X da VP2 revelou que essa proteína encontra-se enovelada em três domínios distintos, designados como: Base (B), Shell (S) e Projeção (P) (Coulibaly et al., 2005; Lee et al., 2006). Os domínios B e S são formados pelos grupos amino e carboxílico terminais da proteína, enquanto que, o domínio P compreende a região hipervariável. No pico A (aminoácidos 212-224) da região hipervariável, está localizado o *looping* PBC e no pico B (aminoácidos 314-325) o *looping* PHI, sendo essas as regiões mais salientes do domínio P, que contém aminoácidos importantes para a variação antigênica (Vakharia et al., 1994) e também críticos

para a virulência viral (Schnitzler et al., 1993). Além desses, dois *loopings* adicionais, PDE e PFG, contendo os resíduos 253 e 284, respectivamente, desenvolvem um papel na infectividade em cultivo celular e na patogenicidade nas aves (Lim et al., 1999). No entanto, poucos resíduos de aminoácidos contribuem para a antigenicidade viral, sendo determinado que apenas cinco resíduos localizados em dois *loopings* estruturais (PBC-aminoácido 222 e PHI-aminoácidos 318, 321, 323 e 330) no domínio P da VP2 modulam intensamente a sua imunoreatividade (van Loon et al., 2002). Além desses aminoácidos, existe o heptapeptídeo (posições 326-332) que é rico em serina (S), serina (S)-triptofano (W)-serina (S)-alanina (A)-serina (S)-glicina (G)-serina (S), ele tem sido relacionado com a virulência uma vez que mostra-se conservado em todas as linhagens de vvIBDV (Brown et al., 1994). No entanto, também foi demonstrado que todos os vvIBDV e atIBDV possuem quatro resíduos de serina (S) dentro dessa região (Yamaguchi et al., 1996).

No estudo feito por Letzel et al (2007) uma mutação de prolina (P) para serina (S) na posição 222 não influenciou na replicação viral em cultivo de células de embrião de galinha. Em contraste, todas as mudanças de aminoácidos no *looping* PHI influenciaram na replicação do mutante correspondente, uma vez que estes cresceram em baixos títulos (TCID 50/mL) em todos os pontos investigados, indicando que os três resíduos 318, 321 e 323 no *looping* PHI são importantes para a replicação viral em cultivo celular. É possível que substituições nesse *looping* resultem em baixa eficiência do agrupamento da partícula viral por alterar o enovelamento da VP2 ou por desestabilizar o virion. Em outro estudo, 113 amostras da bursa de Fabricius de aves provenientes de 4 continentes envolvendo 18 países foram analisadas por Jackwood & Wagner-Sommer (2007) e constataram que a maioria dos vírus (62,8%) continham o aminoácido alanina (A) na posição 222 da região hipervariável da VP2 e em 59,2% a isoleucina (I) foi encontrada nas posições 242, 256, 294 e serina (S) na posição 299, sendo esses aminoácidos altamente conservados entre linhagens vvIBDV. O aminoácido alanina (A) foi observado na posição 222 em 71 linhagens vvIBDV, prolina (P) em 22, serina (S) em 10, treonina (T) em 8 e glutamina (Q) em apenas 2 linhagens (Banda & Villegas, 2004; Hoque et al., 2001; Rudd et al., 2002).

Quando o fenômeno ressortimento ocorre em um vírus de RNA multi segmentado, surgem novos vírus que diferem em patogenicidade ou antigenicidade (Raming, 1997; Ohashi et al., 2004; Nikolakaki et al., 2005). O melhor exemplo pode ser demonstrado pela pandemia devastadora da Gripe Espanhola causada pelo vírus Influenza A em 1918 (Russel & Webster, 2005). No ano de 2006 foi encontrado um IBDV que sofreu esse fenômeno. Ele possuía o genoma do segmento A de um vvIBDV, porém o genoma do segmento B originava-se de um vírus não muito virulento. Esse isolado mostrou patogenicidade significativa reduzida quando comparado com uma linhagem típica do vvIBDV, demonstrando que o determinante sobre o

genoma do segmento A pode não ser suficiente para induzir a hipervirulência típica do vvIBDV (Le Nouen et al., 2006). Ambos os segmentos, A e B, de uma linhagem chinesa (Harbin-1) foram analisados separadamente por Xia et al, (2008), e os resultados demonstraram que o segmento A teve uma relação próxima com linhagens vvIBDV de países da Europa, África, Países Baixos, Japão, Reino Unido e da própria China. Já o segmento B foi agrupado somente com outra linhagem chinesa (Gx). Deste modo foi sugerido que o segmento A da linhagem Harbin-1 é proveniente de uma linhagem vvIBDV e enquanto que o segmento B originou-se de um ancestral viral não identificado, mantido em aves ou em outro hospedeiro. Contudo essa evolução ainda precisa ser melhor caracterizada (Hon et al., 2006; Van Den Berg, 2000; Yamaguchi et al., 1997).

2.1.2 Sorotipos

Existem dois sorotipos de IBDV: sorotipos 1 e 2. Todos os vírus capazes de causar doença nas aves pertencem ao sorotipo 1, os quais apresentam uma distribuição cosmopolita e, portanto, está presente na maioria dos plantéis comerciais. Os vírus pertencentes ao sorotipo 2 podem infectar galinhas, patos e perus mas não são patogênicos para nenhuma dessas espécies (Jackwood et al., 1982; McFerran et al., 1980; McNulty & Saif, 1988). Esse sorotipo também foi isolado de um pingüim-do-pé-preto (*Spheniscus demersus*) mostrando assim a presença de outros possíveis hospedeiros naturais do IBDV (Jackwood et al., 2005). No entanto, Abdel-Alim & Saif, (2002) demonstraram que a linhagem OH do sorotipo 2 foi patogênica para embriões de frangos depois de cinco passagens em ovos embrionados, o que foi evidenciado pelas lesões nos embriões que apresentaram congestão, necrose no fígado e aumento do baço. Nesse mesmo estudo foram detectados anticorpos neutralizantes contra a cepa inoculada em frangos e perus, porém esta não foi patogênica para essas espécies.

Os sorotipos 1 e 2 são distinguidos por provas laboratoriais diretas que permitem a tipagem do vírus, e indiretas que são úteis para comprovação da presença de anticorpos ou do antígeno específico. Exames sorológicos de aves aquáticas e selvagens de vida livre sugeriram que diversas espécies de aves migratórias tais como *Somateria mollissima*, *Larus argentatus*, *Somateria fischeri* e aves sedentárias incluindo pombos (*Columbia Livia*), garça (*Ardeola ibis*), corvo (*Corvus corone*) e pingüins da Antártida (*Pygoscelis adeliae*) dentre outras, podem também ser reservatórios do vírus (Gardner et al., 1997; Fabohun et al., 2000; Howie et al., 1981; Júnior & Macari, 2000; Kasanga et al., 2008).

Wang et al, (2007) analisaram a sequência da VP3 e VP5 de uma linhagem vvIBDV antes e após cada passagem em célula de fibroblasto de embrião de galinha (CEF), realizando um total de 20 passagens. No decorrer do processo, mudanças de aminoácidos foram ocorrendo até que o vírus tornou-se totalmente atenuado sendo a 9º passagem considerada como um ponto intermediário, pois esta continha uma mistura de vvIBDV e atIBDV. Esse fato foi confirmado no estudo da patogenicidade em aves, onde a 1º passagem apresentou uma taxa de mortalidade de 64%. Quando foi realizada a 9º passagem a taxa caiu para 28%, e já na 10º passagem foi para 0%, se mantendo assim até a última passagem. Em outro estudo realizado pelos mesmos autores em 2004, mudanças na sequência de aminoácidos da proteína VP2 alcançaram o mesmo ponto de transição no mesmo tipo de cultivo e a virulência que foi de 32% na passagem CEF-9 passou para 0% em CEF-10 e mantendo-se assim até o final.

2.1.3 Epidemiologia

A doença de Gumboro foi descrita inicialmente em 1962, na cidade de Gumboro nos Estados Unidos daí a sua denominação (Cosgrove. 1962). Até 1987, os isolados de IBDV eram de baixa virulência causando uma mortalidade específica menor do que 2% e a doença era facilmente controlada por vacinação. Contudo, nos últimos anos, o surgimento de variantes antigênicas e de cepas de alta virulência, capazes de produzir doença clínica mesmo em animais vacinados, tem ressaltado a sua importância devido às perdas econômicas significativas que esta tem causado em todo o mundo (Flores. 2007).

Um surto severo e agudo do IBDV foi descrito na Europa em 1988, caracterizado por doença clínica progressiva e aguda, levando a uma alta taxa de morbidade e mortalidade nos plantéis afetados (Chettle et al., 1989). A partir daí, outros surtos foram descritos nos países da Europa tais como Polônia, Eslovênia, Macedônia, Bulgária e Itália (Domanska et al., 2003; Zormam-Rojs et al., 2003) em Israel, no Oriente Médio (Pitcovski et al., 1998), e em países da Ásia como China, Bangladeshi, Japão, Malásia, e Iran (Cao et al., 1998; Islam et al., 2001; Nunoya et al., 1992; Phong et al., 2003; Razmyar & Peighambari., 2008; Sun et al., 2003), na Nigéria, África (Zierenberg et al., 2000), e por fim na América do Norte e Latina, em países como Estados Unidos, Brasil, Argentina e Uruguai (Di Fabio et al., 1999; IKuta et al., 2001; Dias et al., 2004; Paula et al., 2004; Hernández et al., 2006 ; Remorini et al., 2006; Stoute et al., 2009).

Letzel et al. (2007) caracterizaram um novo isolado europeu na Bélgica (Bel-IBDV) pelo fato deste isolado não apresentar uma reatividade padrão caracterizada pelo reconhecimento dos anticorpos monoclonais (MAb) B69, R63, 10 e 67. Esse vírus apresentou uma sequência diferente de aminoácidos na região hipervariável da VP2. Diante disso, esses autores sugeriram três hipóteses: mutações ocorreram em linhagens circulantes na Europa, novos vírus foram introduzidos no continente ou essa linhagem poderia já estar circulando e, no entanto, ainda não tinha sido detectada. Essas hipóteses reforçam assim, a necessidade de um estudo contínuo das linhagens de campo para produção de vacinas.

Análise das linhagens de IBDV associadas com o surto clínico severo do vírus no Brasil, República Dominicana e Venezuela comprovaram a existência de sequências características de nucleotídeos e aminoácidos da região da VP2 que também estão presentes nos vírus da Europa, Ásia e África. Esses resultados podem sugerir que a linhagem do vvIBDV detectada na América Latina pode ter origem a partir de linhagens do vvIBDV que foram prevalentes em outras partes do mundo, especialmente na Europa e Ásia. Entretanto, como essas linhagens alcançaram as Américas ainda é desconhecido. Deste modo, o estudo contínuo das características genéticas de novas viroses emergentes e o estabelecimento de suas relações genéticas são chaves importantes para a compreensão da epidemiologia da doença (Banda A. & Villegas P. 2004).

No Brasil, até meados da década de 90 a doença era subclínica, sendo observado hipotrofia da bursa e problemas secundários decorrentes da imunodepressão, uma vez que as vacinas comerciais disponíveis no mercado conferiam proteção satisfatória (Leffer. 2004).

Em um estudo feito por Remorini et al., (2006), sequências do genoma de linhagens brasileiras de IBDV, disponíveis no GenBank foram comparadas com as sequências de nucleotídeos e aminoácidos da região da VP2 de amostras provenientes da Argentina. Os resultados mostraram uma identidade em torno de 96% na sequência de aminoácidos entre isolados subclínicos brasileiros e os clássicos virulentos argentinos, sendo que a identidade dos aminoácidos do vvIBDV presente no Brasil e uma dessas linhagens argentinas chegou a 98%. Em 1997 foi relatado no Brasil um vírus que apresentou características antigênicas e moleculares de linhagens européias de vvIBDV, contudo desde que a linhagem vvIBDV emergiu na América Latina, poucas informações tem sido publicadas na literatura científica (Di Fabio et al., 1999).

Assim, a tipagem genética de acordo com a sequência da VP2 tem sido amplamente utilizada para traçar a dispersão do vírus e mudanças na sua virulência. Estas informações auxiliam os epidemiologistas a traçarem a origem viral e a monitorar sua dispersão (Hon et al., 2006; Jackwood & Sommer-Wagner, 2007; Yamaguchi et al., 1997).

Uma vez infectada, a ave elimina o vírus para o ambiente através das fezes, ocorrendo à contaminação pelas vias aéreas, digestiva e ocular, sendo a transmissão tida somente como horizontal. A doença apresenta uma alta morbidade enquanto que a mortalidade é dependente do *status* imunitário das aves e do ambiente em que estas são criadas (Santos et al., 2005).

Um dos fatores que aumentam o índice de surtos nas granjas é a condição do ambiente. Quando o ambiente está muito contaminado, densamente povoado e seco, pode ocorrer à formação de poeiras infecciosas e, conseqüentemente, o vírus irá infectar a ave via conjuntival ou respiratória. Um dos principais agentes disseminadores do vírus é o próprio homem, contudo, este pode manter sua capacidade de infecção por até 8 semanas dentro de alguns vermes e restos de matéria orgânica (Júnior & Macari, 2000). Além disso, estudos comprovaram que pode ocorrer contaminação das aves através de fezes de cães (*Canis lupus familiares*), ratos (*Mus musculus*), aves selvagens (*Larus crassirostris*, *Ana poecilorhyncha*, *Pica pica*, *Anas platyrhynchos*, *Anser fabalis*, *Anser albifrons*), mosquitos (*Aedes vexans*), larvas de insetos (*Alphitobius diaperinus*), aerossóis, poeira e penas, atuando assim como reservatórios virais (Howie & Thorsen, 1981; Pagès-Manté et al., 2004; Jeon et al., 2008; Kasanga et al., 2008; Park et al., 2009).

