



CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DO VÍRUS DA DOENÇA INFECCIOSA DA BURSA (IBDV) DE OCORRÊNCIA NO BRASIL

Olinto Douglas de Oliveira Bialoso¹
Silvia De Carli²
Aline Padilha de Fraga³
Vagner Ricardo Lunge⁴

Resumo

O Brasil ocupa um lugar de destaque na avicultura mundial, sendo o terceiro maior produtor de carne de frango, além de ser o maior exportador. O vírus da doença infecciosa da bursa (IBDV, *Infectious Bursal Disease Virus*) é o agente etiológico da doença de Gumboro e pertence à família *Birnaviridae*, que compreende os vírus com genoma de dupla fita de RNA, bi-segmentados. A forma clínica da doença de Gumboro acomete galinhas entre três e seis semanas de idade que apresentam depressão, anorexia e diarreia mucóide, alta morbidade e variada mortalidade, conforme a cepa do vírus. O objetivo deste trabalho foi realizar a caracterização genético-molecular das variantes antigênicas brasileiras do IBDV, através da análise filogenética do gene *vp2* e identificação de marcadores moleculares. A detecção prévia do IBDV foi realizada pela amplificação do gene do capsídeo viral *vp2*, por transcrição reversa seguido de reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT-qPCR). Obteve-se a sequência parcial do gene *vp2* para duas amostras (SB-5417 e Isolado G15). A análise filogenética demonstra a ocorrência de todos os genótipos no país. Além disso, as variantes antigênicas brasileiras são divididas em dois grupos (G15 e G16). As amostras sequenciadas, obtidas nesse estudo foram agrupadas com o grupo G15.

Palavras-chave: Gumboro; análise filogenética; variantes antigênicas.

INTRODUÇÃO

O Brasil ocupa um lugar de destaque na avicultura mundial, sendo o terceiro maior produtor de carne de frango, além de ser o maior exportador (ABPA, 2015). Portanto, há uma grande preocupação com a sanidade dos plantéis avícolas, principalmente pela grande densidade populacional das aves (sistemas de produção altamente intensivos) e a consequente facilidade para disseminação de patógenos. A doença infecciosa da Bursa (IBD, *Infectious Bursal Disease*), causada pelo IBDV (*Infectious Bursal Disease Virus*), é uma doença de grande impacto econômico na avicultura.

O IBDV é o agente etiológico da doença de Gumboro. Pertence à família *Birnaviridae*, que compreende os vírus com um genoma de dupla fita de RNA, bi-segmentados (definidos como segmentos A e B) (MÜLLER et al, 1979). Também é características desta família a ausência de envelope e presença de capsídeo icosaédrico (MÜLLER et al, 1979).

¹ Aluno do curso de graduação de Medicina Veterinária – Bolsista PIBITI/CNPq – oddeob@gmail.com

² Aluno do curso de graduação de Medicina Veterinária – Bolsista PIBIC/CNPq – silvia.decarli@hotmail.com

³ Doutoranda do curso PPGBioSaúde – alinefraga.vet@gmail.com

⁴ Professor do curso de Medicina Veterinária e PPGBioSaúde – Vagner.lunge@gmail.com

O IBDV pode ser diferenciado em dois sorotipos (1 e 2) por ensaio de vírus neutralização. O sorotipo 1 é patogênico para galinhas, enquanto a infecção com o sorotipo 2 não causa doença clínica, embora anticorpos contra este sorotipo já tenham sido encontrados em perus, galinhas e patos (JACKWOOD et al., 1985; OIE, 2008). O vírus possui tropismo pelas células B da bolsa cloacal, causando uma massiva destruição celular quando ocorre infecção por cepas virulentas (MAHGOUB, 2012). As cepas do sorotipo 1 de IBDV apresentam diferenças antigênicas e de patogenicidade, sendo classificadas em: 1) clássicas (*classical virulent IBDV* - cvIBDV), 2) variantes antigênicas (*antigenic variant IBDV* - avIBDV), e 3) muito virulentas (*very virulent IBDV* - vvIBDV) (MÜLLER et al., 2003; OIE, 2008).

