

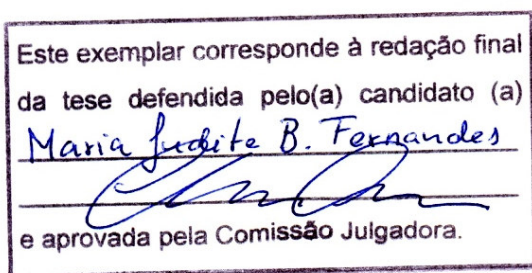
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA



MARIA JUDITE BITTENCOURT FERNANDES

**“ANÁLISE MOLECULAR PARCIAL DOS GENES VP1 E
VP2 DO VÍRUS DA DOENÇA INFECCIOSA DA BURSA
ISOLADOS NO BRASIL”**



Tese apresentada ao Instituto de Biologia para obtenção do Título de Doutor em Genética e Biologia Molecular, na área de Microbiologia.

Orientadora: Profa. Dra. Clarice Weis Arns

Co-Orientadora: Dra. Isabela Cristina Simoni

Campinas, 2010

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP**

F391a

Fernandes, Maria Judite Bittencourt

Análise molecular parcial dos genes VP1 e VP2 do vírus da doença infecciosa da bursa isolados no Brasil / Maria Judite Bittencourt Fernandes. – Campinas, SP: [s.n.], 2010.

Orientadoras: Clarice Weis Ams, Isabela Cristina Simoni.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Vírus da doença infecciosa da bursa. 2. Gene VP1.
3. Gene VP2. 4. Reação em cadeia de polimerase via transcriptase reversa. 5. Sequenciamento de DNA. 6. Filogenia. I. Ams, Clarice Weis, 1958-. II. Simoni, Isabela Cristina. III. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. IV. Título.

(rodt/ib)

Título em inglês: Analysis on partial sequence of VP1 and VP2 genes of the brazilian infectious bursal disease virus isolated in Brazil.

Palavras-chave em inglês: Infectious bursal disease virus; VP1 gene; VP2 gene; Reverse transcriptase polymerase chain reaction; DNA sequencing; Phylogeny.

Área de concentração: Microbiologia.

Titulação: Doutora em Genética e Biologia Molecular.

Banca examinadora: Clarice Weis Ams, Marcelo Brocchi, Liana Maria Cardoso Verinaud, Tereza Cristina Cardoso, Alda Maria Backx Noronha Madeira.

Data da defesa: 04/05/2010.

Programa de Pós-Graduação: Genética e Biologia Molecular.

Campinas, 4 de maio de 2010.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Clarice Weis Arns (Orientador(a))


Assinatura

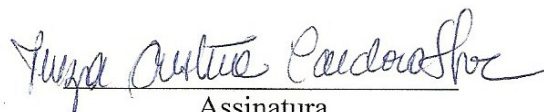
Prof. Dr. Marcelo Brocchi


Assinatura

Profa. Dra . Liana Maria Cardoso Verinaud


Assinatura

Profa. Dra. Tereza Cristina Cardoso


Assinatura

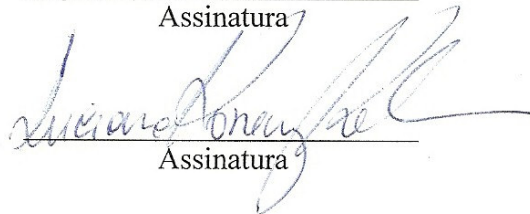
Profa. Dra. Alda Maria Backx Noronha Madeira


Assinatura

Prof. Dr. Marcelo Lancellotti


Assinatura

Profa. Dra. Luciana Lonecny Kohn


Assinatura

Profa. Dra. Edwirges Maristela Pituco


Assinatura

Trabalho desenvolvido no Laboratório de Biologia
Celular do Centro de Pesquisa e Desenvolvimento de
Sanidade Animal do Instituto Biológico, São Paulo.

*A sabedoria é iniciada na ciência de Deus
e, por sua escolha, decide de suas obras.
Se a riqueza é um bem desejável na vida,
que há de mais rico que a Sabedoria que tudo criou?
Se a inteligência do homem consegue operar,
o que, então, mais que a Sabedoria, é artífice dos seres?
E se alguém ama a justiça,
seus trabalhos são virtudes;
ela ensina a temperança e a prudência,
a justiça e a força:
não há ninguém que seja mais útil aos homens na vida.
Se alguém deseja uma vasta ciência,
ela sabe o passado e conjectura o futuro;
conhece as sutilezas oratórias e revolve os enigmas;
prevê os sinais e os prodígios,
e o que tem que acontecer no decurso das idades e dos tempos.
Portanto, resolvi tomá-la por companheira de minha vida,
cuidando que ela será para mim uma boa conselheira,
e minha consolação nos cuidados e na tristeza.*

(Sabedoria 8, 4-9)

AGRADECIMENTOS

À Deus pela graça da vida e presença em todos os momentos de minha vida.

À Profa. Dra. Clarice W. Arns pela oportunidade, confiança e orientação, e também pelo carinho e acolhida em seu grupo.

À Pesquisadora Dra. Isabela C. Simoni pela co-orientação e desprendimento pelo assunto da tese, e por esta longa jornada de trabalho.

À funcionária Maria Luiza Baptista dos Santos do Laboratório de Biologia Celular pelo auxílio técnico em todos esses anos de Biológico, mas principalmente pela amizade nos nossos momentos de lazer (almoço, tricô e bate-papo).

A todas as minhas estagiárias que passaram pelo laboratório, representadas nominalmente pela Alyne Vieira e também às Camilas que colaboraram especificamente neste trabalho. E a “postixa” Gabriela, pelo imenso auxílio neste trabalho. Temos o que aprender com estagiários e também rejuvenescer!

À UNICAMP e ao Instituto Biológico pela oportunidade e suporte para obtenção deste título.

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo auxílio concedido a esta pesquisa (N.02/10110-3).

Ao pessoal do Laboratório de Virologia animal/Unicamp: Maria Ângela (“grande” companheira de congresso) e Luciana Antoniassi: pelas dicas, auxílio e almoços; Luciana Kohn, Márcia, Mateus e Paulo, e aos funcionários Paula e Geneci pelo carinho e acolhida no laboratório.

Às pesquisadoras, Eliana Tessari, Ana Iba e Ana L. Cardoso do Laboratório de Descalvado, e Nilce Gama do Laboratório de Bastos, do Instituto Biológico, pela coleta e envio das amostras assim como à médica-veterinária Maria Beatriz Cardoso da empresa Lohamnn.

Aos pesquisadores Drs. Eliana Rivas e Ricardo Harakava, do Centro de P&D de Sanidade Vegetal do Instituto Biológico, muito obrigado pelo seqüenciamento e filogenia, além do grande auxílio, mostrando a importância do apoio e estudos multidisciplinares.

À minha mãe, Judith (*in memorium*) e meu pai, José Edgard pela educação, formação e amor, assim como para todos da GRANDE família, até para o PEQUENO Thiago: a vocês, pelos inesquecíveis momentos de descontração, alegria, união, paz! e amor.

Ao meu esposo, Maurício, por todo apoio e paciência durante o doutorado, mas principalmente pelo carinho e companheirismo compartilhados em todos estes anos de casamento regado de muito amor, alegria, viagens, Ah! e algumas desavenças, sempre na presença de Deus.

Enfim a todos que direta ou indiretamente colaboraram para a execução deste trabalho,
MUITO OBRIGADA!

ÍNDICE

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS.....	ix
RESUMO	x
ABSTRACT.....	xii
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Histórico.....	2
1.2 Agente etiológico.....	4
1.3. Variabilidade do IBDV.....	7
1.4 Doença e sinais clínicos do IBDV.....	9
1.5 Diagnóstico.....	11
1.6 Prevenção e controle.....	13
2. OBJETIVOS.....	16
2.1. Objetivos gerais.....	16
2.2. Objetivos específicos.....	16
3. ARTIGOS.....	17
Artigo I.....	17
Artigo II.....	24
4. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	40
5. CONCLUSÕES.....	43
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	44
7. ANEXOS.....	57

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

aa	aminoácido
AGD	Imunodifusão em gel de ágar
AM	Anticorpos maternos
cv	clássico virulento
ELISA	Ensaio imunoenzimático
IBD	Doença infecciosa da bursa
IBDV	Vírus da doença infecciosa da bursa
IPNV	Vírus da necrose pancreática infecciosa
nm	nanômetro
nt	nucleotídeo
ORF	(Open read frame) Fase aberta de leitura
RdRp	RNA polimerase RNA dependente
RE	enzima de restrição
RFLP	polimorfismo de comprimento dos fragmentos de restrição
RNA	ácido ribonucleico
RT-PCR	Transcrição reversa-reação de polimerase em cadeia
ScFv	fragmentos da cadeia única variável de anticorpo
SN	Soroneutralização
VN	Vírusneutralização
VP1	Proteína viral 1
VP2	Proteína viral 2
VP3	Proteína viral 3
VP4	Proteína viral 4
VP5	Proteína viral 5
vv	(very virulent) muito virulento