O IBDV é bastante resistente às condições ambientais, sobrevive a 60°C por 60 minutos e em pH entre 3 e 9, o que dificulta o combate à infecção. Compostos iodados possuem ação contra o vírus, o que não ocorre com derivados do fenol e compostos quaternários da amônia que exigem uma maior concentração do desinfetante e um maior tempo de ação. A alta resistência do vírus aos diferentes compostos acarreta em uma longa sobrevivência deste nas instalações, mesmo quando rigorosas medidas de limpeza e desinfecção são aplicadas. Além disso, a diminuição do período de vazio sanitário e a maior concentração de aves/m² também colaboram para a persistência do vírus no campo. Assim, a contaminação ambiental é, portanto, um dos pontos mais importantes a ser evitado, pois, uma vez infectado com IBDV, a descontaminação torna-se muito difícil (Júnior & Macari, 2000).

A presença do IBDV nas aves após o abate tem levado alguns pesquisadores a estudar o risco associado a introdução de linhagens viral inativadas em mercadorias a serem exportadas. Jackwood et al. (2007) comprovaram que a quantidade de radiação gama (3,0 KiloGrays) aprovada pela U.S Food and Drug Administration (FDA) não é eficiente para reduzir a introdução do IBDV pelas aves comercializadas como produtos alimentícios.

2.1.4 Patogenia

A IBD é uma doença caracterizada por ser altamente contagiosa em aves jovens. A infecção das aves pelo vírus resulta em imunodepressão, aumento da incidência de falhas vacinais além de infecções secundárias (Santos et al., 2005).

Os isolados virais pertencentes ao sorotipo 1 possuem tropismo por pré-linfócitos B em divisão na bursa, causando uma depleção linfóide através da indução da apoptose dessas células produtoras de imunoglobulinas, imuno-deprimindo assim, as aves acometidas. Uma vez que o mecanismo de apoptose é considerado uma defesa do organismo e ocorre quando uma célula é infectada por um agente infeccioso buscando limitar assim a propagação deste, foi sugerido que a proteína VP5 do IBDV possa ter uma função antiapoptótica durante o estágio inicial da replicação viral. Além disso, após a infecção pelo vírus, a função das células T *Helper* e apresentadoras de antígenos podem estar também alteradas (Sharma et al., 2000; Liu & Vakharia., 2006).

Nas aves, 4 horas após infecção por via oral o vírus pode ser detectado nas tonsilas cecais e no ceco e logo após no duodeno e fígado, se espalhando assim para outros órgãos até chegar à bursa de Fabrícus onde permanece (Muller et al., 1979). A severidade da doença está relacionada com a quantidade de células susceptíveis presentes na bursa e por isso, a idade de maior susceptibilidade é entre a 3^o e a 6^o semana, quando esse órgão está em desenvolvimento. Após a multiplicação do vírus nos pré-linfócitos B e a destruição dessas células, estes são disseminados pelo organismo, causando a doença clínica que pode levar a morte das aves (van den Berg, 2000).

Os sinais clínicos associados com doença aguda incluem anorexia, depressão, penas eriçadas, diarreia, prostração e morte. Já a doença subclínica, que é a forma mais importante da doença, manifesta-se com baixa mortalidade e severa imunodepressão. Os achados de necropsia da fase aguda mostram hemorragias nos músculos esqueléticos, principalmente na coxa, perna e mucosa do pró-ventrículo, rins pálidos e aumentados de volume, timo diminuído de volume e bursa aumentada de volume devido à presença de hiperemia, edema, exsudação e infiltração inflamatória, podendo haver também hemorragia. Na doença subclínica, observa-se severa depleção linfóide não apenas na bursa, mas também em outros órgãos linfóides (Sharma et al., 2000).

A linhagem clássica e a vvIBDV levam a 30-60% e 60-100% de mortalidade, respectivamente (Cao et al., 1998). Ambas causam inflamação hemorrágica na bursa enquanto que as linhagens avIBDV (GLS e E/DEL) geram uma atrofia desse órgão, sem provocar uma

resposta inflamatória, indicando assim, diferenças no processo apoptótico celular e na patogênese da doença (Liu & Vakharia, 2006). As aves que sobrevivem à fase aguda da doença eliminam o vírus e se recuperam da doença clínica (Sharma et al., 2000).

2.1.5 Controle e Prevenção

Devido à alta resistência do IBDV às condições ambientais e sua distribuição global, métodos de biosseguridade associados à vacinação das aves são essenciais para o controle e prevenção da IBD o que tem sido um dos grandes desafios da avicultura mundial.

Solano et al, (1986) avaliaram a influência dos níveis de anticorpos maternos em frangos após a primeira vacinação contra IBDV e determinaram que uma melhor resposta imune ocorre quando as aves são vacinadas aos 28 dias de idade. Por outro lado, Kumar et al. (2000), considerou 21 dias como a idade ideal para vacinação, uma vez, nos estudos realizados, os anticorpos maternos não foram mais detectados, não interferindo, portanto na replicação da vacina viral.

Após vacinarem 2 grupos de aves com uma linhagem intermediária do IBDV (078) em diferentes intervalos de tempo, Kabell et al, (2005) inocularam em seguida uma linhagem vvIBDV (01). Os resultados demonstraram a presença do vírus na bursa, timo, medula óssea e amostras de *swab* em um pequeno número de aves indicando, desta forma, que mesmo que as aves de granja tenham sido vacinadas elas possuem a capacidade de disseminar o vírus. Outro exemplo de detecção do vírus em aves vacinadas ocorreu no estado de São Paulo, onde Tessari et al, (2001) diagnosticaram a IBD causada por cepas hipervirulentas em 6 aves de postura com 5 semanas de idade. Esses pesquisadores acompanharam o desempenho dos próximos lotes alojados, e estes também apresentaram a IBD, mesmo após estes terem sido vacinados com vacinas clássicas do tipo, intermediária.

Com intuito de aumentar a segurança das vacinas e diminuir a utilização de animais na preparação destas, proteínas virais recombinantes têm sido utilizadas como uma alternativa satisfatória para o controle de doenças infecciosas (Huang et al., 2004; Pitcovski et al., 2003; Perozo & Brow, 2007). Villegas et al. (2008) demonstraram que frangos vacinados com a VP2 não apresentaram morbidade e nem mortalidade quando comparados com outro grupo que foi vacinado apenas com a região hipervariável dessa proteína e apresentou 30% de morbidade e mortalidade. Em outro trabalho, Perozo et al. (2008) demonstraram que a *Recombinant avian adeno-associated virus*, expressando a VP2 (rAAV-VP2) em aves livre de patógenos

específicos (SPF), induziu uma imunidade protetora que pode ser verificada após essas aves terem sido vacinadas e em seguida, desafiadas com vvIBDV (Edgar). Além disso, a vacinação dessas aves com a rAAAV-VP2 não afetou o tecido linfóide bursal, demonstrando assim seu potencial para ser utilizada em aves jovens. Do mesmo modo, Wu et al. (2004) demonstraram que a utilização de uma vacina comercial em aves, seguida por uma imunização das mesmas com a VP2 expressa em planta (*Arabidopsis thaliana*) produziu nessas aves, uma proteção de 90% (27/30) contra a linhagem variante E.

Deng et al. (2007) identificaram na VP3 dois epítomos lineares, correspondentes aos aminoácidos 109-119 (VP3) e 864-874 (poliproteína) e aos aminoácidos 177-190 (VP3) e 932-945 (poliproteína), que apresentaram uma boa imunogenicidade e reatogenicidade, uma vez que foram capazes de induzir a produção de anticorpos contra IBDV em camundongos fêmea da linhagem BALB/c com idade entre 6 a 8 semanas. Além disso, a análise de homologia entre 12 linhagens IBDV revelaram que essas sequências são conservadas nas linhagens vvIBDV (D6948, HK46, UK661, BD399), cvIBDV (GLS e STC) e atIBDV (GT, CEF94, CU1, D78) e no sorotipo 2 (OH). Entretanto, mais estudos são necessários para melhor compreensão dessas características da VP3.

Segundo Rassol & Hussain (2006), após três passagens para adaptação de uma linhagem de vvIBDV em células VERO, seguida de uma série de nove passagens, foi possível atenuar o vírus. Este foi eficaz, uma vez que após terem sido vacinadas com esse vírus, as aves foram desafiadas e não desenvolveram a doença. Assim, ele se mostrou altamente imunogênico e não patogênico quando comparado com a vacina viva cultivada em células, disponível atualmente no mercado. Além disso, o título de anticorpos foi significativamente maior no grupo desafiado com o vírus atenuado comparado com o outro grupo vacinado com a vacina comercial. Os resultados também mostraram que os anticorpos contra a vacina comercial promoveram uma proteção parcial das aves desafiadas com o vvIBDV e não foram capazes de evitar a doença.

Em um estudo realizado na China, Wei et al., (2008) determinaram a sequência completa de nucleotídeos de uma linhagem do IBDV *reassortant* com segmentos A e B derivados de atIBDV e vvIBDV. Os achados sugeriram que a troca genética entre essas duas linhagens do IBDV aumenta o risco da geração de um novo vírus quimérico que não pode ser controlado com a utilização de vacinas vivas e atenuadas disponíveis atualmente no mercado. A identificação dessa nova linhagem de IBDV *reassortant* é uma ferramenta importante para estudos futuros do tropismo celular, virulência e evolução do IBDV. Com isso, a partir dos resultados encontrados neste estudo, foi sugerida a utilização de uma vacina viva, além da necessidade de se desenvolver novas vacinas para o controle viral. Nesse estudo, também foi descrito que com a

descoberta de um vírus *reassortant in natura*, existe um maior risco na utilização da vacina viva do IBDV, pois esta pode atuar como um doador genético para que esse fenômeno ocorra. Wei et al., (2006) identificaram um *reassortant* IBDV Chinesa (ZJ2000), cujo segmento A é derivado de uma linhagem atIBDV e o segmento B é derivado de um vvIBDV, e demonstraram que esse vírus *reassortant* assim como o vvIBDV clássico apresentaram a mesma virulência em aves SPF.

Ikuta et al. (2001), após amplificarem um fragmento de 248pb que inclui a região hipervariável da VP2, de dez amostras vacinais e quarenta e oito amostras brasileiras de campo, realizaram um ensaio de restrição utilizando as enzimas *DraI*, *SacI*, *StyI*, *TaqI* e *MvaI* e verificaram que 65% desses isolados virais brasileiros apresentaram quatro padrões diferentes das amostras já descritas, constatando assim, a presença de novas linhagens no Brasil, diferentes das utilizadas atualmente para a produção de vacinais.

Utilizando uma vacina patogênica intermediária e uma vacina de vvIBDV, Moraes et al., (2004) verificaram que ambas foram capazes de causar uma severa destruição na bursa de Fabrício das aves vacinadas, resultando em uma depleção linfocitária de até 90%. As lesões histopatológicas também foram compatíveis com as lesões causadas pela doença induzida por uma linhagem viral patogênica de campo. Desse modo é necessário verificar o grau de patogenicidade de uma vacina antes de utilizá-la em um programa de vacinação.

Não somente estudos com vacinas vêm sendo desenvolvidos. Gao et al., (2008) selecionaram três pequenos RNAs de interferência (siRNA) baseados na região conservada do gene VP1 do IBDV (regiões 618, 1115 e 2571), e através das técnicas de imunofluorescência indireta e da reação da polimerização em cadeia em tempo real (qRT-PCR), confirmaram que o nível da expressão da VP1 diminuiu os níveis de proteína e RNAs, quando comparado com o grupo controle. A taxa de inibição da replicação foi maior que 80% entre os grupos e o efeito do siVP1 2571 foi maior que 93,3% nas células VERO infectadas utilizadas no experimento. Porém os autores concluem que mais estudos são necessários para determinar se tal tratamento oferece uma real proteção contra o IBDV *in vivo*.

2.1.6 Diagnóstico

Métodos moleculares podem identificar e caracterizar IBDVs ajudando a compreender a base molecular da sua variação antigênica e da sua patogenicidade. Estas informações podem ser utilizadas para o desenvolvimento de métodos de detecção mais efetivos, assim como na

produção de vacinas e seus testes de eficácia destas (Dormitorio et al., 2007). Assim, algumas técnicas de biologia molecular, como *reverse transcription polymersase chain reaction* (RT-PCR), *restriction fragment length polymorphism* (RFLP), *Western blotting* e qRT-PCR, vêm sendo atualmente utilizadas com sucesso, para diagnóstico e diferenciação das variantes patogênicas de IBDV (Pereira et al., 1998; Wu et al., 2007).

A clivagem da região hipervariável do gene da VP2 com as enzimas de restrição *MboI*, *SacI*, *Taq*, *BspNI* ou *SspI* também foram determinadas como uma ferramenta rápida e confiável para diferenciar a linhagem virulenta clássica da linhagem vvIBDV (Lin et al., 1993; Jackwood & Sommer, 1999; Zierenberg et al., 2001).

Jeon et al. (2008) isolaram cinco linhagens diferentes do IBDV de aves selvagens (*Anser albifrons*, *Anser fabalis*, *Anas platyrhynchos* e *Pica pica*) no Sul da Coreia e a análise filogenética revelou que essas linhagens foram altamente relacionadas às linhagens de vvIBDV, pertencente ao sorotipo 1. Os resultados desse estudo epidemiológico, baseado na sequência da região hipervariável do gene da VP2, indicaram que os IBDVs isolados das aves selvagens são relacionados às linhagens de IBDVs isolados de galinhas domésticas em regiões endêmicas, sugerindo, portanto a existência de uma ligação epidemiológica entre os vírus que infectam galinhas domésticas e aves selvagens (Kwon et al., 2000; Liu et al., 2002; Kim & Yeo, 2003).

2.1.7 Impacto econômico

O impacto econômico causado pela IBD é influenciado pela virulência da cepa viral, pela susceptibilidade das aves, pela concomitância de patógenos primários e secundários, além de fatores ambientais e de manejo (Müller et al., 2003). Assim, entre os anos de 2005 e 2009*, 237 surtos foram registrados nos estados de Santa Catarina, Rio Grande do Sul, Paraná, São Paulo, Mato Grosso do Sul, Rio de Janeiro, Bahia e Sergipe onde o total de aves mortas e sacrificadas chegou a 868.054, de acordo com os dados fornecidos pela Organização Mundial de Saúde Animal como mostra o tabela 1.