Ikuta et al. (2001) demonstram a ocorrência de dois grupos moleculares específicos das variantes antigênicas do Brasil, identificados como GM15 e GM16. Amostras pertencentes aos outros grupos genéticos, clássicos e muito virulentos também foram descritas. No entanto, até o momento, as variantes antigênicas foram pouco estudadas na estrutura genômica e no nível de patogenicidade onde há uma associação de alguns aminoácidos com a alta virulência do vírus. O conhecimento das variantes antigênicas de ocorrência no país é de extrema importância para a compreensão da interação do IBDV com as aves infectadas e o seu efetivo controle.

O objetivo deste trabalho foi realizar a caracterização genético-molecular das variantes antigênicas brasileiras do IBDV, através da análise filogenética do gene *vp2* e identificação de marcadores moleculares específicos das variantes antigênicas identificadas no Brasil.

MATERIAIS E MÉTODOS

Amostras

Foram coletadas amostras de bursas (frango de corte) com sintomatologia compatível por infecção pelo IBDV, provenientes de lotes industriais. Os órgãos foram coletados através de necropsia nas granjas, embalados e enviados sob refrigeração (4°C) para o laboratório de Diagnóstico Molecular - ULBRA, onde foram armazenados a -20°C até o momento de seu processamento. Também foram obtidos isolados de IBDV pertencentes aos genótipos de ocorrência no país (cvIBDV, vvIBDV e avIBDV) para a caracterização genético-molecular.

Extração de RNA

As amostras de bolsa cloacal foram maceradas e submetidas à extração do material genético através do kit comercial NewGene (Simbios Biotecnologia, Cachoeirinha, RS - Brasil) conforme indicação do fabricante. A detecção e genotipagem inicial do IBDV foi realizada pela amplificação do gene do capsídeo viral (*vp2*), por transcrição reversa seguido de reação em cadeia da polimerase (RT-PCR, *Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction*), conforme descrito previamente (IKUTA et al., 2001).

Desenhos dos primers para sequenciamento

Para uma melhor performance dos experimentos primers foram desenhados neste estudo, para isso foram selecionadas sequências de referência de IBDV disponíveis no GenBank, as mesmas foram alinhadas e as regiões de maior conservação no genoma foram escolhidas (Tabela 1).

Tabela 1. Primers desenhados para sequenciamento do gene *vp2* do IBDV.

Primers	Sentido	Sequência 5' - 3'	Posição genoma Alinhamento Ref	Amplicon tamanho
IBDV-A F1	F	GGA TAC GAT CGG TCT GAC CC	01-20	1161bp
IBDV-A R1	R	CCT GGA TAG TTG CCA CC	1145-1161	1161bp
IBDV-A F2	F	GAT AAC CCA GCC AAT CAC ATC CA	1030-1052	1181bp
IBDV-A R2	R	CGA GCT TGG TGC TTC TAA AGC T	2189-2210	1181bp
IBDV-A F4	F	ATC GGT CTG ACC CCG G	08-23	611bp
IBDV-A R4	R	CCT TCC CCT ACT AGG AC	602-618	611bp
IBDV-A F5	F	GGG TTG ATG TCT GCA ACA GC	557-576	605bp
IBDV-A R1	R	CCT GGA TAG TTG CCA CC	1145-1161	605bp
IBDV-A F2	F	GAT AAC CCA GCC AAT CAC ATC CA	1030-1052	668bp
IBDV-A R5	R	GAT TCG CGA CTA CCT CGT ACC	1677-1697	668bp
IBDV-A F6	F	ACT ACC TGC TGG GCG ATG	1563-1580	648bp
IBDV-A R2	R	CGA GCT TGG TGC TTC TAA AGC T	2189-2210	648bp

Amplificação e sequenciamento do gene *vp2* do IBDV

Reações de RT-PCR foram padronizadas para a amplificação de regiões que abrangem todo o gene *vp2* para posterior sequenciamento. As condições de amplificação foram, Nested 95°C durante 3 min, 40 ciclos (94°C durante 20s, 55°C durante 40s, 72°C durante 60s e extensão final a 72°C durante 5 min). Foram utilizados os primers desenhados (Tabela 1), com base em sequências de IBDV do Brasil e sequências de referência encontradas no GenBank. As amostras positivas por RT-PCR foram submetidas ao sequenciamento.