RESUMO

A doença infecciosa da bursa (IBD), denominada também doença de Gumboro, é uma doença aguda, imunossupressora, altamente contagiosa de aves jovens e de grande importância econômica para a avicultura. O vírus da doença infecciosa da bursa (IBDV), sorotipo 1, pode ser classificado de acordo com sua antigenicidade e patogenicidade em amostras clássicas virulentas (cv), atenuadas, variantes antigênicas ou muito virulentas (vv). Estas diferenças antigênicas são encontradas na região hipervariável do gene VP2, que é responsável pela indução de anticorpos neutralizantes e também dos possíveis marcadores de virulência que ainda não estão bem estabelecidos. O gene VP1 parece também apresentar um papel na virulência do vírus. Primeiramente, o objetivo do presente trabalho foi a identificação e caracterização molecular de 66 amostras brasileiras de IBDV através da RT-PCR de um fragmento do gene VP2 seguida pela digestão por enzimas de restrição (RE) e posterior confirmação pelo sequenciamento. A análise da RT-PCR/RE classificou 25 isolados como cepas vv e 16 como cepas cv além da classificação de 6 grupos moleculares. O sequenciamento também confirmou esta classificação com a presença dos aminoácidos (aa) típicos das amostras vv (222A, 242I, 256I e 294I). Em 3 destas amostras vv também se observou mutações únicas que mostram pequenas, mas contínuas alterações dos vvIBDV circulantes nas granjas brasileiras. A árvore filogenética confirmou a origem comum das nossas amostras vv com os isolados de outros países assim como a origem monofilética destas amostras. Posteriormente foi feito a RT-PCR de um fragmento representativo do gene VP1 das amostras positivas para IBDV e a análise das sequências e filogenética. Quatorze amostras vv e três cv tiveram êxito nas sequências analisadas. Treze

amostras vv apresentaram as substituições de aa comuns para as amostras vv (145T, 146D, 147N e 242E), exceto um que apresentou a sequência das amostras cv e na filogenia agrupou-se com estas amostras. A árvore a partir da VP1 pressupõe um rearranjo genético deste gene. Esta amostra com perfil do segmento A de amostra vv e do segmento B de cv seria o primeiro relato no Brasil de um rearranjo genético natural. Estes rearranjos de segmentos que também foram observados em amostras de outros países ou que podem ser produzidos em laboratório (quimeras) mostram que o segmento B pode estar contribuindo para a patogênese deste vírus. A origem destes rearranjos pode ser de troca genética com o uso de vacinas vivas ou se aceita a hipótese de que o segmento VP1 dos vvIBDV se originaram de um rearranjo genético de fonte desconhecida, estes rearranjos com segmento vvVP2 e cvVP1, seriam descendentes dos ancestrais dos vvVP1. Apenas um seqüenciamento completo das duas sequências e estudos in vivo poderão caracterizar o papel da VP1 na virulência desta amostra. Assim, o monitoramento contínuo das amostras de IBDV através da caracterização molecular pela análise das sequências dos genes e a detecção de alterações genéticas que possam influenciar a patogenicidade do vírus são de extrema importância, pois geram informações fundamentais que possibilitam e subsidiam o controle desta doença no Brasil.

ABSTRACT

“ANALYSIS ON PARTIAL SEQUENCE OF VP1 AND VP2 GENES OF THE BRAZILIAN INFECTIOUS BURSAL DISEASE VIRUS ISOLATED IN BRAZIL”

Infectious bursal disease virus (IBDV) causes a disease among young chickens of great economic importance to the poultry industry worldwide both for the both mortality as the immunosuppression. Two distinct serotypes, 1 and 2, of IBDV are recognized. Only the serotype 1 is pathogenic for chickens and classified according to the antigenicity and/or pathogenicity in classical virulent (cv) strains, very virulent (vv) strains, antigenic variant strains, and attenuated strains. This classification has been based mainly on the VP2 gene sequence, more specifically on the hypervariable region corresponding to the induction of neutralizing antibodies and the serotype specificity. However, the fundamental molecular basis for pathogenicity is not yet clear. Studies with the VP1 gene have also shown its possible role in this virulence and pathogenicity. Firstly, the aim of the present paper was the molecular characterization of sixty-six Brazilian IBDV isolates from broiler and layers flocks during the period from 1997 to 2005 by RT-PCR followed by restriction enzyme analysis of a fragment from VP2 gene variable region. Sequence and phylogenetic analysis of the positive isolates were also carried out. Twenty-five of the isolates were identified as very virulent (vv) and sixteen as classic virulent (cv). All of vv isolates had the typical amino acid (aa) residues and clustered in a phylogenetic tree with the vvIBDV strains. Three vv isolates presented four common aa substitutions and differed from other vv strains indicating that the vvIBDVs circulating on Brazilian farms are undergoing slight but

continuous exchanges. Furthermore, the Brazilian IBDV isolates characterized by the VP2 sequence in cv and vv strains were analyzed by the sequence and phylogeny of the VP1 gene fragment. Our vv isolates maintained clustered with the other vvIBDVs in phylogenetic tree obtained from the VP1 gene and presented the common aa too. The same occurred with the cv isolates. However, one isolate vv showed both characters, cv and vv into VP1 sequence and clustered with the ours and other cv isolates in the tree. This isolate has similar type of a reassortment.

1. INTRODUÇÃO

O Brasil é o maior exportador mundial de carne de frango com participação acima de 40% do mercado mundial e ainda está entre os maiores produtores mundiais, em 3º lugar, atrás somente da China e dos Estados Unidos. Em 2008, apesar da crise econômica deste período, a produção de carne de frango foi em torno de 11 milhões de toneladas. Desta produção, 70% abastecem o mercado interno e o restante 30% é exportado. Segundo relatório 2008/2009 da Associação Brasileira dos Produtores e Exportadores de Frangos (ABEF, 2010), este valor corresponde a um aumento de 11% no volume com embarques na ordem de 3,6 milhões de toneladas e de 40% na receita cambial, em torno de US\$ 7 bilhões e projeção de 5% para o ano de 2009, não consolidado ainda. Também ocupa a liderança interna das exportações de carne, o 3º ranking na exportação do agronegócio brasileiro e o 6º no âmbito geral.

Este enorme potencial da produção avícola ocorre graças à forte integração do setor produtivo e agroindústria, com a evolução da qualidade e sanidade. Com esta importância econômica da avicultura é imprescindível a implantação de medidas sanitárias que aliadas às pesquisas contribuam para o controle e prevenção de doenças aviárias.

A doença infecciosa da bursa (IBD) é uma doença aguda altamente contagiosa de aves jovens. A importância dessa doença na avicultura comercial deve-se não só à mortalidade e aos maus resultados de desempenho que pode acarretar, mas principalmente pela imunossupressão que aumenta a suscetibilidade das aves a outras infecções, bacterianas ou virais, e uma diminuição da resposta às vacinações.

1.1. HISTÓRICO

A primeira descrição da doença infecciosa da bursa (IBD) foi feita por Cosgrove, em 1962, e referida como “nefroze aviária” devido aos danos renais causados em frangos de corte. A denominação “doença de Gumboro” foi utilizada como sinônimo para esta doença devido aos primeiros surtos ocorrerem na região de Gumboro em Delaware/EUA (Lukert & Saif, 2003). Cosgrove (1962) também verificou um aumento do volume da bursa de Fabrício e ausência de bactérias sugerindo uma etiologia viral. Inicialmente, Winterfield & Hitchner (1962) pesquisando esta síndrome nefrose-nefrite, isolaram um agente viral semelhante ao vírus da bronquite infecciosa, relacionando-o a esta síndrome. Entretanto em estudos posteriores, houve a distinção dessa doença com este vírus e o isolado foi referido como “agente infeccioso da bursa” (Winterfield *et al.*, 1962). Em 1970, Hitchner propôs o termo “doença infecciosa da bursa” para esta doença que apresenta como característica principal lesões na bursa de Fabrício (Becht, 1981; Müller *et al.*, 1992; Lasher & Davis, 1997; Lukert & Saif, 2003). Esta é a nomenclatura atual embora “doença de Gumboro” seja também ainda citada na literatura. O caráter imunossupressivo do vírus foi relatado por Allan *et al.* (1972) e um segundo sorotipo foi identificado por McFerran *et al.* (1980). A IBD começou a ser vista a partir de 1980 como um fator causador de perdas econômicas importantes para a avicultura. No Brasil, a doença foi descrita pela primeira vez por Nakano *et al.* (1972) através de achados anatomopatológicos e em 1978, Saukas obteve o isolamento viral introduzindo o diagnóstico desta doença através da técnica de difusão em gel de ágar (AGD). A partir de 1980, nos Estados Unidos, encontrou-se isolados virais que apresentavam diferenças antigênicas e os vírus de IBDV foram classificados em subtipos,

incluindo estes vírus “variantes americanos” (Jackwood & Saif, 1987; Lukert & Saif, 2003). Na Europa, no fim desta mesma década, ocorreram surtos da IBD em granjas com alta mortalidade e ocasionados por vírus antigenicamente semelhantes aos IBDV circulantes (Chettle *et al.*, 1989; van den Berg *et al.*, 1991; Lin *et al.*, 1993; Zierenberg *et al.*, 2001; Banda & Villegas, 2004). Estes vírus de alta virulência foram denominados de vírus “muito virulentos” (vv) e em contrapartida os anteriores passaram a denominar-se “clássicos virulentos”(cv). Estes vvIBDVs foram disseminados para todo o mundo (Nagarajan & Kibenge, 1997; van den Berg, 2000). No Brasil, o primeiro relato destes vvIBDVs foi feito por Di Fabio *et al.* em 1999. Posteriormente, Ikuta *et al.* (2001) introduziram a genotipagem das amostras através da técnica de polimorfismo de comprimento dos fragmentos de restrição (RFLP) após a RT-PCR para a classificação dos IBDVs e obtenção dos grupos moleculares. Além de amostras com perfil de RFLP dos vvIBDVs também foram encontradas amostras denominadas de variantes brasileiras que exibiram perfis de RFLP diferentes e distintos inclusive das variantes americanas. Entretanto apenas os vvIBDVs continuaram a ser identificados no Brasil (Banda & Villegas, 2004; Gomes *et al.*, 2005; Jackwood & Sommer, 2007). Tanto as variantes como os vvIBDV podem ser caracterizados pelos critérios de antigenicidade, patogenicidade e relação genética baseados na região hipervariável da proteína VP2 codificada pelo segmento A (Müller *et al.*, 2003; van den Berg *et al.*, 2004). Estudos com a proteína VP1, codificada pelo segmento B também demonstraram o papel desta proteína na virulência dos vvIBDV (Liu & Vakharia, 2004; Boot *et al.*, 2005). Recentemente sugere-se que a alta virulência dos vvIBDVs deve-se a um efeito sinérgico de mutações em ambos segmentos (Hon *et al.*, 2006).