Tabela 1: Número de aves acometidas no Brasil pelo IBDV entre os anos de 2005 e 2009

AVES	2005	2006	2007	2008	2009	TOTAL
Casos	641.290	56.472	758.084	38.133	291.296	1785.275
Mortes	34.785	9.377	632.078	14.192	46.986	737.418
Susceptibilidade	N.R	51.078	N.R	996.285	1.006.580	2.053.945
Sacrificadas	0	0	74.900	50.736	0	125.636
Surtos	104	15	37	36	45	237

(Fonte: OIE, http://www.oie.int/wahis/public.php?page=disease_status_detail – Acessado no dia 28/06/2010 às 14:30 hs.). Legenda: N-R-Não registrado *período de janeiro 2005-dezembro 2009.

3. OBJETIVO GERAL

O objetivo geral desse trabalho foi realizar uma análise comparativa das sequências da região hipervariável da VP2 do IBDV isoladas da bursa de Fabrícus de aves originadas de municípios da Zona da Mata do estado de Minas Gerais, além de avaliar a possível ocorrência de novas linhagens variantes virais circulantes em campo.

3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Coletar amostras da bursa de Fabrícus de aves devidamente catalogadas de regiões produtoras de três municípios localizados na Zona da Mata do estado de Minas Gerais;
- Isolar o RNA viral e produzir cDNAs que contenham a região genômica que codifica a região hipervariável da proteína do capsídeo externo (VP2);
- Amplificar os cDNAs pela reação da polimerização em cadeia (PCR), clonar e sequenciar os produtos desta reação;
- Comparar as sequências de nucleotídeos obtidas com outras sequências disponíveis no GenBank e supor uma provável classificação de acordo com a apresentação de suas sequências de aminoácidos da região hipervariável e posição no clado da árvore filogenética;
- Comparar a sequência da região hipervariável da VP2 dos vírus encontrados com sequências disponíveis no GenBank para verificar se os vírus detectados são de origem vacinal ou se houve infecção da ave mesmo sendo ela vacinada.

4. METODOLOGIA

Este estudo foi realizado no Laboratório de Infectologia Molecular Animal (LIMA), localizado no Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária (BIOAGRO) da Universidade Federal de Viçosa.

4.1 Amostras virais

Foram analisadas oito amostras da bursa de Fabrícus, obtidas de aves necropsiadas do estado de Minas Gerais, provenientes da região de Canaã (quatro), Visconde do Rio Branco (três) e Guiricema (uma) com suspeita de IBD. As amostras foram coletadas no período de março de 2009, enviadas ao LIMA, devidamente identificadas e acondicionadas sob refrigeração e em seguida, elas foram armazenadas a -80° C até o momento da extração do RNA viral.

Para cada amostra cedida foi preenchido um questionário pelos técnicos responsáveis com informações sobre o animal e a granja. Todas as aves possuíam idade variando entre 30 e 33 dias. Não foi realizado diagnóstico anatomopatológico de nenhuma ave e nem houve *sinais clínicos da doença. Todas elas foram vacinadas com Bursine-2 Fort Dodge (vacina viva, cepa intermediária Lukert, não clonada). As medidas de desinfecção adotadas pelos produtores era utilização de produtos virucidas (produto não informado), compostagem de carcaça, fermentação da cama em caso de reaproveitamento.

* Uma amostra fornecida de Visconde do Rio Branco teve a informação de sinais clínicos omitida.

4.2 Extração do RNA total

Para extração do RNA total, amostras de 0,2 g da bursa de Fabrícus foram trituradas manualmente, em seguida homogeneizadas em 750 µL de TRIZOL LS (Invitrogen) e centrifugadas a 12.000 x g por 10 minutos a 4°C. Após a separação completa das fases, o sobrenadante foi transferido para um novo tubo de microcentrífuga de 1,5 mL, seguido da adição de 250µL de clorofórmio e um repouso de 10 minutos a temperatura ambiente. Em seguida a amostra foi centrifugada a 12.000 x g por 15 minutos a 4°C para separação das fases e o sobrenadante transferido para um novo tubo de microcentrífuga de 1,5 mL contendo 500 µL de isopropanol. Essa mistura foi homogeneizada por inversão manual e incubada durante a noite. Na segunda etapa o RNA foi precipitado a 12.000 x g por 10 minutos a 4°C e o sobrenadante removido. Os precipitados obtidos foram lavados com 1000 µL de etanol 75% gelado e centrifugados a 7.500 x g por 5 minutos a 4°C. Logo após, o etanol foi removido e os tubos foram invertidos em cima de uma folha de papel a temperatura ambiente até a secagem completa do etanol. O conteúdo foi ressuspenseo em 20 µL de água ultra pura estéril. As concentrações das amostras de RNA foram calculadas utilizando leitura da densidade ótica (OD) a 260nm em espectrofotômetro nanodrop (Evolution 60 Thermo scientific) e utilizadas para o estudo da região hipervariável do gene da VP2.

4.3 Oligonucleotídeos

Os oligonucleotídeos utilizados para a produção do cDNA e para *Polymerase Chain Reaction* (PCR) incluíram toda a região hipervariável da VP2 localizado no segmento A. Para produção do cDNA foi utilizado o oligonucleotídeo anti-senso (VP2F) 5' -CCT GTT GCC ACT CTT TCG TA-3' e para a PCR foram utilizados, o mesmo oligonucleotídeo anti-senso juntamente com um oligonucleotídeo senso (VP2F) 5' -CCA GAG TCT ACA CCA TAA- 3'. O fragmento amplificado correspondeu aos nucleotídeos 739 a 1210 e possuía um tamanho de 472pb de acordo com Maw et al. (2008).

4.4 RT-PCR

Para a síntese do cDNA foi utilizado o kit SuperScriptTM III First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen). Uma mistura com 1 µL de RNA (1µg), 1 µL do oligonucleotídeo VP2R (2 pmol) e 1 µL dNTP mix (10 mM) para um volume final 13 µL foi aquecida a 65°C por 5 minutos em um termociclador (MJ RESEARCH, INC – PTC 100) e em seguida colocados no gelo por um minuto. A essa mistura adicionou-se 4 µL de MgCl₂ (25 mM), 2 µL do tampão RT-PCR SuperscriptTM III 10 X (200 mM de Tris-HCl [pH 8.4]), 500 mM KCl, 2 µL de DTT (0,1 M), 1 µL de (RNaseOUT [40U/ µL]) e 1 µL da enzima transcriptase reversa SuperscriptTM III (200 U/µL). Essa mistura foi aquecida a 54°C por 50 minutos e a 85°C por 5 minutos. Em seguida, os tubos foram resfriados no gelo para a adição de 1 µL de RNase H (2 U/µL), incubados a 37°C por 20 minutos e, então, estocados a -20°C.

Para amplificação dos cDNAs sintetizados utilizou-se uma mistura com 2 µL do cDNA, 1 µL dos oligonucleotídeos iniciadores VP2F e VP2R (20 pmol) e 10 µL do mix *GoTaq Green Master* (PROMEGA) (*Taq* DNA polimerase, tampão de reação pH 8, 400 µM de dATP, 400 µM dCTP, 400 µM dTTP, 400 µM dGTP, 3mM MgCl₂) para um volume final de 20 µL. A reação foi realizada em um termociclador (MJ RESEARCH, INC – PTC 100) com um ciclo inicial de desnaturação a 94°C por cinco minutos seguidos por 40 ciclos de 94°C por 30 segundos, 55°C por 30 segundos e 72°C por 40 segundos e uma extensão final de 72°C por 5 minutos. Os produtos amplificados foram analisados por eletroforese em gel de agarose (SIGMA) 1,0%. Para análise do número de bases do produto amplificado foi utilizado o padrão molecular *GeneRuler* 1 kb (FERMENTAS). Os produtos amplificados foram corados com brometo de etídio na concentração de 0,5 µg/mL (SIGMA). A eletroforese ocorreu a 100V em tampão TBE 0,5X (TRIS-Borato-EDTA) e o produto amplificado foi visualizado com luz ultravioleta no aparelho Vilber Loumart TFX-20 M Power 180W.

4.5 Purificação e clonagem do fragmento do material genético viral

Os produtos da PCR de tamanho esperado foram purificados pelo kit Wizard SV gel and PCR Clean-up System (PROMEGA) e clonados utilizando o kit de clonagem pGEM T-Easy Vector System (PROMEGA), de acordo com as instruções do fabricante. A reação de ligação foi constituída de 5 µL de 2x Rapid Ligation Buffer, 1 µL de pGEM-T Easy Vector (50ng), 3 µL do

produto purificado da PCR, 1 μL T4 DNA Ligase (3U/ μL) e 10 μL de água livre de nuclease. A reação de ligação foi incubada a 4°C durante a noite.

4.6 Transformação

Os plasmídeos construídos foram amplificados através da transformação de células competentes *Escherichia coli* DH5- α . Essas células, armazenadas a -80 °C foram retiradas e descongeladas lentamente no gelo por aproximadamente 30 minutos. Cerca de 10 μL da reação de ligação foram adicionadas a 100 μL de células competentes e mantidas no gelo por 30 minutos. Posteriormente, as células foram submetidas a um choque térmico de 42°C por 1,5 minutos. Após o choque térmico, os tubos foram colocados novamente no gelo por 2 minutos. Em seguida, foram adicionados 900 μL de meio LB e os tubos foram incubados a 37°C por 60 minutos a 4 g de agitação. Depois desse período, as células foram plaqueadas em meio seletivo (LB/ampicilina/X-gal/IPTG) e novamente incubadas a 37°C durante a noite. As colônias brancas foram selecionadas para posterior extração de DNA plasmidial.

4.7 Extração de DNA plasmidial

As colônias selecionadas foram crescidas separadamente em 4 mL de meio LB/Ampicilina (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) durante 16 horas a 37°C e 4 g de agitação. O DNA plasmidial dessas colônias foi extraído utilizando o kit GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit (FERMENTAS), de acordo com as instruções do fabricante.

4.8 Sequenciamento das regiões amplificadas do material genético viral

Os plasmídeos recombinantes foram submetidos ao seqüenciamento usando o método de Sanger de alta tecnologia no aparelho 3730xl (laboratório Macrogen, Seoul-Korea) usando os pares de primers M13 forward e reverse.

4.9 Agrupamento por meio de métodos filogenéticos

4.9.1 Análise e alinhamento das sequências

Para as análises filogenéticas, foram selecionadas 98 sequências completas da região genômica codificadora da proteína VP2 disponíveis no banco de dados GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/>. Acessado no dia 16/11/2009) (tabela 2). As sequências da VP2 do GenBank foram alinhadas com as sequências obtidas a partir das nossas amostras virais utilizando o programa ClustalW (Thompson et al., 1994). Através do conjunto de sequências alinhadas, as sequências da região hipervariável da VP2 foram selecionadas para a análise filogenética. É conhecido que a sequência de aminoácidos da região hipervariável da VP2 é utilizada para caracterização viral das linhagens muito virulenta (vvIBDV), atenuada (atIBDV), variante antigênica (avIBDV), cepas clássicas e cepa selvagem (WT). Para analisar as variações dos resíduos de aminoácidos das nossas sequências elas foram alinhadas com as sequências de aminoácidos de outros isolados caracterizados pela literatura (figura 4) utilizando para esta finalidade o programa CLC Main Workbench Version 5.5 (CLC bio).

4.9.2 Análises filogenéticas

A hipótese filogenética foi inferida por Inferência Bayesiana (BI) utilizando o programa MrBayes v3.1 (Huelsenbeck & Ronquist, 2001). As árvores filogenéticas foram calculadas utilizando o método de Bayesian Markov chain Monte Carlo (MCMC) com 10.000.000 de gerações. Para agilizar a construção dessas árvores filogenéticas, um modelo de substituição de nucleotídeos foi estimado utilizando o programa MrModeltest (Nylander et al., 2004). Esta abordagem forneceu ao programa MrBayes os parâmetros a serem estimados, evitando o excesso de parâmetros dos modelos a serem utilizados na estimativa das topologias e tamanho de ramos. Na árvore filogenética, a sequência do IBDV de uma linhagem clássica Australiana 002-73, número de acesso X03993, foi utilizada como grupo externo por ser a mais divergente do conjunto de dados.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Processamento do RNA total

As amostras virais obtidas a partir da bursa de Fabrício de aves com diagnóstico de infecção para o IBDV tiveram o segmento do gene da região hipervariável da VP2 contendo 472pb, amplificados. Para isto, após o isolamento do RNA viral, foi realizado o procedimento RT-PCR utilizando os oligonucleotídeos específicos para a VP2. Assim as amostras 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 e 8 de Minas Gerais foram amplificadas gerando os fragmentos desejados.

Para controle positivo do gene que codifica a região hipervariável da VP2, utilizamos a amostra viral do IBDV-LMVA 0504 sequenciada por Dias et al. (2009).

Os produtos amplificados foram visualizados em gel de agarose 1% e corados com brometo de etídio 0,5 µg/mL (SIGMA) como representado na figura 2.