As reações de sequenciamento foram realizadas com o reagente BigDye conforme determinado pelo fornecedor (Applied Biosystems). As reações de sequenciamento foram realizadas no termociclador Veriti 96 (Applied Biosystems, USA) e os produtos desta reação serão purificados com o kit EdgeBio (Applied Biosystems) conforme protocolo do fornecedor. A amostra foi levada ao sequenciador automático Applied Biosystems™ Genetic Analyser 3130. Os cromatogramas gerados para cada uma das sequências senso e antisenso de cada amostra foram analisados com o pacote de programas DNASTar.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Análise Filogenética

Foram utilizadas sequências de referência disponíveis no GenBank, de ocorrência no mundo e no Brasil, para o alinhamento de nucleotídeos foi utilizado método ClustalW e para a construção da árvore filogenética, o método UPGMA, conforme demonstrado na Figura 1.

A análise filogenética demonstra a ocorrência de todos os 3 genótipos de IBDV no país (Figura 1). Além disso, as variantes antigênicas brasileiras são divididas em dois grupos (G15 e G16) conforme relatado por IKUTA, 2001. As amostras sequenciadas (SB-5417 e Isolado G15), obtidas nesse estudo, foram agrupadas com o G15. Além disso, a amostra SB-5417 apresenta mais de 94% de similaridade com amostras de IBDV isoladas na década de 1990 (G48 e G11) (IKUTA, 2001) e Prezotto-BR, demonstrando a ocorrência deste genótipo ao longo das últimas décadas nos plantéis brasileiros. Amostras brasileiras G16 são agrupadas em conjunto com amostras da Argentina e Uruguai, apresentando similaridade de 93,5%.



Figura 1. Análise Filogenética com sequências de abrangência mundial e cepas brasileiras.

Já é sabido de diferenças de aminoácidos em diferentes posições da proteína do capsídeo viral conferem graus de virulência diferentes. Com o intuito de avaliar o perfil de aminoácidos das amostras do Brasil (G15 e G16) foi realizado um alinhamento de aminoácidos. A análise de aminoácidos evidencia algumas assinaturas moleculares, concordando com Hernandez et al. (2015), em que demonstra na posição 272T de todas as variantes antigênicas G15 e G16, diferentemente do encontrado em cepas clássicas e muito virulentas do vírus (272I). O mesmo ocorre na posição 296F. Em nosso estudo foi possível constatar uma posição característica de cada grupo antigênico, sendo encontrado no grupo G15 245E, bem como nos outros genótipos de IBDV, e 245G nas amostras pertencentes ao G16 (Tabela 2).

Tabela 2. Diferença de aminoácidos entre sequencias referências de cepas IBDV.