1.2. AGENTE ETIOLÓGICO

O vírus da doença infecciosa da bursa (IBDV) pertence à família *Birnaviridae*, gênero *Avibirnavirus*. O protótipo desta família é o vírus da necrose pancreática infecciosa (IPNV) dos peixes e há também vírus ocorrendo em insetos e moluscos (Fauquet *et al.*, 2005).

O vírion apresenta um capsídeo icosaédrico, sem envoltório, com diâmetro de cerca de 60nm e com genoma viral constituído por dois segmentos de RNA de fita dupla (Dobos *et al.*, 1979; Müller *et al.*, 1979; Becht, 1981; Fauquet *et al.*, 2005) (Figura 1).

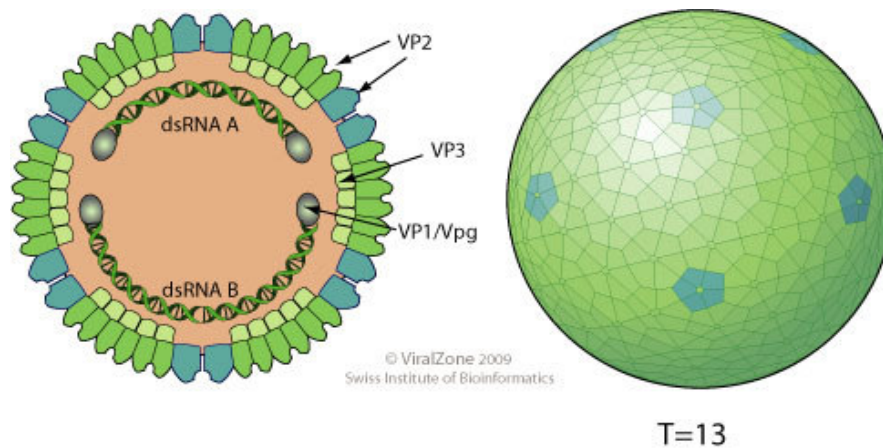
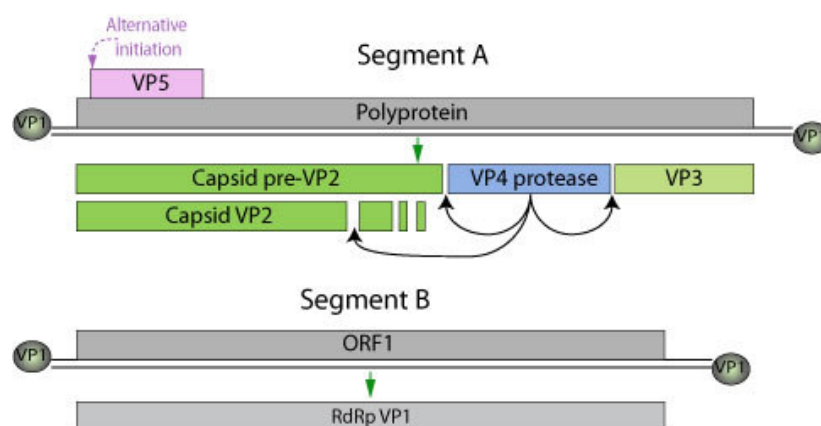


Figura 1: Diagrama de uma partícula do vírus da doença infecciosa da bursa.

Os segmentos genômicos de IBDV denominados de A e B apresentam peso molecular de $2,5 \times 10^6$ e $2,2 \times 10^6$ e tamanho aproximado de 3,2 e 2,8 kb respectivamente (Figura 2) (Dobos *et al.*, 1979; Müller *et al.*, 1979; Becht, 1981).



Source: ViralZone www.expasy.org/viralzone,
Swiss Institute of Bioinformatics

Figura 2: Organização genômica do vírus da doença infecciosa da bursa.

O segmento A contém duas “open reading frame” (ORF) parcialmente sobrepostas (Hudson *et al.*, 1986; Spies *et al.*, 1990; Müller *et al.*, 1992). A primeira ORF codifica a proteína não estrutural VP5 de 17kDa. Esta proteína é encontrada apenas nas células infectadas e não é essencial para a replicação do vírus atuando na liberação de novas partículas virais, e possivelmente tenha um papel na disseminação e patogênese do IBDV (Mundt *et al.*, 1995; Lombardo *et al.*, 2000). A segunda e maior ORF codifica uma poliproteína precursora de 110 kDa (Azad *et al.*, 1987; Kibenge *et al.*, 1997; van den Berg, 2000). A proteína VP4 (28kDa) é uma proteína não estrutural que está envolvida no

autoprocessamento desta poliproteína como uma protease codificada pelo vírus produzindo pVP2, VP3 e a própria VP4 (Dobos *et al.*, 1979; Hudson *et al.*, 1986; Azad *et al.*, 1987). A proteína pVP2 é processada posteriormente na proteína VP2 provavelmente no processo de maturação ou liberação do vírus e não através de proteases celulares (Kibenge *et al.*, 1997; Muller *et al.*, 2003; Wu *et al.*, 2007). As proteínas VP2 (42 kDa) e VP3 (32kDa) são as principais proteínas do capsídeo correspondendo a 51% e 40% respectivamente das proteínas virais (Dobos *et al.*, 1979; Lukert & Saif, 2003). A proteína VP2 localizada na superfície externa do capsídeo é altamente hidrofóbica e dependente-conformacional, e contem os epítomos sorotipo-específicos, responsáveis pela indução de anticorpos neutralizantes (Hudson *et al.*, 1986; Azad *et al.*, 1987; Bayliss *et al.*, 1990). Já a proteína VP3, interna ao capsídeo, apresenta os epítomos grupo-específicos (Nagarajan & Kibenge, 1997; Lukert & Saif, 2003; Wu *et al.*, 2007). Também forma complexos com VP1 que parecem estar envolvidos na morfogênese das partículas de IBVD: em sua replicação e montagem (Lombardo *et al.*, 1999; Tacken *et al.*, 2000; Maraver *et al.*, 2003).

O segmento B contém uma única ORF que codifica a proteína denominada VP1 de aproximadamente 90kDa. VP1 apresenta atividade de RNA polimerase RNA-dependente (RdRp) e pode ser encontrada tanto como uma proteína livre ou covalentemente ligada em ambas extremidades dos dois segmentos do genoma (Müller & Nitschke, 1987; Spies, *et al.*, 1987; Müller *et al.*, 1992; Nagarajan & Kibenge, 1997, von Einem *et al.*, 2004).

O IBVD apresenta dois sorotipos, 1 e 2, sendo que apenas o sorotipo 1 é patogênico para galinhas enquanto o sorotipo 2 isolado principalmente de perus não está relacionado a quadros patogênicos nem em perus nem em galinhas (McNulty *et al.*, 1979; McFerran *et al.*, 1980; Jackwood *et al.*, 1982; Müller *et al.*, 1992).

O IBDV é muito estável resistindo a diversos tratamentos com agentes químicos e físicos. O vírus resiste a tratamentos com éter e clorofórmio e é ainda viável após 5h a 56°C. Embora seja inativado a pH 12 não é afetado em pH 2. Entre diversos desinfetantes testados, derivados do fenol e compostos quaternários não tem ação sobre o vírus, apenas complexos iodados tem efeito deletérico sobre este vírus, assim como uma solução de cloramina a 0,5% que pode destruí-lo em 10 min. Ainda detergentes a base de hidróxido de sódio 0,05% também inativa o vírus. Em contrapartida, o vírus sobrevive por 30 min. a 60°C, mas não a 70°C (Lukert & Saif, 2003).

1.3. VARIABILIDADE DO IBDV

A variabilidade antigênica entre os isolados do sorotipo 1 de IBDV foi observada a partir da década 80 nos EUA quando ocorreram surtos da doença subclínica de IBDV em lotes vacinados. Os vírus isolados ainda que classificados como sorotipo 1, não foram neutralizados pela vacinação. Através do teste de vírus-neutralização (VN), Jackwood & Saif (1987) identificaram diferenças antigênicas significativas entre estes vírus que os classificaram em pelo menos 6 subtipos incluindo os isolados americanos atualmente denominados de variantes. Assim um surto de IBDV pode ocorrer em um lote vacinado causado por um subtipo antigênico diferente.