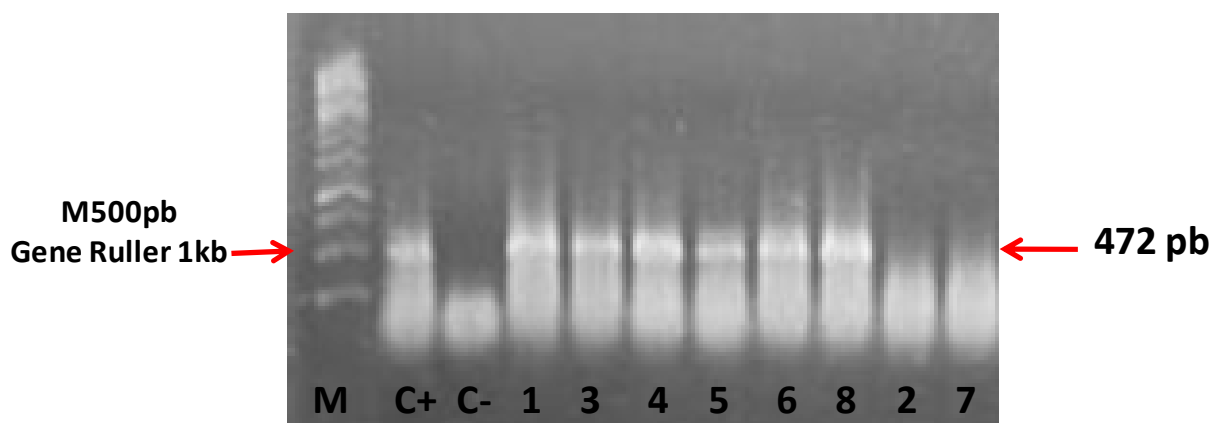


FIGURA 2- Padrão eletroforético dos produtos amplificados de 472pb do gene que codifica a proteína VP2 do IBDV pela reação da RT-PCR. M: GeneRuler 1 kb (FERMENTAS) marcador de 250 pb, (C+) controle positivo (amostra IBDV-LMVA 0504), (C-) controle negativo, amostras 1, 3 e 8 (Visconde do Rio Branco), 4 e 6 (Canaã), 5 (Guiricema) foram positivas para processo de amplificação do fragmento do genoma viral. As amostras 2 e 7 de Canaã foram negativas para o processo de amplificação.

5.2 Análise filogenética das sequências

As sequências de nucleotídeos da região hipervariável da VP2 das amostras virais, obtidas neste trabalho, foram agrupadas filogeneticamente com 98 sequências selecionadas no GenBank (Tabela 2). Na árvore filogenética, essas amostras foram agrupados em nove clados principais e todos eles foram definidos por elevados valores de probabilidade posterior (Figura 3).

O grupo A reuniu nove isolados virais, sendo oito dos Estados Unidos e um do Japão. Apenas o isolado pertencente aos Estados Unidos (AY368653) foi caracterizado pela literatura como sendo uma “cepa selvagem” (Figura 3 e Tabela 3). O grupo B reuniu vinte e sete isolados virais, sendo dois destes (AF499929-Nigéria e AF194428-Holanda) já caracterizados em estudos anteriores como “cepas clássicas” (Figura 3 e Tabela 3). Também foram agrupadas neste clado cepas de diferentes países como China, Estados Unidos, Egito, Espanha, Índia, Alemanha, Nigéria, França, Japão, Holanda, Hungria, Vietnã e Croácia. O grupo C reuniu seis isolados oriundos dos Estados Unidos, Taiwan, Japão e China, sendo dois pertencentes aos Estados Unidos (AY462026 e AY918950) e caracterizados como “cepas clássicas” (Figura 3 e Tabela 3). Apesar de também serem consideradas como cepas clássicas, as cepas AF499929 (Nigéria) e AF194428 (Holanda) foram separadas em clados diferentes das cepas clássicas AY462026 (Estados Unidos) e AY918950 (Estados Unidos), por apresentarem diferenças de aminoácidos nas posições 222, 242, 249, 252, 253, 256, 270, 278, 279, 284, 286, 290 e 330 da região hipervariável da VP2 (Figura 3 e Figura 4). O grupo D reuniu quatro isolados originários do Vietnã, o grupo E um isolado do Brasil e um da Índia e o grupo F um isolado dos Estados Unidos, entretanto, nenhum desses isolados foram caracterizados pela literatura. O grupo G agrupou quatro isolados virais provenientes da França, Austrália e Alemanha sendo que uma delas foi caracterizada como “cepa selvagem” WT (AF362747) (Figura 3 e Tabela 3). Já o grupo I reuniu 43 isolados virais, de países como Coréia do Sul, China, Japão, França, Holanda, Malásia, Tanzânia, Brasil, Reino Unido, Vietnã, Bangladesh, Irã, Croácia, Nigéria, Zâmbia e Austrália, sendo onze delas caracterizadas como muito virulentas “vvIBDV” (AF240686, AF247006, AF508176, AF527039, AF533670, AJ318896, AJ879932, AY099456, AY134874, D49706 e FJ695138), uma como “cepa atenuada” (D83985) e uma como “cepa vacinal” (AB024076). Por sua vez, todas as sequências obtidas a partir das amostras de Minas Gerais, analisadas nesse trabalho, foram incluídas no grupo H e separadas das sequências dos outros países. Dentro do grupo H, os isolados UFV-G1, UFV-G3, UFV-G8 e UFV-G6 foram separados

dos isolados UFV-G4 e UFV-G5 pelo fato de apresentarem diferenças entre si na posição dos aminoácidos 241, 253, 320 e 321 da região hipervariável da VP2 (Figura 3).

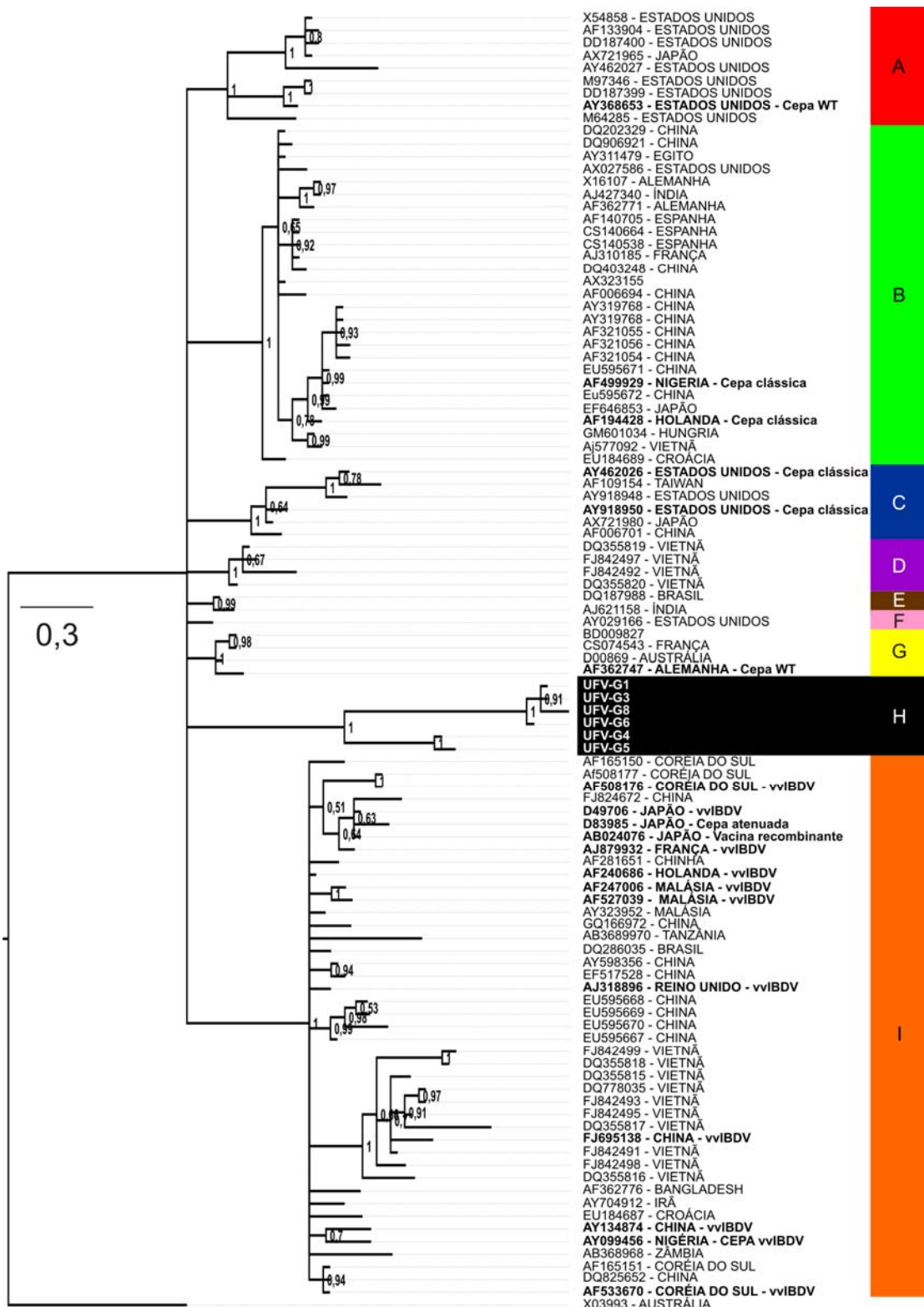


FIGURA 3- Árvore filogenética das seqüências de nucleotídeos da região hipervariável da VP2. Árvore consenso calculada por Inferência Bayesia utilizando o programa MrBayes. Os números próximos aos nós da árvore filogenética indicam os valores calculados de probabilidade posterior. As seqüências das amostras positivas de Minas Gerais UFV-G1, UFV-G3, UFV- G8, UFV- G6, UFV-G4 e UFV-G5 foram comparadas com outras 98 seqüências de diferentes países. Os isolados seqüenciados neste trabalho estão marcados em preto. Os nove clados formados estão representados com as letras de A, B, C, D, F, G, H e I. Por ser mais divergente, o grupo externo

utilizado para a análise foi a linhagem clássica do sorotipo 1 do IBDV, Austrália 002-73 cujo o número de acesso é X03993.

5.3 Análise e alinhamento das sequências de aminoácidos

O alinhamento de aminoácidos da região hipervariável da VP2, foi realizado e estão representados na figura 4.

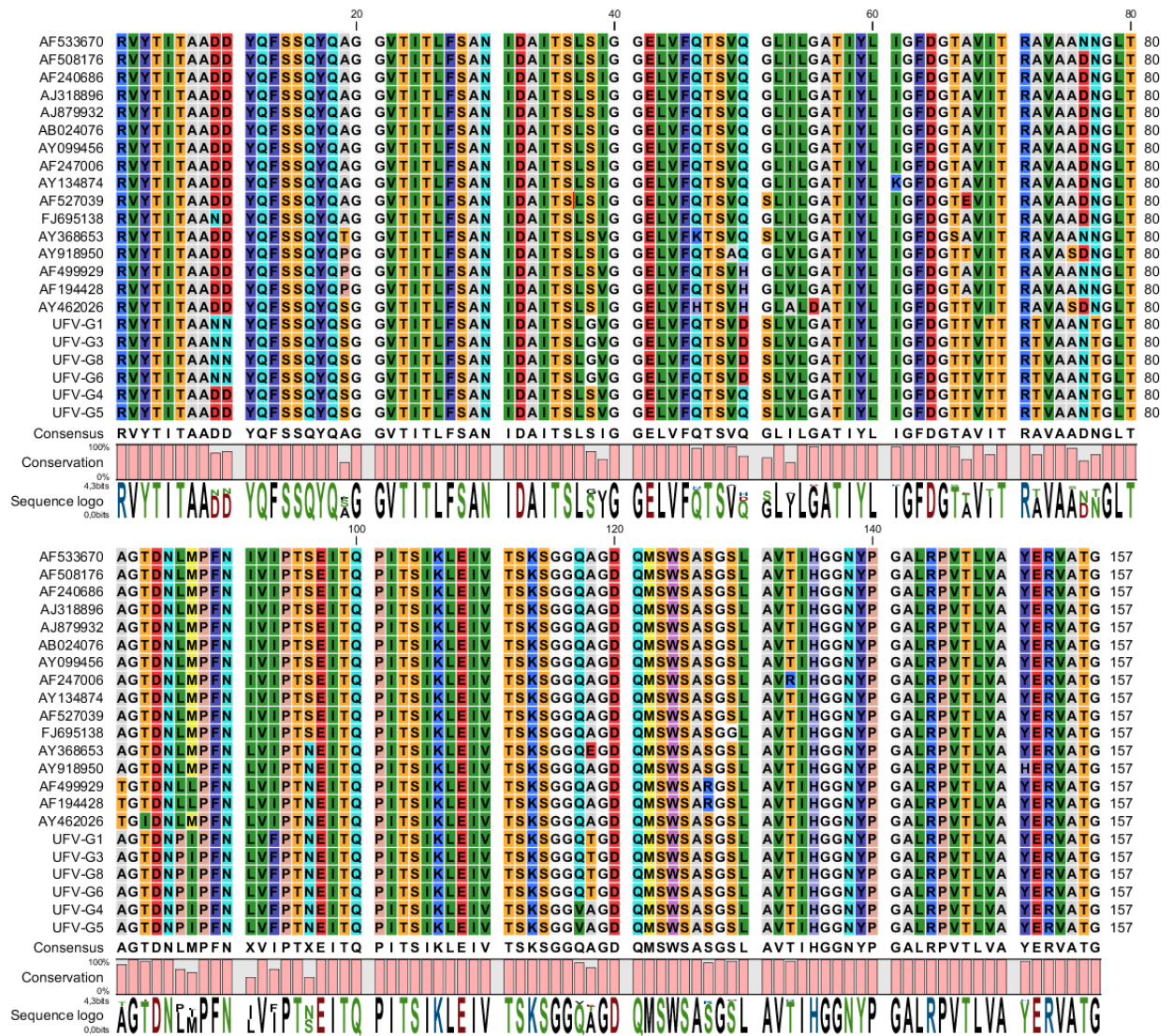


FIGURA 4- Alinhamento de aminoácidos presentes na literatura com as amostras UFV. Alinhamento de aminoácidos da região hipervariável da VP2 das amostras UFV e demais (aminoácidos 204-364).