Genótipo	Amostra	Posição aminoácido VP2												
		242	245	253	256	270	272	279	284	289	290	294	296	299
vvIBDV	UK661	I	E	Q	I	A	I	D	A	L	M	I	I	S
vvIBDV	Faragher	I	E	Q	V	A	I	D	A	L	M	L	I	N
cvIBDV	Edgar	I	E	H	A	T	I	D	T	L	M	L	I	N
cvIBDV	IC_IBDV	V	E	H	V	T	I	N	T	L	M	L	I	N
avIBDV (G15)	SB5417	V	E	Q	V	T	T	N	A	P	I	L	F	N
	G48	V	E	Q	V	T	T	N	A	P	I	L	F	N
	G11	V	E	Q	V	T	T	N	A	P	I	L	F	N
avIBDV (G16)	Prezotto	V	E	Q	V	T	T	N	A	P	I	L	F	N
	421101	V	G	Q	V	T	T	N	A	P	I	L	F	S
	dIBDV_UY	V	G	Q	V	T	T	N	A	P	I	L	F	S
	M42_07	V	G	Q	V	T	T	N	A	P	I	L	F	S
	221201	V	G	Q	V	T	T	N	A	P	I	L	F	N
	C3	V	G	Q	V	T	T	N	A	P	I	L	F	S
	G68	V	G	Q	V	T	T	N	A	P	V	L	F	N
	G81	V	G	Q	V	T	T	N	A	P	V	L	F	N

CONCLUSÕES

Os resultados demonstram uma alta similaridade entre as amostras sequenciadas e cepas que estão em circulação na Argentina e Uruguai, tendo em vista que estes países são os principais parceiros econômicos brasileiros, deve-se ter um controle sobre os planteis avícolas para assim controlar a disseminação dessas cepas encontradas.

Esse trabalho continua em andamento para aumentar o número de amostras sequenciadas, avaliando toda a região do gene *vp2*, para uma completa caracterização das amostras de IBDV recentes.

REFERÊNCIAS

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE PROTEÍNA ANIMAL (ABPA). Relatório Anual. Disponível em <http://abpa-br.com.br/files/RelatorioAnual_UBABEF_2015_DIGITAL.pdf>

BERNARDINO, A., LEFFER, E. Doença infecciosa da bolsa de frâncio. IN: JÚNIOR, A. B., SILVA, E. N., DI FÁBIO, J., SESTI, L., ZUANAZE, M. A. F. **Doenças das aves**. 2º Ed. Campinas: Facta, 2009. 651-73.

ETERRADOSSI, N., SAIF, Y. M. Infectious bursal disease. In: SAIF, Y. M (Eds). **Diseases of poultry**. 12ª Ed. Ames: Blackwell, 2008.185-208.

GUY, J. S., WEST, M. A., FULLER, F. J. Physical and genomic characteristics identify chicken proventricular necrosis virus (R11/3 Virus) as a novel birnavirus. **Avian Diseases**, v55, p. 2-7, 2011.

HERNÁNDEZ, M., TOMÁS, G., MARANDINO, A., IRAOLA, G., MAYA, L., MATTION, N., HERNÁNDEZ, D., VILLEGAS, P., BANDA, A, PANZERA, Y. & PÉREZ, R. Genetic characterization of South American infectious bursal disease virus reveals the existence of a distinct worldwide-spread genetic lineage, **Avian Pathology**, 2015.

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

IKUTA, N., LUNGE, V. R. FONSECA, A. K. S. Birnaviridae. In: Flores, E. F. (Eds). **Virologia Veterinária**. 2ª Ed. Santa Maria: UFSM, 2012. 941-52.

JACKWOOD, D. J., SAIF, Y. M., MOORHEAD, P. D. Immunogenicity and antigenicity of infectious bursal disease virus serotypes I and II in chickens. **Avian Diseases**, v. 29, p.1184-94, 1985.

MAHGOUB, H. A. An overview of infectious bursal disease. **Archives of Virology**, v. 157, p. 2047-57, 2012.

MÜLLER, H., SCHOLTISSEK, C., BECHT, H. The genome of infectious bursal disease virus consists of two segments of double-stranded RNA. **Journal of Virology**, v.31, p. 584-9, 1979.

ORGANIZAÇÃO INTERNACIONAL DE EPIZOOTIAS. **Infectious bursal disease. Terrestrial Manual.** 2008; 549-65. Disponível em <http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.03.12_IBD.pdf>

SHARMA, J. M., KIM, I. J., RAUTENSCHHEIN, S., YEH, H. Y. Infectious bursal disease virus of chickens: pathogenesis and immunosuppression. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 24, p. 223-35, 2000.