Na Europa, no final da década de 80, ocorreram surtos da doença, mas com mortalidade elevada dos lotes (Chettle *et al.*, 1989; van den Berg *et al.*, 1991). Os vírus responsáveis por estes surtos foram denominados de “muito virulentos”, em inglês “very virulent” (sigla vv), por apresentarem alta virulência, mas são antigenicamente relacionados

aos vírus clássicos sorotipo 1 de IBDV, que são atualmente denominados de clássicos virulentos e abreviados por cv (Abdel-Alim & Saif, 2001 van den Berg *et al.*, 1991). Estes vvIBDVs foram posteriormente identificados em países de outros continentes como África, Ásia e América Latina incluindo o Brasil (Lin *et al.*, 1993; Cao *et al.*, 1998; Di Fabio *et al.*, 1999; Zierenberg *et al.*, 2000; van den Berg, 2000). Ainda recentemente estes vvIBDVs estão emergindo em alguns países como Uruguai, Argentina e Tanzânia (Hernández *et al.*, 2006; Remonini *et al.*, 2006; Kasanga *et al.*, 2007).

Estudos comparativos de sequências do segmento A de vários IBDV identificaram uma região variável no gene VP2 (Bayliss, 1990; Kibenge *et al.*, 1990; Müller *et al.*, 1992). A sequência de nucleotídeos (nt) está localizada dentro dos sítios de restrição das enzimas *AccI* e *SpeI* e que corresponde aos aminoácidos (aa) 206 a 350. Esta região foi denominada de região hipervariável *AccI-SpeI* e é altamente hidrofóbica mas com dois domínios hidrofílicos em cada terminal e localizados na superfície do vírus (Figura 3). O domínio A corresponde as posições 212-224 enquanto o domínio B as posições 314-324 (Bayliss *et al.*, 1990).

Estes domínios constituem epítomos conformacionais responsáveis pela indução dos anticorpos neutralizantes. Alterações nestes domínios (variação “shift”) podem provocar mudanças nas propriedades antigênicas e patogênicas do IBDV (Eterradossi *et al.*, 1998, van den Berg, 2000). Mutações na posição 222 e 318, respectivamente nos domínios A e B, que representam epítomos antigenicamente importantes induziram o escape da neutralização de determinados anticorpos monoclonais (Schnitzler *et al.*, 1993; Dormitorio *et al.*, 1997). Também alterações na região entre estes dois domínios afetaram a antigenicidade, como na posição 254 das amostras variantes (Jackwood *et al.*, 2001). Dessa

forma foi confirmada que a base molecular da antigenicidade do IBDV está relacionada com esta região do gene da proteína VP2 e que mudanças neste local estão associadas com o surgimento dos vírus vvIBDV e variantes (Azad *et al.*, 1987; Schnitzler *et al.*, 1993; Brown *et al.*, 1994; Vakharia *et al.*, 1994; Eterradosi *et al.*, 1998).

Outras mudanças nesta sequência foram correlacionadas à adaptação e atenuação em culturas celulares e observadas tanto nas amostras variantes como nas “very virulent”. As principais alterações verificadas foram nas posições: Q253H, D279N, A284T e S330R (Mundt, 1999; Lim *et al.*, 1999; Yu *et al.*, 2000; van Loon *et al.*, 2002; Kwon & Kim, 2004). Esta última posição parece estar mais envolvida na virulência em galinhas do que na infecção em culturas celulares (Mundt, 1999).

Concomitantemente aos estudos com o gene VP2, foram feitos estudos com o gene VP1. O sequenciamento e comparação das sequências deduzidas de aa dos vvIBDV mostraram diversas posições (de 16-17) características deles incluindo 8 únicas (Brown *et al.*, 1996; Yamaguchi *et al.*, 1997). Além disso, após a determinação que o gene VP2 não seria o único responsável pelo fenótipo virulento (Boot *et al.*, 2000), muitos outros estudos vem correlacionando também este gene VP1 à virulência dos vvIBDV (Liu & Vakharia, 2004; Boot *et al.*, 2005).

1.4. DOENÇA E SINAIS CLÍNICOS

A doença pode se manifestar de duas formas, a aguda e a subclínica, dependendo da idade das aves infectadas. A forma subclínica ocorre em galinhas com menos de 3 semanas de idade. Nesta fase, ocorre o desenvolvimento do sistema imunitário das aves pela bursa

de Fabrício, ou seja, os linfócitos B produzidos na bursa migram para os órgãos linfóides secundários como o baço, tonsilas cecais e glândula de Harder, que posteriormente irão produzir as células de defesa do organismo. Este órgão é constituído por 85 a 90% de linfócitos B e menos de 4% de linfócitos T e outras células não-linfóides. As alterações encontradas na bursa se devem ao fato dela ser o órgão alvo principal do vírus que destrói rapidamente os linfócitos B e uma replicação viral intensa é acompanhada por infiltração de linfócitos T, observando-se títulos virais 3 a 5 dias após a infecção. Esta replicação está associada à necrose, apoptose de células linfóides, inflamação, hemorragias e atrofia da bursa. Nesta fase onde o sistema imune da galinha não está maduro ocorrerá uma imunossupressão severa e prolongada que acarretará infecções secundárias (Lukert & Saif, 2003; Santos *et al.*, 2004).

A forma aguda ocorre normalmente em aves entre 3 a 6 semanas de idade e neste caso a imunossupressão é temporária com manifestação da forma clínica. Os sinais clínicos que aparecem dentre 2 a 3 dias após a infecção são: eriçamento das penas, diarreia aquosa ou com fezes esbranquiçadas, depressão, tremores, anorexia, desidratação e morte (Cosgrove, 1962; Winterfield & Hitchner, 1962; Lukert & Saif, 2003).

Na necropsia as principais alterações na bursa são conteúdo gelatinoso na porção externa do órgão com presença ou não de diferentes níveis de hemorragias. Observam-se também rins edemaciados, desidratação e hemorragia equimótica nos músculos e na mucosa do proventriculo (van den Berg, 2000). A severidade da doença e suas conseqüências variam de acordo com a dose infectante, status imunológico e presença de fatores intercorrentes, que podem ocasionar quadros de mortalidade entre 5 a 30%. Nas infecções com o vvIBDV os sinais clínicos são similares aos produzidos pelos vírus

convencionais ou clássicos mas mais severos e exacerbados além de alta mortalidade (van den Berg, 2000; Lukert & Saif, 2003).

As perdas econômicas são resultantes das altas taxas de mortalidade na forma aguda da doença ou das conseqüências da imunossupressão que reduz o desempenho produtivo do plantel através do aumento de infecções secundárias, baixa taxa de conversão alimentar e redução das respostas contra vacinas (Müller *et al.*, 1992; Montassier, H.J., 2001; Lukert & Saif, 2003).

1.5. DIAGNÓSTICO

O diagnóstico clínico da IBD pode ser feito presuntivamente a partir dos sinais clínicos, facilmente reconhecíveis, juntamente com o histórico do lote e aliado à histopatologia da bursa obtém-se o diagnóstico diferencial já que outras patologias apresentam sintomas comuns à IBD (Rodrigues & Pereira, 2001; Lukert & Saif, 2003).

Entretanto, as ferramentas para confirmação final do diagnóstico são a detecção direta do vírus, através do isolamento e posterior identificação, e a indireta pela sorologia, através da detecção da produção de anticorpos.

O isolamento do vírus é feito principalmente através do tecido da bursa em uma variedade de sistemas: ovos embrionados, culturas primárias ou linhagens celulares (McNulty *et al.*, 1979; Jackwood *et al.*, 1987) e posterior identificação por testes de VN, ou através da identificação de antígenos virais por imunofluorescência, ou mesmo dos vírus por microscopia eletrônica (Jackwood & Saif, 1987; Lukert & Saif, 2003). O teste de VN apesar de ser o método que diferencia os sorotipos e subtipos, costuma ser laborioso e

demorado e os vírus vv não são prontamente cultiváveis (Jackwood & Saif, 1987). O teste de ELISA utilizando anticorpos policlonais pode ser uma alternativa apesar de apresentar menor sensibilidade e não diferenciar nem os sorotipos e subtipos de IBDV (McFerran *et al.*, 1980; Hassan *et al.*, 1996). Já os ensaios de ELISA de captura de antígeno utilizando dois ou mais anticorpos monoclonais ou recombinantes de fragmentos da cadeia única variável de anticorpo (scFv) conseguem a distinção entre os IB DVs (Snyder *et al.*, 1988; Eterradossi *et al.*, 1997; Sapats *et al.*, 2005).

Atualmente, os métodos moleculares como a reação em cadeia de polimerase após a transcrição reversa (RT-PCR), são os mais utilizados para a identificação dos vírus por serem métodos mais rápidos e sensíveis. A RT-PCR inicialmente foi feita com a amplificação total dos dois segmentos inteiros e atualmente pelos fragmentos dos genes, principalmente o que codifica a região hipervariável da proteína VP2 (Lee *et al.* 1992; Wu *et al.*, 1992; Tham *et al.*, 1995; Akin *et al.*, 1995; Jackwood *et al.*, 1996). A digestão por enzimas de restrição (RE) dos produtos da RT-PCR pela análise da presença dos sítios de clivagem (RT-PCR/RE) ou dos polimorfismos de comprimento dos fragmentos de restrição (RT-PCR/RFLP) é utilizada para a classificação dos IB DVs e obtenção dos grupos moleculares de IB DV (Jackwood & Jackwood, 1994; Liu *et al.*, 1994; Jackwood & Sommer, 1997; Jackwood *et al.*, 1997; Ikuta *et al.*, 2001; Zierenberg *et al.*, 2001; Banda & Villegas, 2004; Juneja *et al.*, 2008). Recentemente a sequência de nucleotídeos tem sido considerada mais específica e segura para a diferenciação dos IB DV (Banda & Villegas, 2004; Dolz *et al.*, 2005; Jackwood & Sommer, 2007; Ojkic *et al.*, 2007; Dormitorio *et al.*, 2007). A RT-PCR direcionada para outros genes de IB DV também é utilizada, tanto para diagnóstico como para classificação dos IB DVs (Gomes *et al.*, 2005, Ashraf *et al.*, 2007).