A VP2, na sua forma imatura (pVP2), possui 48 kDa e 512 resíduos de aminoácidos. Após uma região contendo 4 polipeptídios sofrer clivagem pela VP4, essa proteína torna-se imatura com 441 aminoácidos e exerce função no ciclo viral (Da Costa et al., 2002). O seu

domínio hipervariável, que compreende os aminoácidos nas posições 206 à 350, tem sido descrito como a região mínima necessária para a construção do epítipo conformacional que será reconhecido por anticorpos neutralizantes produzidos contra o vírus (Bayliss et al., 1990; Yamaguchi et al., 1996). Mutações nos aminoácidos dentro dessa região (aspartato (D) por asparagina (N) na posição 279 e alanina (A) por treonina (T) na posição 284) foram encontrados em uma linhagem atenuada de IBDV (atIBDV), a partir da sua passagem em cultivo celular, resultando em reduzida hidrofília desta região e deleção de uma alfa-hélice o que pode alterar a conformação da superfície do virion, contribuindo assim, para o aumento da virulência do IBDV (Yamaguchi et al., 1996).

Segundo Jackwood (2008), a substituição de um único aminoácido na posição 253 (histidina [H] por glutamina [Q] ou asparagina [N]) da VP2 aumenta sua patogenicidade. A mesma região possui aminoácidos característicos para cada tipo de linhagem. A linhagem vvIBDV possui aminoácidos nas posições 222 (alanina [A]), 242, 256, 294 (isoleucina [I]), e serina (S) na 299, já na linhagem variante antigênica do IBDV (avIBDV) esses aminoácidos estão nas posições 222 (treonina [T]), 249 (lisina [K]) e 254 (serina [S]) enquanto que na atIBDV eles compartilham as posições 253 (histidina [H]), 279 (asparagina [N]), 284 (treonina [T]) e 330 (arginina [R] ou lisina [K]), e por fim a linhagem clássica, com os aminoácidos treonina (T) ou prolina (P) na posição 222, isoleucina (I) ou valina (V) na posição 242, glutamina (Q) ou histidina (H) na posição 253, valina (V) na posição 256, treonina (T) ou alanina (A) na posição 284, serina (S), arginina (R) ou lisina (K) na posição 330 (Paula et al., 2004; Liu et al., 2002; Razmyar & Peighambari, 2008; Bayliss et al., 1990; Yamaguchi et al., 1996., Letzel et al., 2007). Desta maneira, é possível deduzir a antigenicidade e a virulência do vírus a partir da avaliação da sequência de aminoácidos desta região.

As sequências das amostras UFV foram comparadas com outras dezesseis sequências disponíveis no GenBank, que foram classificadas como: dez vvIBDV, uma cepa vacinal, quatro linhagens clássicas e uma cepa WT (selvagem). Os números de acesso dessas sequências estão disponíveis na Tabela 3.

A sequência analisada incluiu toda a região hipervariável da VP2 (204-364), onde estão localizados os picos A, (aminoácidos 212-224) e B, (aminoácidos 314-325), ambos são responsáveis pela formação dos epítopos neutralizantes de vírus, o heptapeptídeo rico em serina (S) (aminoácidos 326-332) e as posições características de cada linhagem (Letzel et al., 2007). Também o heptapeptídeo rico em serina (S) localizado entre os aminoácidos 326-332, se mostrou conservado em todas as amostras analisadas de vvIBDV, assim como no estudo realizado por Brown et al., 1994. Duas linhagens clássicas analisadas (AF194428 e AF499929)

não apresentaram os quatro resíduos de serina (S), e apresentaram somente uma modificação na posição 330 (serina [S] substituído por arginina [R]).

As sequências UFV-G1, UFV-G3, UFV-G6 e UFV-G8 apresentaram modificações nos aminoácidos do pico A, posições 212, 213, e 222. No aminoácido 212 (aspartato [D] substituindo asparagina [N]). As amostras UFV-G4 e UFV-G5 conservaram o aspartato (D) nesta posição e somente uma amostra (FJ695138) vvIBDV apresentou uma asparagina (N), ao contrário de todas as outras vvIBDV que também conservaram o aspartato (D). Já na posição 213, as sequências UFV-G1, UFV-G3, UFV-G8 e UFV-G6 apresentaram uma única mudança, aspartato (D) substituindo asparagina (N), quando comparadas às outras sequências. Na posição 222, todas as sequências da UFV juntamente com a amostra clássica (AY462026) apresentaram o aminoácido serina (S), enquanto que, a Cepa WT (AY 368653) foi a única que apresentou uma treonina (T) nesta posição que é um aminoácido característico da linhagem variante antigênica (avIBDV) e outras três cepas clássicas (AY918950, AF499929 e AF194428) apresentaram prolina (P). Já as amostras de vvIBDV juntamente com a linhagem vacinal (AB024076) conservaram o aminoácido alanina (A) nesta posição. Na posição 241, as amostras UFV-G1, UFV-G3, UFV-G8 e UFV-G6 apresentaram o aminoácido glicina (G) enquanto que as amostras UFV-G4, UFV-G5, linhagens vvIBDV, cepa WT (AY368653), linhagem vacinal (AB024076) e todas as cepas clássicas apresentaram o aminoácido serina (S). Na posição 242 todas as amostras UFV juntamente com duas linhagens clássicas (AF194428 e AY499929) e a cepa WT (AY368653) apresentaram o aminoácido valina (V). Todas as outras linhagens vvIBDV, cepa vacinal (AB024076), e duas clássicas (AY918950 e AY462026) apresentaram o aminoácido isoleucina (I). Na posição 249 a cepa WT (AY368653) foi a única que apresentou o aminoácido lisina (K) que é um aminoácido característico da linhagem variante antigênica (avIBDV) e a linhagem clássica (AY462026) apresentou histidina (H). Todas as demais apresentaram glutamina (Q).

Na posição 252, com exceção da linhagem clássica (AY918950) que apresentou o aminoácido alanina (A), todas as linhagens apresentaram o aminoácido valina (V). Já a posição 253 três linhagens clássicas (AF499929, AF194428 e AY462026) apresentaram o aminoácido histidina (H) e uma linhagem também considerada clássica (AY918950) apresentou o aminoácido glutamina (Q), a qual são aminoácidos característicos dessa linhagem.

Na posição 254 a linhagem vvIBDV (AF527039) apresentou o aminoácido serina (S) substituído por isoleucina (I) o que não é característico desta linhagem. Na mesma posição todas as linhagens vvIBDV tiveram o aminoácido glicina (G), que também não é característico dessa

linhagem mas possui a mesma característica do grupo de aminoácidos apolares enquanto que todas as amostras UFV, juntamente com a cepa WT (AY368653) apresentaram o aminoácido serina (S) e as demais linhagens vvIBDV, cepas clássicas e cepa vacinal (AB024076) conservaram o aminoácido glicina (G).

Na posição 256 todas as linhagens vvIBDV e a linhagem vacinal (AB024076) apresentaram o aminoácido isoleucina (I), a cepa WT (AY368653), três linhagens clássicas (AY918950, AF499929 e AF194428) e todas as linhagens UFV apresentaram o aminoácido valina (V), somente a linhagem clássica (AY462026) apresentou o aminoácido alanina (A). Na posição 258, somente a linhagem clássica (AY462026) apresentou o aminoácido aspartato (D), todas as demais linhagens apresentaram o aminoácido glicina (G). Outra posição onde uma linhagem se diferenciou de todas as demais foi a 264, somente a linhagem vvIBDV (AY134874) apresentou o aminoácido lisina (K) e todas as demais apresentaram o aminoácido isoleucina (I).

Na posição 270 todas as linhagens UFV e duas linhagens clássicas (AY462026 e AY918950) apresentaram treonina (T), as outras linhagens clássicas (AF194428 e AF499929) juntamente com a cepa WT (AY368653), cepa vacinal (AB024076), e as linhagens vvIBDV apresentaram o aminoácido alanina (A), somente uma linhagem vvIBDV (AF527039) apresentou o aminoácido glutamato (E).

Em todas as amostras UFV o aminoácido treonina (T) estava presente nas posições 272, 275 e 280, sendo esse aminoácido substituído por isoleucina (I), alanina (A) e asparagina (N) respectivamente. Outra posição onde os aminoácidos foram exclusivos para as linhagens UFV foi a 289. Elas apresentaram o aminoácido prolina (P), enquanto que todas as outras linhagens vvIBDV, cepa vacinal (AB024076), cepa WT (AY368653) e todas as cepas clássicas tiveram leucina (L). Além dessa, na posição 296, o aminoácido predominante para as linhagens UFV foi a fenilalanina (F), enquanto que para todas as demais o aminoácido predominante foi a isoleucina (I).

Na posição 278, somente duas linhagens clássicas (AY462026 e AY918950) apresentaram o aminoácido serina (S), enquanto que todas as outras linhagens apresentaram o aminoácido alanina (A).

Na posição 279, o aminoácido asparagina (N) a qual é característico da linhagem atenuada (atIBDV), foi encontrado em todas as linhagens UFV, em duas cepas clássicas (AF499929 e AF194428), na cepa WT (AY368653) e em uma linhagem vvIBDV (AF533670).

A linhagem vacinal (AB024076), duas linhagens clássicas (AY918950 e AY462026) e as demais vvIBDV apresentaram o aminoácido aspartato (D).

Na posição 320 (pico B), o aminoácido glutamina (Q) estava presente nas sequências UFV-G1, UFV-G3, UFV-G8, UFV-G6, em todas as cepas clássicas, cepa WT (AY368653), vvIBDV e cepa vacinal (AB024076), enquanto que, na sequência da UFV-G4 e UFV-G5 estava presente o aminoácido valina (V) nessa posição. Na posição 321 das sequências UFV-G1, UFV-G3, UFV-G8 e UFV-G6 estavam presentes o aminoácido treonina (T), enquanto que nas sequências UFV-G4 e UFV-G5 possuía o aminoácido alanina (A). Assim, a única sequência que diferenciou das demais foi a da cepa WT (AY 368653) que mostrou ter um glutamato (E) nessa posição.

Apesar dessas modificações nos picos A e B, não podemos afirmar que houve mudança de virulência, pois há uma necessidade de testes de virologia como isolamento viral, teste de efeito citopático em células e teste em campo com animais.

Observando os aminoácidos da região hipervariável da VP2 de todas as linhagens UFV, observamos algumas posições exclusivas de alguns deles quando comparados com outras sequências de diferentes cepas e linhagens, os aminoácidos que apresentaram posições exclusivas foram a treonina (T) na 275 e 280, prolina (P) na 289, isoleucina (I) na 290 e fenilalanina (F) na posição 296. A partir desses dados pode-se explicar a inserção dessas linhagens UFV em um clado exclusivo na árvore filogenética (figura 3). Sugerindo que essas linhagens podem ser novas variantes antigênicas do IBDV.

5.4 Análises de aminoácidos da região hipervariável nas sequências do presente estudo e sequências vacinais disponíveis no GenBank.

Devido ao fato dos vírus de RNA serem geneticamente propensos à mutação, existe um risco potencial de um IBDV atenuado se reverter para um estado mais virulento quando replicar em aves domésticas. Esse fenômeno foi comprovado por Raue et al. (2004), que pela mutagênese sítio-dirigida, atenuaram parcialmente o aminoácido alanina (A) substituída por treonina (T) na posição 284 e glutamina (Q) substituída por histidina (H) na posição 253 de uma linhagem de vvIBDV (BD-3tc). Quatorze dias após inoculação em galinhas comerciais, a linhagem mutante reverteu para o fenótipo tipo-selvagem (treonina (T) por alanina (A) na posição 284) durante a

replicação na bursa de Fabrícus, concluindo assim que replicações múltiplas do IBDV fornecem uma oportunidade para o vírus mutante reverter-se para um fenótipo muito virulento.

As amostras positivas para o IBDV pertenciam a aves vacinadas com Bursine 2, uma vacina intermediária, cepa Lukert (Fort Dodge), segundo as informações fornecidas pelos produtores. Para verificar a possibilidade desses isolados virais serem originários de amostras vacinais, suas sequências de aminoácidos foram alinhadas com as sequências das cepas vacinais Lukert (AY918948), Bursine 2 (AF293795), Edgar (AF293789) e S001 (AM084690) (Figura 5). O resultado do alinhamento dessas sequências apresentou diferenças nas posições de aminoácidos da região hipervariável da VP2 (16, 17, 24, 26, 28, 29, 31, 33, 47, 50, 53, 54, 55, 61, 64, 65 e 71). Na posição 24 todas as amostras UFV e a linhagem Edgar tiveram glutamina (Q), enquanto a Lukert, Bursine 2, e S001 apresentaram uma histidina (H). Na posição 28 deste alinhamento, observou-se uma diferença entre a Bursine 2 e todas as demais linhagens, uma vez que, a primeira apresentou uma histidina (H) enquanto que as demais apresentaram uma glutamina (Q). Na posição 31 as sequências das amostras UFV, S001 e Edgar, apresentaram uma valina (V), e amostras vacinais, Lukert e Bursine 2, apresentaram uma alanina (A).

Com essas observações, podemos concluir que possivelmente as amostras UFV não procedem de nenhuma amostra vacinal uma vez que existem grandes variações entre os aminoácidos. Desta maneira podemos dizer que essas aves podem ter sido infectadas por um IBDV, diferente do que está presente nas amostras vacinais utilizadas nesses animais. Esse fato também foi observado nos estudos realizados por Zierenberg et al., 2000; Ikuta et al., 2001; Tessari et al., 2001; Rojs-Zorman et al., 2003; Kabell et al., 2005; Hernandez et al., 2006; Dormitório et al., 2007.

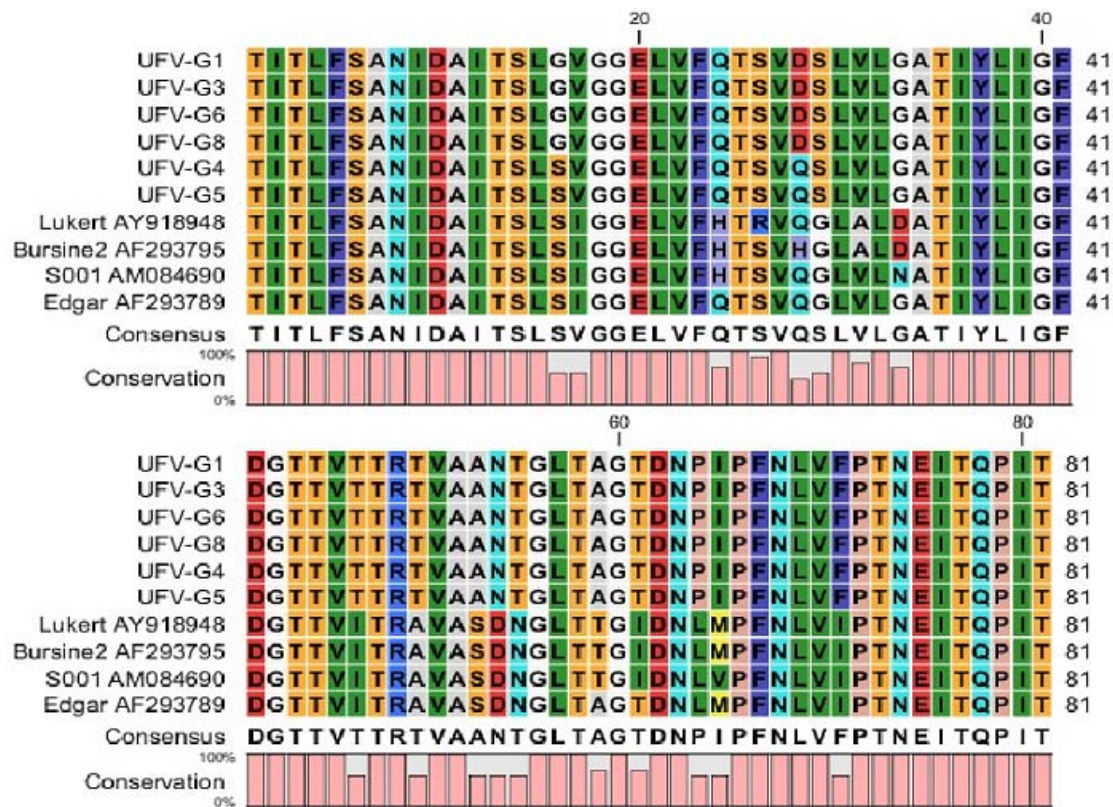


FIGURA 5- Análise de aminoácidos da região hipervariável das amostras sequenciadas no presente estudo e das amostras vacinais disponíveis no GenBank (aminoácidos 226-306). O número de acesso das amostras vacinais se encontra diante do nome das cepas e estão disponíveis no GenBank.

Tabela 2- Número de acesso da região codificadora da proteína VP2 do IBDV selecionadas no GenBank

AB024076 Japão (I)	AF533670 Coréia do Sul (I)	AY918950 Estados Unidos (C)	X16107 Alemanha (B)
AB368968 Zâmbia (I)	AJ310185 França (B)	BD009827 (G)	EF646853 Japão (B)
AB368970 Zâmbia (I)	AJ318896 Reino Unido (I)	CS074543 França (G)	EU184687 Croácia (I)
AF006694 China (B)	AJ427340 Índia (B)	CS140538 Espanha (B)	EU184689 Croácia (B)
AF006701 China (C)	AJ577092 Vietnã (B)	CS140664 Espanha (B)	EU595667 China (I)
AF109154 Taiwan (C)	AJ621158 Índia (E)	D00869 Austrália (G)	EU595668 China (I)
AF133904 Estados Unidos (A)	AJ879932 França (I)	D49706 Japão (I)	EU595669 China (I)
AF140705 Espanha (B)	AX027586 Estados Unidos (B)	D83985 Japão (I)	EU595670 China (I)
AF165150 Coréia do Sul (I)	AX323155 (B)	DD187399 Estados Unidos (A)	EU595671 China (B)
AF165151 Coréia do Sul (I)	AX721965 Japão (A)	DD187400 Estados Unidos (A)	EU595672 China (B)
AF194428 Holanda (B)	AX721980 Japão (C)	DQ187988 Brasil (E)	FJ695138 China (I)
AF240686 Holanda (I)	AY029166 Estados Unidos (F)	DQ202329 China (B)	FJ824672 China (I)
AF247006 Malásia (I)	AY099456 Nigéria (I)	DQ286035 Brasil (I)	FJ842491 Vietnã (I)
AF281651 China (I)	AY134874 China (I)	DQ355815 Vietnã (I)	FJ842492 Vietnã (D)
AF321054 China (B)	AY311479 Egito (B)	DQ355816 Vietnã (I)	FJ842493 Vietnã (I)
AF321055 China (B)	AY319768 China (B)	DQ355817 Vietnã (I)	FJ842495 Vietnã (I)

AF321056 China (B)	AY321509	DQ355818 Vietnã (I)	FJ842497 Vietnã (D)
AF362747 Alemanha (G)	AY323952 Malásia (I)	DQ355819 Vietnã (D)	FJ842498 Vietnã (I)
AF362771 Alemanha (B)	AY368653 Estados Unidos (A)	DQ355820 Vietnã (D)	FJ842499 Vietnã (I)
AF362776 Bangladesh (I)	AY462026 Estados Unidos (C)	DQ403248 China (B)	GM601034 Hungria (B)
AF499929 Nigéria (B)	AY462027 Estados Unidos (A)	DQ778035 Vietnã (I)	GQ166972 China (I)
AF508176 Coréia do Sul (I)	AY598356 China (I)	DQ825652 China (I)	M64285 Estados Unidos (A)
AF508177 Coréia do Sul (I)	AY704912 Irã (I)	DQ906921 China (B)	M97346 Estados Unidos (A)
AF527039 Malásia (I)	AY918948 Estados Unidos (C)	EF517528 China (I)	X03993 Austrália (Grupo externo)

Legenda- O país de origem e seu respectivo clado na árvore filogenética (figura 3) está abaixo de cada número de acesso.

Tabela 3- Isolados virais de IBDV caracterizados na literatura

Código de acesso	Classificação	Referência
A024076	Cepa vacinal	(Tsukamoto et al. 1999)
AF194428	Cepa clássica	(Petkov et al. 2007)
AF240686	Cepa vvIBDV	(Petkov et al. 2007)
AF247006	Cepa vvIBDV	(Petkov et al. 2007)
AF499929	Cepa clássica	(Owoade et al., 2004)
AF508176	vvIBDV	(Kin & Yeo, 2003)
AF527039	vvIBDV	(Van Loon et al. 2002)
AJ318896	vvIBDV	(Nouen et al., 2006)
AJ879932	vvIBDV	(Owoade et al., 2004)
AY099456	vvIBDV	(Sun et al., 2003)
AY134874	Cepa WT	(Liu & Vakharia, 2004)
AY462026	Cepa clássica	(Petkov et al. 2007)
AY918950	Cepa clássica	(Petkov et al. 2007)
D49706	vvIBDV	(Petkov et al. 2007)
D83985	Cepa atenuada	(Yamaguchi et al., 1996)
FJ695138	vvIBDV	(Ren et al., 2009)

6. CONCLUSÕES

- A comparação da região hipervariável da VP2 das seis sequências detectadas no presente estudo com outras noventa e oito sequências disponíveis no GenBank revelaram uma posição única dessas sequências na árvore filogenética devido as variações dos nucleotídeos presentes nessa região.
- Novas linhagens variantes antigênicas possivelmente estão em circulação no campo.
- As amostras virais detectadas não possuem origem vacinal devido às possíveis diferenças encontradas na região hipervariável da VP2.

7. PERSPECTIVAS

- Para confirmar se esses vírus detectados no presente trabalho são novas variantes do IBDV é necessário um isolamento seguido do teste de patogenicidade em cultivo celular e um teste de campo com animais.
- De posse de um maior número de sequências do genoma viral de origem brasileiras depositadas no GenBank, pode-se sugerir um estudo filogeográfico para compreender melhor a dispersão do vírus no Brasil

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDEL-ALIM, G. A.; SAIF, Y. M. Pathogenicity of Embryo-Adapted Serotipo 2 OH Strain of Infectious Bursal Disease Virus in Chickens and Turkeys. **Avian Disease**, v. 46, n. 4, p. 1001-1006, 2002.

ABEF - Associação Brasileira dos Produtores e Exportadores de Frango. Disponível em http://www.abef.com.br/noticias_portal/exibenoticia.php?notcodigo=1708 > Acesso em: 12 de mai. 2010.

AZAD, A. A.; BARRET, S. A.; FAHEY, K. J. The characterization and molecular cloning of the double-stranded RNA genome of an Australian strain of Infectious Bursal Disease Virus. **Virology**, v. 143, p. 35- 44, 1985.

AZAD, A. A.; JAGADISH, M. N.; BROWN, M. A.; HUDSON, P. J. Deletion mapping and expression in *Escherichia coli* of the large genomic segment of a birnavirus. **Virology**, v. 161, n. 1, p. 145-152, 1987.

BANDA, A.; VILLEGAS, P. Genetic characterization of very virulent Infectious Bursal Disease Viruses from Latin America. **Avian Disease**, v. 48, n. 3, p. 540-549, 2004.

BAYLISS, C. D.; SPIES, U.; SWAW, K.; PETERS, R. W.; PAPAGEORGIOU, A.; MULLER, H.; BOURSNEILL, M. E. A comparison of the sequences of segment A of four Infectious Bursal Disease Virus strain and identification of a variable region in VP2. **Journal of General Virology**, v. 71, n. 6, p. 1303-1312, 1990.

BOOT, H. J.; PRITZ-VERSCHUREN, S. B. E. Modifications of the 30-UTR stem-loop of Infectious Bursal Disease Virus are allowed without influencing replication or virulence. **Nucleic Acids Research**, v. 32, n.1, p. 211–222, 2004.

BROWN, M. D.; P. GREEN.; M. A. SKINNER. VP2 sequences of recent European ‘very virulent’ isolates of Infectious Bursal Disease Virus are closely related to each other but are distinct from those of ‘classical’ strains. **Journal General Virology**, v. 75, n. 3, p. 675–680, 1994.

CAO, Y. C.; YEUNG, W. S.; LAW, L.; BI, Y. Z.; LEUNG, F. C.; LIM, B. L. Molecular characterization of seven Chinese isolates of Infectious Bursal Disease Virus: classical, very virulent and variant strains. **Avian Disease**, v. 42, n. 2, p. 340–351, 1998.

CHEVALIER, C.; LEPAULT J.; DA COSTA, B.; DELMAS B. The last C-terminal residue of VP3, glutamic acid 257, controls capsid assembly of Infectious Bursal Disease Virus. **Journal of Virology**, v. 78, n. 7, p. 3296–3303, 2004.

CHETTLE, N.; STUART, J. C.; WYETH, P. J. Outbreaks of virulent Infectious Bursal Disease in East Anglia. **Veterinary Record**. v. 125, n. 10, p. 271–272, 1989.

COSGROVE, A. S. An apparently new disease of chickens: avian nephrosis. **Avian Disease**, v. 6, n. 3, p. 385–389, 1962.

COULIBALY, F.; CHEVALIER, C.; GUTSCHE, I.; POUS, J.; NAVAZA, J.; BRESSANELLI, S.; DELMAS, B.; REY, F. A. The birnavirus crystal structure reveals structural relationships among icosahedral viruses. **Cell**, v. 120, n. 25, p. 761-772, 2005.

DA COSTA, B.; CHEVALIER, C.; HENRY, C.; HUET, JEAN-CLAUDE.; PETIT, S.; LEPAULT, J.; BOOT, H.; DELMAS, B. The capsid of Infectious Bursal Virus contains several small peptides arising from the maturation process of pVP2. **Journal of Virology**, v. 76, n. 5, p. 2393-2402, 2002.

DENG, X.; GAO, Y.; GAO, H.; QI, X.; CHENG, Y.; WANG, X.; WANG, X. Antigenic structure analysis of VP3 of Infectious Bursal Disease Virus. **Virus Research**, v. 129, n. 1, p. 35-42, 2007.

DIAS, C. C. A.; SOUZA, F. O.; SILVA, E. S.; ELLER, M. R.; BARRIOS, P. R.; SANTOS, B. M.; MORAES, M. P.; ALMEIDA, M. R. Sequencing and phylogenetic analysis of the Infectious Bursal Disease Virus isolates from outbreak in layer flocks in the state of Minas Gerais. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. n. 40, p. 205-207, 2009.

DI FABIO, J.; ROSSINI, L. I.; ETERRADOSSI, N.; TOQUIN, M. D.; GARDIN, Y. European-like pathogenic Infectious Bursal Disease Viruses in Brasil. **Veterinary Record**, v. 145, n. 7, p. 203-204, 1999.

DI FABIO, J.; CASTRO, G.; GARDI, Y.; ROSSINI, L. I.; TOQUIN, D.; ETERRADOSSI, N. Very virulent IBD spreads to South América. **Word Poultry Elsevier**, v.15, n. 9, p. 88-91, 1999.

DI FABIO, J.; CASTRO, A. G. D.; GARDIN, Y.; ROSSINI, L. I.; TOQUIN, D.; ETERRADOSSI, N. La Enfermidad de la Bolsa de Fabricio (EIBF) por cepas de alta virulência se propagan a Latinamérica. **Avicultura professional**, v.17, n. 9, p. 15-18, 1999.

DIAS, A. C. C., SOUZA, F. D., SILVA, E. M. S., ELLER, M. R., BARROS, P. R., SANTOS, B. M., MORAES, M. P., LAMÊGO, M. R. A. Sequencing and phylogenetic analysis of the Infectious Bursal of Disease Virus isolates from outbreak in layer flocks in the state of Minas Gerais. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 40, p.1 - 3, 2004.

DOBOS, P.; HILL, B. J.; HALLETT, R.; KELLS, D. T.; BECHT, H.; TENINGES, D. Biophysical and biochemical characterization of five animal viruses with bisegmented double-stranded RNA genomes. **Journal of Virology**, v. 32, n. 2, p. 593-605, 1979.

DOMANSKA, K.; RIVALLAN, G.; SMIETANKA, K.; TOQUIN, D.; BOISSESON, C. D. MINTA, Z.; ETERRADOSSI, N. Genetic characterization of Polish Infectious Bursal Disease Virus strains. **Bulletin Veterinary Institute in Pulawy**, v. 47, n. 2, p. 61-69, 2003

DORMITORIO, T. V.; GIAMBRONE, J. J.; GUO, K.; JACKWOOD, D.J. Molecular and Phenotypic Characterization of Infectious Bursal Disease Virus Isolates. **Avian Diseases**, v. 51, n. 2, p. 597-600, 2007.