Na sorologia podem ser utilizados os métodos convencionais como o teste de imunodifusão em gel de ágar (AGD) (Saukas, 1978; Hirai *et al.*, 1972; Lukert & Saif, 2003) que é considerado um método apenas qualitativo; o teste de soroneutralização (SN), inicialmente utilizando ovos embrionados de galinhas ou culturas primárias e mais recentemente linhagens celulares (Giambrone, 1980, Lukert & Saif, 2003); ou o teste de ELISA que é o método atual para pesquisa sorológica e também para programas de imunização e eficiência das vacinas (Marquardt *et al.*, 1980; Snyder *et al.*, 1984; Lukert & Saif, 2003).

1.6. PREVENÇÃO E CONTROLE

Devido a alta resistência de IBVD no ambiente é necessário a implantação de medidas rigorosas de biosegurança, definidas por um conjunto de medidas aplicado em todos os segmentos da criação das aves que tem como finalidade diminuir a população do agente infeccioso no ambiente reduzindo o risco de infecções e aumentar o controle sanitário dos plantéis para a preservação da saúde dos lotes. Um bom programa de limpeza e desinfecção deve eliminar o vírus das camas assim como o uso do vazio sanitário, isto é, a manutenção de intervalos adequados entre as diferentes criadas é importante para reduzir a pressão de infecção pelo vírus de campo. Outras medidas preventivas que devem ser adotadas são: controle de tráfego de animais, pessoas e veículo; cuidados com matérias-primas e ração; desinfecção de água e monitorias sorológicas dos lotes (Jaenisch, 1999).

Entretanto, a vacinação ainda é um dos principais métodos de controle da IBVD e muitos casos desta doença ainda ocorrem devido a problemas no processo vacinal. A

primeira vacinação já foi feita em 1965 com a cepa Edgar (Saukas, 1978). Nos EUA, a primeira vacina licenciada foi preparada de cepas suaves adaptadas por passagens em embriões, e posteriormente outras vacinas adaptadas em culturas celulares (Hitchner, 2004). Atualmente, existem numerosas vacinas e programas de vacinações disponíveis e a escolha depende muita mais de fatores como a problemática de campo, uniformidade de anticorpos do que do tipo e marca da vacina.

A vacinação em galinhas pretende atuar em duas vertentes. A primeira consiste na proteção de galinhas jovens via imunidade passiva através da vacinação de matrizes com vacinas inativadas que tem como objetivo a produção de níveis altos e uniformes dos anticorpos maternos (AM) a serem transferidos às progênes. A segunda é a vacinação destas galinhas jovens com o uso de vacinas vivas, ou seja, com vírus atenuados através de passagens em ovos embrionados ou culturas celulares (van den Berg & Meulemans, 1991; Bolis *et al.*, 2003; Müller *et al.*, 2003). Apesar de comprovado que a imunidade passiva também age nos vírus vacinais interferindo no sucesso da vacinação, a vacinação a partir do 1º dia de idade considera a não uniformidade dos AM nos lotes das granjas. Ou seja, nem todos os pintinhos terão uma imunidade maternal adequada que previna infecções precoces e/ou altas doses de vírus vacinais ou que cepas mais agressivas sobreporiam os AM presentes nas progênes. Normalmente também se utilizam várias doses de vacinas para estímulo das aves conforme o decréscimo dos níveis de AM que será melhor identificado através do monitoramento sorológico e determinação do tempo ideal de vacinação (van den Berg, 2000; Müller *et al.*, 2003).

O quadro de vacinação foi alterado com o surgimento dos vvIBDV que “quebram” os níveis mesmo altos de AM e o uso de vacinas menos atenuadas, ou chamadas cepas

fortes ou “hot” foi introduzido inclusive no Brasil com o aparecimento dos vvIBDVs a partir de 1999 (Di Fabio *et al.*, 1999, Ikuta *et al.*, 2001). Estas vacinas reduziram os altos índices de mortalidade da época e mantêm a doença sob controle. Entretanto sabe-se que elas podem causar lesões na bursa, imunossupressão e mesmo o risco de reversão da virulência (van den Berg, 2000; Müller *et al.*, 2003). Já foi constatado aqui no Brasil casos de IBD após a vacinação com estas cepas menos atenuadas (Santos *et al.*, 2004) e recentes relatos de vírus rearranjados provavelmente surgidos de troca genética entre vírus de campo e vacinas coloca em foco o uso destas cepas (Sun *et al.*, 2003; Wei *et al.*, 2006).

Na prática, o tipo de vacina que se deve utilizar, quer seja a cepa forte ou intermediária, dependerá de diversos fatores e não da vacina propriamente dita. Os vírus utilizados nas vacinas, independente da empresa, são eficientes frente aos desafios de campo e a escolha de uma ou outra vacina dependerá: dos níveis e uniformidade dos AM na progênie; da presença de amostras de campo altamente virulentas; da época do início do desafio; de outros processos infecciosos intercorrentes na região; e do posicionamento técnico e filosofia individual de cada granja ou médico veterinário. Outro ponto importante após o estabelecimento da cepa a ser utilizada é a manutenção de programas de vacinações contínuos, buscando com isso a substituição dos vírus selvagens (campo) por vírus vacinais e assim o controle da doença.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVOS GERAIS

- Identificação e classificação molecular do vírus da doença infecciosa da bursa (IBDV) em amostras de bursas de Fabrício de granjas de corte e postura coletadas em municípios produtores dos Estados brasileiros.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Artigo 1

- Identificar vírus de IBDV isolados no Brasil durante o período de 1997 a 2005.
- Realizar a caracterização molecular da região hipervariável do gene VP2 de IBDV para classificação das amostras através da RT-PCR/RE e do sequenciamento.
- Analisar filogeneticamente as sequências de IBDV através do gene VP2.

Artigo 2

- Realizar a caracterização parcial do gene VP1 das amostras de IBDV.
- Analisar filogeneticamente as sequências de IBDV através do gene VP1.

3. ARTIGOS

Artigo I

MOLECULAR CHARACTERIZATION OF BRAZILIAN INFECTIOUS BURSAL DISEASE VIRUS ISOLATED FROM 1997 TO 2005

Maria Judite B. Fernandes, Isabela C. Simoni; Maria Gabriela Vogel, Ricardo Harakava, Eliana B. Rivas, Maria Beatriz C. Oliveira, Ana M. I. Kanashiro, Eliana N. C. Tessari, Nilce M. S. Q. Gama, Clarice W. Arns

Artigo publicado pela Avian Diseases, setembro 2009

Research Note—

Molecular Characterization of Brazilian Infectious Bursal Disease Virus Isolated from 1997 to 2005

Maria Judite B. Fernandes,^A Isabela C. Simoni,^A Maria Gabriela Vogel,^A Ricardo Harakava,^A Eliana B. Rivas,^A Maria Beatriz C. Oliveira,^B Ana M. I. Kanashiro,^A Eliana N. C. Tessari,^A Nilce M. S. Q. Gama,^A and Clarice W. Arns^{CD}

^AInstituto Biológico, Caixa Postal 12898, São Paulo, SP, Brazil

^BLohmann Animal Health, Rua João Moura, 616 CEP 05412-001, SP, Brazil

^CState University of Campinas/UNICAMP, Caixa Postal 6109, Campinas, SP, Brazil

Received 2 December 2008; Accepted and published ahead of print 12 March 2009

SUMMARY. This retrospective study concerned 41 infectious bursal disease virus (IBDV) isolates obtained from Brazilian broiler and layers flocks by reverse transcription-polymerase chain reaction. Twenty-five of them were identified as very virulent (vv) by restriction enzyme analysis and by further nucleotide and phylogenetic analysis. All of them had the typical amino acid residues, and all clustered in a phylogenetic tree with the vvIBDV strains. Four amino acid substitutions, at positions D213N, G254D, S317R, and D323E, were common to 3 vv isolates, Br/03/DB, Br/03/CK, and Br/04/CR, and differed from other vv isolates and strains. These isolates came from the same locale, but were collected in different years, indicating that the vvIBDVs circulating on Brazilian farms are undergoing slight but continuous exchanges.

RESUMEN. *Nota de Investigación*—Caracterización molecular de aislamientos brasileños del virus de la bursitis infecciosa obtenidos entre los años 1997 y 2005.

Este estudio retrospectivo incluyó 41 aislamientos del virus de la bursitis infecciosa de las aves, que fueron detectados en granjas de pollo de engorde y gallinas ponedoras brasileñas mediante la transcripción reversa y reacción en cadena de la polimerasa (con las siglas en inglés RT-PCR). Veinticinco virus fueron identificados como muy virulentos mediante el análisis con enzimas de restricción y con posterior análisis de secuencias de nucleótidos y análisis filogenético. Todos estos virus mostraron los residuos de aminoácidos característicos y se agruparon con las cepas muy virulentas dentro del árbol filogenético. Se observaron cuatro sustituciones de aminoácidos en las posiciones D213N (ácido aspártico sustituido por asparagina), G254D (glicina sustituida por ácido aspártico), S317R (serina sustituida por arginina) y D323E (ácido aspártico sustituido por ácido glutámico), que fueron comunes en tres aislamientos muy virulentos designados como Br/03/DB, Br/03/CK y Br/04/CR, los cuales fueron distintos a otros aislamientos de Gumboro muy virulentos y a otras cepas de este virus. Estos aislamientos se obtuvieron en la misma localidad pero fueron colectados en diferentes años, lo que indica que los virus muy virulentos que se encuentran circulando en las granjas brasileñas están sufriendo cambios leves pero continuos.