FABOHUN, O. A.; OWOADE, A. A.; OLUWAYELU, D. O.; OLAYEMI, F. O. Serological survey of Infectious Bursal Disease Virus antibodies in cattle egrets, pigeons and nigerian laughing doves. **African Journal Biomedical Research**, v. 3, n. 3, p. 191-192, 2000.

FLORES, EDUARDO FURTADO (Org.). *Virologia Veterinária*. Santa Maria: Editora da UFSM, 2007. 888p.

GAO, Y.; LIU, W.; GAD, H.; WANG, X.; SHEN, R. Effective inhibition of Infectious Bursal Disease Virus replication in vitro by DNA vector-based RNA interference. **Antiviral Research**, v. 79, n. 2, p. 87-84, 2008.

GARDNER, H.; KERRY, K.; RIDDLE, M.; BROUWER, S.; GLEESON, L. Poultry virus infection in Antarctic penguins. **Nature**, v. 387, n. 15, p. 245, 1997.

GARRIGA, D.; NAVARRO, A.; AUDI-QUEROL, J.; ABAITUA, F.; RODRIGUEZ, J. F.; VERDAGUER, N. Activation mechanism of a noncanonical RNA-dependent RNA polymerase. **PNAS**, v. 104, n. 51, p. 20540-20545, 2007.

HERNANDEZ, M.; BANDA, A.; HERNÁNDEZ, D.; PANZERA, F.; PEREZ, R. Detection of very virulent strains of Infectious Bursal Disease Virus (vvIBDV) in commercial broilers from Uruguay. **Avian Disease**, v. 50, n. 4, p. 624-631, 2006.

HOLLMEN, T.; FRANSON, J. C.; DOCHERTY, D. E.; KILPI, M. HARIO, M.; CREEKMORE, L. H.; PETERSEN, M. R.. Infectious Bursal Disease Virus antibodies in eider ducks and herring gulls. **Condor**, v. 102, n. 3, p. 688–691, 2000.

HON, C.-C.; LAM, T.-Y.; DRUMMOND, A.; RAMBAUT A.; LEE, Y.-F, YIP, C.-W, ZENG, F.; LAM, P.-Y, NG P. T.; LEUNG F. C. C. Phylogenetic analysis reveals a correlation between the expansion of very virulent Infectious Bursal Disease Virus and reassortment of its genome segment B. **Journal of Virology**, v. 80, n. 17, p. 8503–8509, 2006.

HOQUE, M. M.; OMAR, A. R.; CHONG, L. K.; HAIR-BEJO, M.; AINI, I. Pathogenicity of Ssp I-positive Infectious Bursal Disease Virus and molecular characterization of the hypervariable region. **Avian Pathology**, v. 30, n. 4, p. 369–380, 2001.

HOWIE, R. I.; THORSEN, J. Identification of a strain of Infectious Bursal Disease Virus isolated from mosquitoes. **Canadian Journal of Comparative Medicine**, v. 45, n. 3, p. 315–320, 1981.

HUANG, Z.; ELANKUMARAN, S.; YUNUS, A. S.; SAMAL, S. K. A recombinant Newcastle disease virus (NDV) expressing VP2 protein of Infectious Bursal Disease Virus (IBDV) protects against NDV and IBDV. **Journal of Virology**, v. 78, n.18, p. 10054–10063, 2004.

HUDSON, P. J.; MCKERN, N. M.; POWER, B. E.; AZAD, A. Genomic structure of the large RNA segment of Infectious Bursal Disease Virus. **Nucleic Acids Research**, v.14, n. 12, p. 5001-5012, 1986.

HUELSENBECK, J. P.; RONQUIST, F. MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. **Bioinformatics**, v. 17, n. 8, p. 754-5, 2001.

IKUTA, N.; EL-ATTRACHE, J.; VILLEGAS, P.; GARCIA, M.; LUNGE, V. R.; FONSECA, A. S. K.; OLIVEIRA, C.; MARQUES, E. K. Molecular characterization of Brazilian Infectious Bursal Disease Viruses. **Avian Disease**, v. 45, n. 2, p. 297-306, 2001.

ISLAM, M. R., K. ZIERENBERG, N. ETERRADOSSI, D. TOQUIN, G. RIVALLAN, AND H. MULLER. Molecular and antigenic characterization of Bangladeshi isolates of Infectious Bursal Disease Virus demonstrate their similarities with recent European, Asian and African very virulent strains. **Journal of Veterinary Medicine Series B**, v. 48, n. 3, p. 211–221, 2001.

JACKWOOD, D. K.; SAIF, Y. M.; HUGHES, J. H. Characteristics and serologic studies of two serotypes of Infectious Bursal Disease Virus in turkeys. **Avian Disease**, v. 26, n. 4, p. 871-82, 1982.

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 Disase**, v. 43, p. 310–314, 1999.

JACKWOOD, D. J., R. E. GOUGH, AND S. E. SOMMER. Nucleotide and amino acid sequence analysis of a birnavirus isolated from penguins. **Veterinary Record**, v. 156, n. 17, p. 550–552, 2005.

JACKWOOD, D. J.; SREEDEVI. B.; LEFEVER. L. J.; SOMMER-WAGNER. S. E. Studies on naturally occurring Infectious Bursal Disease Viruses suggest that a single amino acid substitution at position 253 in VP2 increases pathogenicity. **Virology**, v. 377, n.1, p. 110-116, 2008.

JACKWOOD, D. J.; SOMMER-WAGNER, S. Genetic characteristics of Infectious Bursal Disease Viruses from four continents. **Virology**, v. 365, n. 2, p. 369-375, 2007.

JACKWOOD, D. J.; SOMMER-WAGNER, S. E.; PHARO, H. J. The use of gamma irradiation for the inactivation of Infectious Bursal Disease Viruses. **Avian disease**, v. 51, n. 2, p. 606-608, 2007.

JAGADISH, M. N.; STATON, V. J.; HUDSON, P. J.; AZAD, A. A. Birnavirus precursor polyprotein is processed in *Escherchia coli* by its own virus-encoded polypeptide. **Journal of Virology**, v. 62, n. 3, p. 1084-1087, 1988.

JEON, W.-J.; LEE, E.-K.; JOH. S.-J.; KWON, J.-H.; YANG, C.-B.; YOON, Y.-S.; CHOI, K.-S. Very virulent Infectious Bursal Disease Virus isolated from wild birds in Korea: *Epidemiological implications*. **Virus Research**, v. 137, n. 1, p. 153-156, 2008.

JUNIOR, A. B.; MACARI, M. Doença das Aves. Campinas: *Editora Facta*, 800p, 301-313, 2000.

KABELL, S.; HANDBERG, K. J.; LI, Y.; KUSK, M.; BISGAARD, M. Detection of vvIBDV in vaccinated SPF chickens. **Acta veterinaria. Scandinavica**, v. 46, p. 219-227, 2005.

KASANGA, C. J.; YAMAGUCHI, T.; WAMBURA, P. N.; MUNANG'ANDU, H. M.; OHYA, K.; FUKUSHI, H. Detection of Infectious Bursal Disease Virus (IBDV) genome in free living pigeon and guinea fowl in Africa suggests involvement of wild birds in the epidemiology of IBDV. **Virus Genes**, v. 36, n. 3, p. 521–529, 2008.

KIM, T.K., YEO, S.G. Cloning and nucleotide analysis of segment a gene of Infectious Bursal Disease Virus detected in Korea. **Virus Genes**, v. 26, n. 1, p. 97–106, 2003.

KUMAR, K.; SINGH, K. C. P.; PRASAD, C. B. Immune responses to intermediate strain IBD vaccine at different levels of maternal antibody in broiler chickens. **Tropical Animal Health and Production**, v. 32, n. 6, p. 357-360, 2000.

KWON, H. M.; KIN, D. K.; HAN, T. W.; HAN, J.H.; JACKWOOD, D.J. Sequence of precursor polyprotein gene (segment A) of Infectious Bursal Disease Viruses isolated in Korea. **Avian Disease**, v. 44, n. 3, p. 691-696, 2000.

LEFFER, E.V.B. Considerações sobre o controle da doença de Gumboro. **Ave World**, S.P. Animal World, abr-mai. 2004.

LE NOUEN, C.; RIVALLAN, G.; TOQUIN, D.; DARLU, P.; MORIN, Y.; BEVEN, V.; DE BOISSESON, C.; CAZABAN, C.; COMTE, S.; GARDIN, Y.; ENTERRADOSSI, N. Very virulent Infectious Bursal Disease Virus: reduced pathogenicity in a rare natural segment-B-reassorted isolate. **Journal of General Virology**, v. 87, n. 1, p. 209–216, 2006.

LEE, C.-C., KO, T.-P.; CHOU, C.-C.; YOSHIMURA, M.; DOONG, S.-R.; WANG, M.-Y.; WANG, A. H.-J. Crystal structure of Infectious Bursal Disease Virus VP2 subviral particle at 2,6Å resolution: implication in virion assembly and immunogenicity. **Journal of Structural Biology**, v. 155, n. 1, p. 74-86, 2006.

LEJAL N.; DA COSTA B.; HUET, J-C.; DELMAS, B. Role of Ser-652 and Lys-692 in the protease activity of Infectious Bursal Disease Virus VP4 and identification of its substrate cleavage sites. **Journal of General Virology**, v. 81, n. 4, p. 983-992, 2000.

LETZEL, T; COULIBALY, F; FELIX, A, R; DELMAS, B; JAGT, E; LOON, A, A, M, W, V; MUNDT, E. Molecular and structural bases for the antigenicity of VP2 of Infectious Bursal of Disease. **Journal of Virology**, v. 81, n. 23, p. 12827-12835, 2007.

LIM, B.-L.; CAO, Y.; YU, T.; MO, C.-W. Adaptation of Very Virulent Infectious Bursal Disease Virus to chicken embryonic fibroblasts by site-directed mutagenesis of residues 279 and 284 of viral coat protein VP2. **Journal of Virology**, v. 73, n. 4, p. 2854-2862, 1999.

LIN, Z.; KATO, A.; OTAKI, Y.; NAKAMURA, T.; SASMAZ, E.; UEDA, S. Sequence comparisons of a highly virulent Infectious Bursal Disease Virus prevalent in Japan. **Avian Disease**, v. 37, n. 2, p. 315–323. 1993.

LIU, J.; ZHOU, J.; KWANG, J. Antigenic and molecular characterization of recent Infectious Bursal Disease Virus isolated in China. **Virus Genes**, v 24, n. 2, p. 135-147, 2002.

LIU, M.; VAKHARIA, V. N. Nonstructural Protein of Infectious Bursal Disease Virus Inhibits Apoptosis at the Early Stage of Virus Infection **Journal of virology**, v. 80, n. 7 p. 3369–3377, 2006.

LOMBARDO, E.; MARAVER, A.; ESPINOSA, I.; FERNANDEZ-ARIAS, A.; RODRIGUES, J.F. VP5, the nonstructural polypeptide of Infectious Bursal Disease Virus, accumulates within the host plasma membrane and induces cell lysis. **Virology**, v. 277, n. 2, p. 345-357, 2000.

MAW, M. T.; YAMAGUCHI, T.; OHYA, K.; FUKUSHI, H. Detection of vaccine-like Infectious Bursal Disease (IBD) Virus in IBD vaccine-free chickens in Japan. **The Journal of Veterinary Medical Science**, v. 70, n. 8, p. 833-835, 2008.

McFERRAN, J. B.; MCNULTY, M. S.; MCKILLOP, E. R.; CONNOR, T. J.; MCCRACKEN, R. M.; COLLINS, D. S.; ALLAN, G. M. Isolation and serological studies with Infectious Bursal Disease Virus from fowl, turkeys and ducks: demonstration of a second serotype. **Avian Pathology**, v. 9, n. 3, p. 395-403, 1980.

McNULTY, M. S.; SAIF, Y. M. Antigenic relationship of non-serotype 1 turkey Infectious Bursal Disease Viruses. **Avian Disease**, v. 32, n. 2, p. 374-375, 1988.

MORAES, H. L. S.; SALLE, C. T. P.; PADILHA, A. P.; NASCIMENTO, V. P.; SOUZA, G.F.; PEREIRA, R. A.; ARTENCIO, J. O.; SALLE, F. O. Infectious Bursal Disease: Evaluation of Pathogenicity of Commercial Vaccines from Brazil in Specific Pathogen Free Chichens. **Brasilian Journal of Poultry Science**, v.6, n. 4, p. 243-247, 2004.

MORGAN, M.M.; MACREADIE, I. G.; HARLEY, V. R.; HUDSON, P. J.; AZAD, A. A. Sequence of the small double-stranded RNA genomic of Infectious Bursal Disease Virus and its deduced 90-KDa product. **Virology**, v. 163, n. 1, p. 240-242, 1988.

MULLER, H., SCHOLTISSEK, C., BENCHT, H. The genome of Infectious Bursal Disease Virus consists of two segments of double-stranded RNA. **Journal of Virology**, v. 31, n. 3, p. 584-589, 1979.

MULLER, R.; KAUFER, I.; REINACHER, M.; WEISS, E. Immunofluorescent studies of early virus propagation after oral infection with Infectious Bursal Disease Virus (IBDV). **Zentralbl Veterinarmedizin Reihe B**, v. 26, n. 5, p. 345-352, 1979.

MULLER, H.; ISLAM, M. R.; RAUE, R. Research on Infectious Bursal Disease – the past, the present and the future. **Veterinary Microbiology**, v. 97, n.1-2, p. 153-165, 2003.

MUNDT, E.; BEYER, J.; MULLER, H. Identification of novel protein in Infectious Bursal Disease Virus-infected cells. **Journal General Virology**, v. 76, n. 2, p. 437- 443, 1995.