Key words: infectious bursal disease virus, sequence analysis, VP2 hypervariable region, very virulent, Brazilian isolates

Abbreviations: aa = amino acid; bp = base pair; cv = classic virulent; dsRNA = double-stranded RNA; IBD = infectious bursal disease; IBDV = infectious bursal disease virus; NJ = neighbor-joining; nt = nucleotide; REA = restriction enzyme analysis; RFLP = restriction fragment length polymorphism analysis; RT = reverse transcription; RT-PCR = reverse transcription-polymerase chain reaction; VN = virus neutralization; vv = very virulent

Infectious bursal disease (IBD) is an acute and highly contagious viral infection of young chickens which results in immunosuppression and mortality in birds of 3 to 6 wk of age (11). The infectious bursal disease virus (IBDV) is a member of the *Birnaviridae* family which contains a bisegmented, double-stranded RNA (dsRNA) genome within a nonenveloped icosahedral capsid of 60 nm. IBDV encodes five proteins. The RNA-dependent RNA polymerase (VP1) is encoded by a smaller genome segment (segment B). The large segment (segment A) encodes the others: a nonstructural protein (VP5) and a structural protein precursor from which the capsid proteins VP2 and VP3, as well as the viral protease VP4, are derived (14,16).

Two distinct serotypes, designated serotypes 1 and 2, are recognized by virus neutralization (VN) test, but only serotype 1 is pathogenic in chickens. Studies by cross-VN test and molecular biology are used to classify this serotype 1 into the antigenic subtypes

and molecular groups (8,14,16). The subtype responsible for outbreaks of IBD in vaccinated flocks in the United States in 1987 was typed as variant IBDV, and the others were denominated as classic IBDV (8). These variants were, at first, only identified in the United States and later in Canada, New Zealand, and Australia (14). In contrast, in the same period, European isolates emerged with an alteration in their virulence, but without change in their antigenicity (4,15). The term “very virulent” (vv) was introduced to refer to these isolates, which caused higher mortality rates and spread to other continents such as Asia (10), Africa (19), and Latin America (1).

VP2, a major structural protein, contains the antigenic regions responsible for neutralizing antibodies and for serotype specificity. The responsible genomic region is localized in the variable region of the VP2 gene that is encoded by the *AacI-Sp4I* restriction fragment (2,14,16). Comparison of the nucleotide sequences of the VP2 gene of several IBDVs has been done in order to correlate the antigenic variations with the strains (3,6,15,16,19).

Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) of the VP2 gene fragments was initially used as a tool of rapid diagnosis

^DCorresponding author. E-mail: arns@unicamp.br

Table 1. Data of forty-one IBDV isolates with respective molecular patterns and strains^A

Isolate	Place (state)	Isolation year	Age (days)	Vaccine status	Flock	Restriction enzymes ^{BC}				Molecular pattern ^D	Strain ^E
						SacI	BspMI	SplI	SplI		
Br97/BA	São Paulo	1997	45	NK	L	+	—	—	++	1	or
Br99/BH	São Paulo	1999	30	+	B	—	+	+	++	5	vv
Br99/BN	São Paulo		37	+	B	—	+	+	++	5	vv
Br99/BO	São Paulo		42	+	B	—	+	+	++	5	vv
Br00/BS	São Paulo	2000	38	NK	B	—	+	+	++	5	vv
Br01/BGK	São Paulo	2001	—	NK	L	—	+	+	++	5	vv
Br01/BGS	São Paulo		27	NK	L	—	+	+	++	5	vv
Br01/BIM	São Paulo		60	+	L	—	+	+	++	5	vv
Br01/BNK	São Paulo		—	+	L	—	+	+	++	5	vv
Br01/BVO	São Paulo		42	+	L	—	+	ND	ND	ND	vv
Br01/CA	São Paulo		35	+	L	—	+	+	++	5	vv
Br01/CB	São Paulo		42	NK	L	—	+	+	++	5	vv
Br01/CC	São Paulo		42	+	L	—	+	+	++	5	vv
Br01/CD	São Paulo		27	+	B	—	+	ND	ND	ND	vv
Br01/CE	São Paulo		25	NK	B	—	+	+	++	5	vv
Br02/CI	Fabricas	2002	—	+	B	+	—	—	++	2	or
Br03/CK	São Paulo	2003	39	+	L	—	+	+	—	6	vv
Br03/DB	São Paulo		36	+	L	—	+	+	—	6	vv
Br03/DC	São Paulo		120	+	L	—	+	+	++	5	vv
Br03/DD	Pernambuco		26	+	B	+	—	ND	ND	ND	or
Br03/DQ	Pernambuco		27	NK	B	—	+	+	++	5	vv
Br03/DR	Pernambuco		29	NK	B	—	+	+	++	5	vv
Br03/DS	Pernambuco		23	NK	B	—	+	+	++	5	vv
Br03/DT	Pernambuco		34	NK	B	—	+	+	++	5	vv
Br03/DO	Pernambuco		31	NK	B	—	+	+	++	5	vv
Br03/DX	Pernambuco		34	NK	B	—	+	+	++	5	vv
Br04/CJ	São Paulo	2004	37	+	B	+	—	—	++	2	or
Br04/CL	São Paulo		13	+	B	+	—	ND	ND	ND	or
Br04/CM	São Paulo		28	+	B	+	—	—	++	2	or
Br04/CN	São Paulo		28	+	B	+	—	—	++	2	or
Br04/CO	São Paulo		34	+	B	+	—	ND	ND	ND	or
Br04/CQ	São Paulo		34	+	B	+	—	ND	ND	ND	or
Br04/CR	São Paulo		35	+	L	—	+	+	—	6	vv
Br04/DE	Pernambuco		24	+	B	+	—	—	++	2	or
Br04/DF	Pernambuco		24	+	B	+	—	—	++	2	or
Br04/DG	Pernambuco		24	+	B	+	—	—	++	2	or
Br04/DI	Pernambuco		25	+	B	+	+	ND	ND	ND	vv
Br04/DJ	Pernambuco		24	+	B	+	—	—	++	2	or
Br04/DN	Pernambuco		24	+	B	+	—	—	++	2	or
Br04/DO	Pernambuco		24	+	B	+	—	—	++	2	or
Br04/DP	Pernambuco		24	+	B	+	—	ND	ND	ND	or

^AL = layer; B = broiler; NK = not known; ND = not done.^{B,C}+/- indicate presence/absence of the respective RE site.^CNucleotide position of RE site: SacI = 868; BspMI = 795; SplI = 1110; SplI* = 1142; SplI* = 887; SplI* = 887 and 1142.^DP1 = cv and SplI*; P2 = cv and SplI*; P3 = cv and SplI*; P4 = SacI and BspMI-, SplI+, and SplI*; P5 = vv and SplI*; P6 = vv and without any SplI site.^Ecv = classic strain; SacI+, BspMI, and SplI-; vv = very virulent strain; SacI-, BspMI, and SplI+.

and was later coupled with restriction enzyme analysis (REA), or restriction fragments length polymorphism (RFLP), to differentiate the strains classified as vv, classic, and variant (7,9,16,20). Recently, the nucleotide sequencing of this hypervariable region has been the preferred method for distinguishing these strains (12,14,17).

The first report of Brazilian vvIBDV was in 1997, in broiler flocks and then in layer flocks (5). After the use of one-age vaccines began, no severe outbreaks or high mortality have occurred in flocks. Brazil is the worldwide leader in chicken meat exports and the third major producer, positions sustained by high product quality and health standards. Recent retrospective works have shown the importance of the genetic characterization of IBDV (12,17). This molecular identification of IBDV would be instrumental in maintaining an efficient vaccination program and effective disease control. The aim

of the present paper was a molecular study of Brazilian IBDV from broiler and layer flocks during the period from 1997 to 2005.

MATERIALS AND METHODS

Field Isolates. Sixty-six tissues of Fabricas were collected from commercial layer ($n = 23$) and broiler ($n = 43$) chickens from some of Brazil's main producing regions during the period 1997–2005; all chickens exhibited the clinical and pathologic features of IBDV. The data for positive samples are in Table 1.

Extraction of viral RNA. Pooled tissues (3 to 5) were ground and homogenized with 2–5 ml of TE buffer (10 mM Tris pH 7.5, 1 mM EDTA). The homogenates were frozen and thawed three times and clarified with chloroform and centrifugation at $5000 \times g$ for 10 min.

The upper aqueous phase was collected and stored at -20°C . Viral RNAs were extracted from burial homogenates, and from vaccines, with the QIAamp Viral RNA Kit (Qiagen Inc., Valencia, CA) according to the manufacturer's instructions.

Reverse transcription and polymerase chain reaction (RT-PCR). The set of primers used in this study is described in Zierenberg *et al.* (20) and amplified a 723-base pair (bp) fragment from the variable region of the IBRDV VP2 gene. The AccuscriptTM RT-PCR System (Stratagene, Madison, WI) was used for one-tube reaction RT-PCR. The amplification was performed using the Perkin-Elmer Cx (Norwalk, CT) thermal cycler. The ddRNA was denatured by boiling for 5 min at 98°C and was immediately immersed in ice. The RT incubation was at 48°C for 45 min. The PCR was initiated for 2 min at 95°C , followed by 35 cycles of 95°C for 10 sec, 58°C for 30 sec, and 72°C for 40 sec. A final extension was performed at 72°C for 5 min. The PCR products were subjected to electrophoresis on a 1.5% agarose gel supplemented with 1% ethidium bromide.

Digestion with restriction enzymes. The DNA of positive IBRDV samples was purified using a PCR Purification Kit (Promega) and digested with 50 restriction enzymes, *Bsp*MI, *Sac*I, *Spl*I, and *Spy*I, according to the manufacturer's instructions. The digested fragments were separated and visualized on a 1.5% agarose gel supplemented with 1% ethidium bromide.

Nucleotide (nt) sequence analysis. The purified PCR products were sequenced using the Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction (Applied Biosystems, Foster City, CA) in the ABI 377 automatic DNA sequencer (Applied Biosystems). Sequences were subjected to a Basic Local Alignment Search Tool analysis search to determine their identity with other reported sequences and to confirm the classic virulent (*cv*) and *vv* characters. They were aligned, by eye, with Sequence Alignment Editor (Se-*Al*) version 1.0, and the phylogenetic analysis was performed by the distance-based neighbor-joining (NJ) method with the Kimura two-parameter option using PAUP* 4b10 for Macintosh (Sinauer, Sunderland, MA) with 1000 bootstrap replicates. The isolate sequences were deposited in GenBank with the following accession numbers: Be/97/BA: EU835864; Be/99/BE: EU835865; Be/99/BN: EU835867; Be/99/BC: EU835866; Be/01/BCB: EU835876; Be/01/BCS: EU835877; Be/01/BJD: EU835882; Be/01/BNK: EU835878; Be/01/CA: EU835872; Be/01/CR: EU835880; Be/01/CC: EU835879; Be/01/CE: EU835868; Be/02/CE: EU835869; Be/03/CK: EU835881; Be/03/DB: EU835861; Be/03/DC: EU835869; Be/03/DQ: EU835871; Be/03/DD: EU835868; Be/03/DS: EU835875; Be/03/DT: EU835873; Be/03/DU: EU835874; Be/03/DZ: EU835870; Be/04/CAB: EU835884; Be/04/CR: EU835882; Be/04/DE: EU835863; Be/04/DG: EU835886; Be/04/DI: EU835885; and Be/04/DN: EU835883. The strains included for comparison, with respective accession numbers, were: commercial vaccines D78 (V14962), Burdett-plum (AF281231), BLEN (AY332560), CEVAC IBDL (AY332562), Modcrop G603 (AF457106), and 228E (A1586966); classical strains F52-70 (Y14958) and CA-104 (AF159219), vaccine A (Y14959); very virulent strains DV86 (A878899), UK-661 (X82760), 94432 (Y14955), OKYM (D49700), NIE001042 (A1586959), VEN-6 (AY525115), 99009 (A3878902), and BR-7 (AY525111); and avirulent 2: 2382 (AF362773).

RESULTS

Digestion with restriction enzymes of purified PCR products.

A 723-bp fragment from the IBRDV VP2 gene variable region was amplified by RT-PCR in 41 out of the 66 samples. Data for the positive IBRDV isolates, and their classification after digestion with the four restriction enzymes, are summarized in Table 1. Twenty-five isolates were digested with *Bsp*MI and *Spl*I restriction enzymes, but not with *Sac*I. These restriction patterns characterized them as *vv* strains. Another 16 isolates were digested with *Sac*I, and not with the other 2 enzymes, and were classified as *cv* strains. All the isolates were also digested with *Spy*I restriction enzyme. Two cleavage sites were found in the fragments, amplified at nt positions 887 and 1142. The site at nt 1142 was observed in only one *cv* isolate (Be/97/BA);

this electrophoretic profile was designated *Spy*I⁺. The remaining isolates (*cv* and *vv*) presented the other site at nt 887; this profile was designated as *Spy*I⁻. These *vv* isolates (Be/03/DB, Be/03/CK, and Be/04/CR) were not cut by this enzyme.

Six vaccines, classified as attenuated (1), intermediate (2), intermediate-plus (2), and "hot" (1) were also amplified and digested with these enzymes. All had the *Sac*I site, but not the *Bsp*MI site. Of the six vaccines, only the two classified as intermediate presented the site for *Spy*I. They showed diverse profiles after digestion with *Spy*I. The one attenuated and the two intermediate vaccines were *Spy*I⁺, and the one "hot" vaccine was *Spy*I⁻, while the two intermediate-plus vaccines showed both sites (at 887 and 1142) and were designated *Spy*I⁺ (data not shown).

These *Spy*I results, together with those of other restriction enzymes, were used to classify the isolates and vaccines in six molecular patterns (Table 1). The P1 pattern (one *cv* isolate and the attenuated vaccine) and the P2 (the remaining *cv* isolates and the "hot" vaccine) comprised viruses which, beside having the characteristic profile of *cv* strains (*Sac*I⁺, *Bsp*MI⁻, *Spy*I⁻), presented *Spy*I⁺ and *Spy*I⁻ profiles, respectively. The P3 and P4 patterns contained only vaccines, both with the *Spy*I profile; the P5 pattern (two intermediate-plus vaccines), moreover, presenting the *cv* profile while P4 (two intermediate vaccines) lacked this profile due to the presence of the *Spl*I site. With the exception of the 3 *vv* isolates without any *Spy*I site, which were classified as pattern 6, all the *vv* isolates were grouped in pattern 5 for presenting the characteristic of *vv* strains (*Sac*I⁻, *Bsp*MI⁺, *Spy*I⁺) along with the *Spy*I⁺ profile.

Sequence analysis. The 28 nt sequences of IBRDV isolates we obtained were aligned and compared, among themselves and with those of the vaccines and the published IBRDV. The sequencing confirmed the *cv* and *vv* characters of the isolates studied. Due to the high identity between some, only 18 deduced amino acid (aa) sequences are shown in Fig. 1 to represent all of these isolates. The sequences of vaccine G603 and *vv*IBDV UK661 were also included. All *vv* isolates had the *vv*IBRDV common as substitutions (222A, 242I, 256I, and 294I), and four of them (Be/99/BN, Be/99/BC, Be/99/BE, and Be/01/CE) also presented the other mutation at position 295S. The three *vv* isolates without the *Spy*I site exhibited four unique mutations. One of them was at this site, G254D, which is within the minor peak 1; another was within the VP2 major hydrophilic peak A at position D213N; while two were within the VP2 major hydrophilic peak B (S317R and D323E). Two of these isolates (Be/03/DB, Be/03/CK) also showed another exchange within the minor peak 1 at position S251D. The nt identity percentages among the *vv* isolates, and between them and the *vv* IBRDV strains BR-7 and UK661, ranged from 95% to 99.7%, except for Be/03/DR, Be/03/DT, and Be/03/DB, with 100% identity. In addition to deduced sequences, five (Be/03/DR, Be/03/DT, Be/03/DX, Be/03/DU, Be/03/DC) *vv* isolates and two *vv* isolates (Be/99/BC, Be/99/BN) showed 100% identity among them. The *cv* isolates had more nt similarity with the vaccines than with the classical IBRDV.

Phylogenetic analysis. The phylogenetic tree obtained through the NJ method of 28 isolates and published IBRDV strains is shown in Fig. 2. The bootstrap values indicated that *vv* isolates clustered with *vv*IBDV strains in 71% of the cases. Most of them clustered, in a large branch, together with Brazilian *vv* strain BR-7. Another four isolates, presenting the mutation at position 295, clustered in the branch with the main reference of *vv*IBDV. The *cv* isolates clustered in the branch of the vaccine G603 and CEVAC, supported by a bootstrap value of 74%. Only the *cv* isolate Be/97/BA clustered with the vaccine D78, in another branch, with a bootstrap value of 92%. These branches had the same correlation of the molecular patterns P1 and P2.