MUNDT, E.; KOLLNER, B.; KRETZSCHMAR, D. VP5 of Infectious Bursal Disease Virus is not essential for virus replication in cell culture. **Journal Virology**, v. 71, n. 7, p. 5647-5651, 1997.

MURPH, F. A.; GIBBS, E. P. J.; HORZINEK, M. C.; STUDDERT, M. J.; Birnaviridae In: *Veterinay Virology.*, Academic Press. 3. ed., p. 405-409, 1999.

NYLANDER, J. A.; RONQUIST, F.; HUELSENBECK, J. P.; NIEVES-ALDREY, J. L. Bayesian phylogenetic analysis of combined data. **Systematic Biology**, v. 53, n. 1, p. 47-67, 2004.

NIKOLAKAKI, S. V., K. NOMIKOU, M. KOUMBATI, O. MANGANA, M. PAPANASTASSOPOULOU, P. P. MERTENS, AND O. PAPADOPOULOS. Molecular analysis of the NS3/NS3A gene of Bluetongue virus isolates from the 1979 and 1998–2001 epizootics in Greece and their segregation into two distinct groups. **Virus Research**, v. 114, n. 1-2, p. 6–14, 2005.

NUNOYA, T.; OTAKI, Y.; TAJIMA, M.; HIRAGA, M.; SAITO, T. Occurrence of acute Infectious Bursal Disease with high mortality in Japan and pathogenicity of field isolates in SPF chickens. **Avian Disease**, v. 36, n. 3, p. 596–609, 1992.

OHASHI, S., Y. MATSUMORI, T. YANASE, M. YAMAKAWA, T. KATO, AND T. TSUDA. Evidence of an antigenic shift among Palyam serogroup orbiviruses. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, n. 10, p. 4610–4614, 2004.

OIE - World Organisation for Animal Health. Disponível em <<http://www.oie.int/wahis/public.php>>. Acesso em: 28 de junho de 2010.

PAGÈS-MANTÉ, A.; TORRENTS, D.; MALDONADO, J.; SAUBI, N. Dogs as potential carriers of Infectious Bursal Disease Virus. **Journal of Avian Pathology**, v. 33, n. 2, p. 205–209, 2004.

PARK, M. J.; PARK, J. H.; KWON, H. M. Mice as potential carriers of Infectious Bursal Disease Virus in chickens. **The Veterinary Journal**, v. 183, n. 3, p. 352-354, 2010.

PAULA, M. B. C.; YOKOSAWA, J.; COUTINHO, M. D. B.; SILVA, P. L.; FERRAZ, R. A.; OLIVEIRA, T. F. M.; QUEIRÓZ, D. A. O. Identification and molecular characterization of the Infectious Bursal Disease Vírus (IBDV) from an outbreak in a broiler flocks in Midwestern Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 35, n. 4, p. 352-358, 2004.

PEREIRA, S. R. F. G.; TRAVASSOS, C. E. P. F.; HUGUENIN, A.; GUIMARÃES, A. C. C.; SILVA, A. G.; GUIMARÃES, M. A. A. M. Western blot detection of Infectious Bursal Disease virus infection. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 31, n. 5, p. 671-674, 1998.

PEROZO, F.; VILLEGAS, P.; ESTEVEZ, C.; ALVARADO, I. R.; PURVIS, L. B.; WILLIAMS, B. Protection against Infectious Bursal Disease virulent challenge conferred by a recombinant avian adeno-associated virus vaccine. **Avian disease**, v. 52, n. 2, p. 315-319, 2008.

PHONG, S. F.; HAIR-BEJO, M.; OMAR, A. R.; AINI, I. Sequence analysis of Malaysian Infectious Bursal Disease Virus isolate and the use of reverse transcriptase nested polymerase chain reaction enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of VP2 hypervariable region. **Avian Disease**, v. 47, n. 1, p. 154–162, 2003.

PITCOVSKI, J.; GUTTER, B.; GALLILI, G.; GOLDWAY, M.; PERELMAN, B.; GROSS, B.; KRISPEL, S.; BARBAKOV, M.; MICHAEL, A. Development and large scale use of recombinant VP2 vaccine for the prevention of Infectious Bursal Disease of chickens. **Vaccine**, v. 21, n. 32, p. 4736–4743, 2003.

PITCOVSKI, J.; GOLDBERG, D.; LEVI, B. Z.; DI-CASTRO, D.; AZRIEL, A.; KRISPEL, S.; MARAY, T.; SHAALTIEL, Y. Coding region of segment A sequence of a very virulent isolate of IBDV—comparison with isolates from different countries and virulence. **Avian Disease**, v. 42, n. 3, p. 497–506, 1998.

RAMIG, R. F. Genetics of the rotaviruses. **Annual Review Microbiology**, v. 51, p. 225–255, 1997.

RAUE, R.; ISLAM, M. R.; ISLAM, M. N.; ISLAM, K. M.; BADHY, S. C.; DAS, P. M.; MULLER, H. Reversion of molecularly engineered, partially attenuated, very virulent Infectious Bursal Disease Virus during infection of commercial chickens. **Avian Pathology**, v. 33, n. 2, p. 181–189, 2004.

RASSOL, M. H.; HUSSAIN, I. Preparation and evaluation of Vero-cell Infectious Bursal Disease vaccine in Pakistan. **Vaccine**, v. 24, n. 15, p. 2810-2814, 2006.

RAZMYAR, J.; PEIGHAMBARI, S. M. Molecular characterization of Iranian Infectious Bursal Disease Viruses. **Avian Disease**, v. 52, n. 4, p. 665-669, 2008.

REMORINI, P.; CALDERÓN, M. G.; AGUIRRE, S.; PERIOLO, O.; TORRE, J. L.; MATTION, N. Characterization of Infectious Bursal Disease Viruses from Argentina. **Avian Disease**, v. 50, n. 2, p. 245-251, 2006.

RUDD, M. F.; HEINE, H.G.; SAPATS, S. I.; PAREDE, L.; IGNJATOVIC, J. Characterization of an Indonesian very virulent strain of Infectious Bursal Disease Virus. **Archives of Virology**, v. 147, n. 7, p. 1303–1322, 2002.

RUSSELL, C. J., AND R. G. WEBSTER. The genesis of a pandemic influenza virus. **Cell**, v. 123, n. 3, p. 368–371. 2005.

SANCHEZ, A.B.; RODRIGUEZ, J. F. Proteolytic processing in Infectious Bursal Disease Virus: identification of the polyprotein cleavage sites by site-directed mutagenesis. **Virology**, v. 262, n. 1, p. 190–199, 1999.

SANTOS, B.M.; FARIA, J.E.; RIBEIRO, V. Doenças virais de importância nas aves. **CD nº13**, editora UFV, 2ª Edição, 71p, 2005.

SCHNITZLER, D.; BERNSTEIN, F.; MULLER, H.; BECHT, H. The genetics basics for the antigenicity of the VP2 protein of the Infectious Bursal of Disease Virus. **Journal of General Virology**, v. 74, n. 8, p. 1563-1571, 1993.

SHARMA, J. M.; KIM, I.-J., RAUNTENSCHLEIN, S.; YEH, H.-Y. Infectious Bursal Disease Virus of chickens: pathogenesis and immunosuppression. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 24, n. 1-2, p. 223-235, 2000.

SOLANO, W.; GIAMBRONE, J. J.; WILLIAMS, J. C.; LAUERMAN, L. H.; PANANGALA, V. S.; GARCES, C. Effect of maternal antibody on timing of initial vaccination of young White Leghorn chickens against Infectious Bursal Disease Virus. **Avian disease**, v. 30, n. 4, p. 648-652, 1986.

SPIES, U., MULLER, H. AND BECHT, H. Properties of RNA polymerase activity associated with Infectious Bursal Disease Virus and characterization of its reaction products. **Virus Research**, v. 8, n. 2, p. 127-140, 1987.

STOUTE, S, T., JACKWOOD, D, J., SOMMER-WAGNER S, E., COOPER, G, L., ANDERSON, M, L., WOOLCOCK, P, R., BICKFORD, A, A., SENTIES-CUE, C, G., AND CHARLTON, B. The diagnostics of Very Virulent Infectious Bursal Disease in California pullets. **Avian disease**, v. 53, n. 2, p. 321-326, 2009.

SUN, J.-H.; LU, P.; YAN, X.-Y.; HUA, G.-X.; JIANG, J.; ZHAO, Y. Sequence and analysis of genomic segment A and B of very virulent Infectious Bursal Disease Virus isolated from China. **Journal of Veterinary Medicine Series B**, v. 50, n. 3, p. 148–154, 2003.

TACKEN, M. G. J.; PEETERS, B. P. H.; THOMAS, A. A. M.; ROTTIER, P. J. M.; BOOT, H. J. Infectious Bursal Disease virus capsid protein VP3 interacts both with VP1, the RNA-dependent RNA polymerase, and with viral double-stranded RNA. **Journal of Virology**, v. 76, n. 22, p. 11301-11311, 2002.

TESSARI, E. N. C.; CASTRO, A. G. M.; CARDOSO, A. L. S. P.; KANASHIRO, A. M. I. Ocorrência da doença de Gumboro em aves de postura causadas por cepas hipervirulentas. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 68, n. 1, p.115-117, 2001.

THOMPSON, J. D.; HIGGINS, D. G.; GIBSON, T. J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Research**, v. 22, n. 22, p. 4673-80, 1994.

VAKARIA, V.N.; J. HE.; AHAMED, B.; SNYDER, D. B. Molecular basics of antigenic variation in Infectious Bursal Disease Virus. **Virus Research**, v. 31, n. 2, p. 265-267. 1994.

VAN DEN BERG, T.P. Acute Infectious Bursal disease in poultry: a review. **Avian Pathology**, v. 29, n. 3, p. 175-194, 2000.

VAN LOON, A. A. W. M.; DE HAAS, N.; ZEYDA, I.; MUNDT, E. Alteration of amino acids in VP2 of very virulent Infectious Bursal Disease Virus results in tissue culture

adaptation and attenuation in chickens. **Journal of General Virology**, v. 83, n. 1, p. 121–129, 2002.

VILLEGAS, P.; HAMOUND, M.; PURVIS, L. B.; PEROZO, F. Infectious Bursal Disease Subunit Vaccination. **Avian Disease**, v. 52, n. 4, p. 670-674, 2008.

WANG, X.; ZHANG, H.; GAO, H.; FU, C.; GAO, Y.; JU, Y. Changes in VP3 and VP5 genes during the Attenuation of Very Virulent Infectious Bursal Disease Virus Strain Gx Isolated in China. **Virus Genes**, v. 34, n. 1, p. 67-73, 2007.

WANG, X. M., ZENG, X.W., GAO, H.L., FU, C.Y., WEI, P. Changes in VP2 Gene during the Attenuation of Very Virulent Infectious Bursal Disease Virus Strain Gx Isolated in China. **Avian Disease**, v. 48, n. 1, p. 77–83, 2004.

WEI, Y.; LI, J.; ZHENG, J.; XU, H.; LI, L.; YU, L. Genetic reassortment of Infectious Bursal Disease Virus in nature. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 350, n. 2, p. 277–287, 2006.

WEI, Y.; YU, X.; ZHENG, J.; CHU, H.; XU, H.; YU, X.; YU, L. Reassortant Infectious Bursal Disease Virus isolated in China. **Virus Research**, v. 131, n. 2, p. 279-282, 2008.

WU, C. C.; RUBINELLI, P.; LIN, T. S. Molecular detection and differentiation of Infectious Bursal Disease Virus. **Avian Disease**, v. 51, n. 2, p. 515 – 526, 2007.

WU, H.; SINGH, N. K.; LOCY, R. D.; SCISSUM-GUNN, K.; GIAMBRONE, J. J. Immunization of chickens with VP2 protein of Infectious Bursal Disease expressed in *Arabidopsis thaliana*. **Avian disease**, v. 48, n. 3, p. 663-668, 2004.

XIA, R. X.; WANG, H. Y.; HUANG, G. M.; ZHANG, M. F. Sequence and phylogenetic analysis of a Chinese very virulent Infectious Bursal Diseases Virus. **Archives of Virology**, v. 153, n. 9, p. 1725-1729, 2008.

YAMAGUCHI, T., IWATA, K., KOBAYASHI, M., OGAWA, M., FUKUSHI, H. AND HIRAI, K. Epitope mapping of capsid proteins VP2 and VP3 of Infectious Bursal Disease Virus. **Archives of Virology**, v. 141, n. 8, p. 1493-1507, 1996.

YAMAGUCHI, T.; OGAWA, M.; INOSHIMA, Y.; MIYOSHI, M.; FUKUSHI, H.; HIRAI, K. Identification of sequence changes responsible for the attenuation of highly virulent Infectious Bursal Disease Virus. **Virology**, v. 223, n. 1, p. 219-223, 1996.

YAMAGUCHI, T.; OGAWA, M.; MIYOSHI, M.; INOSHIMA, Y.; FUKUSHI, H.; HIRAI, K. Sequence and phylogenetic analyses of highly virulent Infectious Bursal Disease Virus. **Archives of Virology**, v. 142, n. 7, p. 1441– 1458, 1997.

ZIERENBERG, K.; RAUE, R.; MULLER, H. Rapid identification of “very virulent” strains of Infectious Bursal Disease Viruses by reverse transcription polymerase chain reaction combined with restriction enzyme analysis. **Avian Pathology**, v. 30, n. 1, p. 55–62, 2001.

ZIERENBERG, K.; NIEPER, H.; VAN DEN BERG, T. P.; EZEOKOLI, C. D. VOB, M.; MULLER, H. The VP2 variable region of African and German isolates of Infectious Bursal Disease Virus: comparison with very virulent, “classical” virulent, and attenuated tissue culture-adapted strains. **Archives of Virology**, v. 145, n. 1, p.113–125, 2000.

ZORMAN-ROJS, O.; BARLIC-MAGANJA, D.; MITEVSKI, D.; LUBKE, W.; MUNDT, E. Very virulent Infectious Bursal Disease Virus in Southeastern Europe. **Avian Disease**, v. 47, n.1, p. 186-192, 2003.