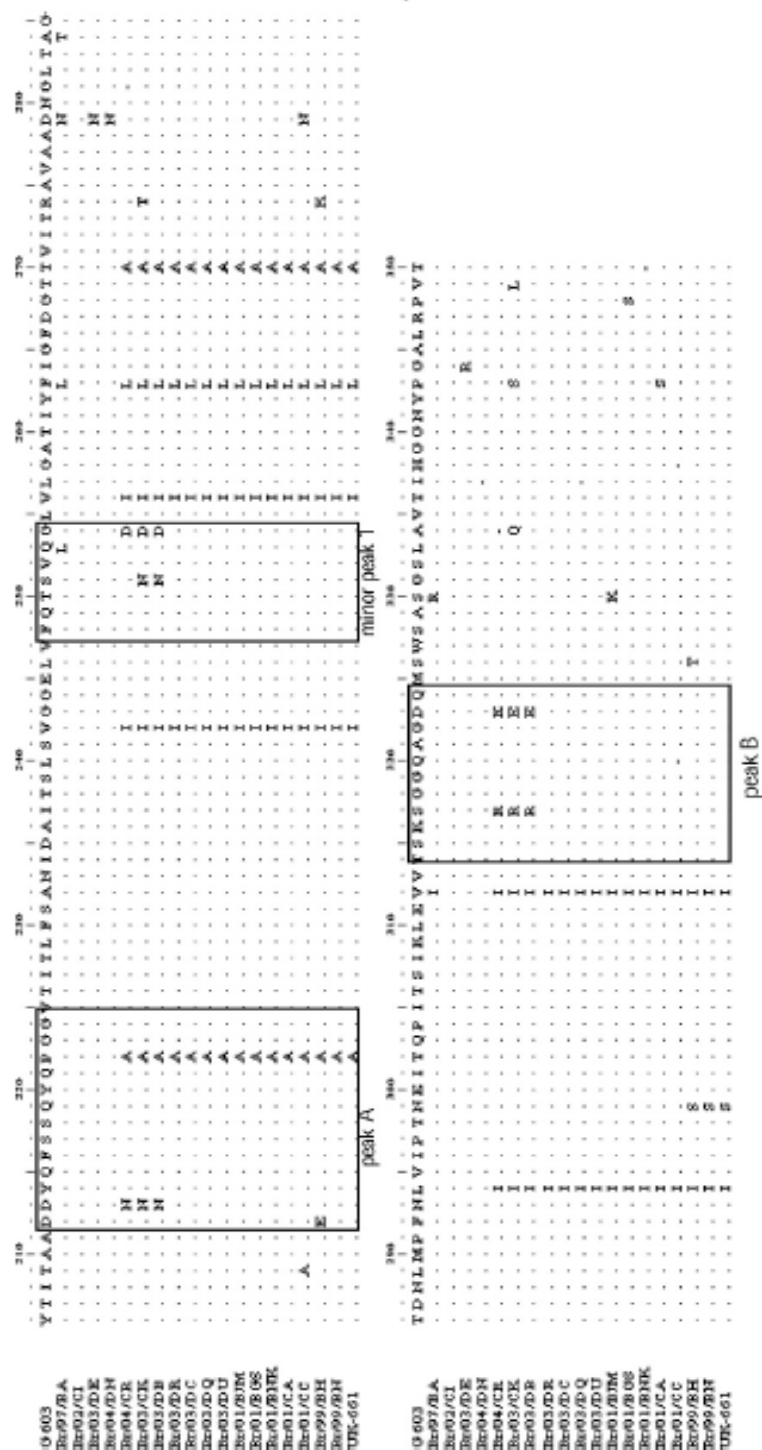


Fig. 1. Deduced amino acid sequences of the VP2 gene (a residues 206-350) of 18 Brazilian isolates, vaccine G603 and vBIDV strain UK 661, numbered according to Baylis *et al.* (2). Dots indicate positions where the sequence is identical to G603. The hydrophilic peaks are boxed.

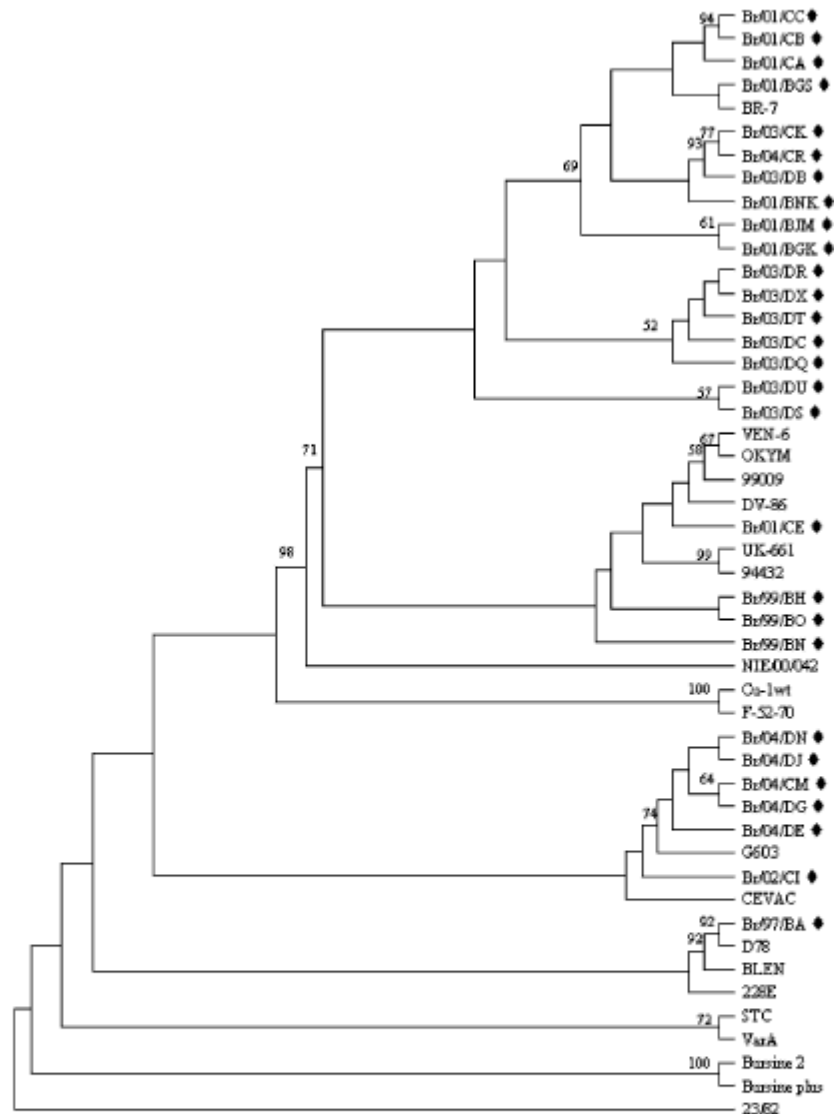


Fig. 2. The phylogenetic tree of 28 Brazilian IBDV isolates (rhombus symbol), reference strains (cv and vv), and vaccines. Accession numbers are shown in the Materials and Methods. The neighbor-joining analysis was based on predicted amino acid sequences of the *AatI-SpeI* restriction fragment (aa 206–350) of the VP2 gene using the PAUP program. Numbers at nodes indicate the bootstrap confidence values using 1000 replicates. Only bootstraps >50% are shown.

DISCUSSION

This retrospective study concerned IBDV circulating in Brazilian broiler and layer flocks from 1997 to 2005. Initially, the isolates were characterized in cv and vv strains by REA using two restriction enzyme

sites (*Bsp*MI and *Spl*I) found in virulent strains and another (*Sac*I) present only in cv strains (10,17). In this study, two intermediate vaccines presented the *Spl*I site. This site, despite being related to the vvIBDV character, may be missing in some vv strains, or may be unlikely to be found in other types of strains or even in vaccines (16).

Nevertheless, what assured the classification of isolates in cv and vv strains in this study were the combined results of the three enzymes.

The isolates were also grouped in six molecular patterns (P1–P6) with the additional use of *SspI* enzyme. Although this enzyme alone does not differentiate the vv and cv strains in RFLP analysis (16), this molecular grouping allowed for the placement of the cv and vv isolates into distinct groups. The cv isolates were classified in two patterns (P1 and P2) and the vv isolates in another two (P5 and P6). Vaccines were classified in four patterns (P1, P2, P3, and P4), the first two of which also included the cv isolates according to the isolate-collection period. One older isolate from 1997 was grouped in pattern 1, together with the attenuated vaccine used before the appearance of vvIBDV. This vaccine is still used on some farms, but is used together with other vaccines. The remaining cv isolates, collected after 2002, were classified in the P2 pattern, the same pattern presented by the “hot” vaccine introduced later on the Brazilian farms. The site at aa position 254, within the minor hydrophilic peak 1, is related with mutations that bring about important antigenic changes in some variant strains (7,12,13). This enzyme could be identifying point mutations in our vv isolates, as reported in Jackwood *et al.* (7).

The cv and vv characters of our IBDV isolates were corroborated by further sequencing and phylogeny, which shows the current validity and importance of this RT-PCR method, when combined with restriction enzyme analysis of the VP2 gene fragment, as a good and rapid tool for differentiating IBDV strains. In the phylogram, the cv isolates clustered in two branches, with different vaccines equal to the two molecular patterns P1 and P2 showing more similarity to the vaccines than to the classical strains; the vv isolates that presented additional aa substitution typical of vvIBDV (299S) clustered more with the European, Asian, and Latin American (Venezuela) vvIBDV strains, while the remaining isolates with the other four common aa substitutions of vvIBDV clustered with the Brazilian IBDV strain BR-7 (1). Because VP2 is responsible for controlling antigenicity, the aa changes could interfere in disease control. The mutations in three vv isolates occurred in two main hydrophilic regions of VP2, between aa 212 to 223 and 314 to 324, and in the minor peak 1. These regions are related with antigenic variations, mainly in variant strains (2,12,13,17). Yuwen *et al.* (18) recently demonstrated a diversity in Chinese vvIBDV that was related to changes in peak B, but did not ascertain the effect of these changes on antigenicity. In any case, the polarity of the aa was not altered by these exchanges, as was also seen in this study. Two of the three isolates with the exchanges came from the same farm, in which the mortality was around 4%, but were collected in different years. The other was from the same region, but from another farm with a different vaccination schedule.

This study showed the permanence of the vv strains throughout the decade, but recently without high mortality rates, thus showing the efficiency of the vaccination program with the intermediate-plus and hot vaccines. However, Brazilian vv strains are undergoing slight but continuous exchanges, as verified in 2004 when Banda and Villegas (1) found more genetic changes in Brazilian isolates than in those of other countries. The alterations in the aa sequences of these strains could, in the future, become significant, but should be detected through this continuous molecular monitoring, thus aiding in disease control.

REFERENCES

1. Banda, A., and P. Villegas. Genetic characterization of very virulent infectious bursal disease viruses from Latin America. *Avian Dis.* 48:540–549. 2004.
2. Baylis, C. D., U. Spies, K. Shaw, R. W. Peters, A. Papageorgiou, H. Müller, and M. E. G. Bourne. A comparison of the sequences of segment

A of four infectious bursal disease virus strains and identification of a variable region in VP2. *J. Gen. Virol.* 71:1303–1312. 1990.

3. Brown, M. D., P. Green, and 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. *J. Gen. Virol.* 75:675–680. 1994.

4. Chenle, N., J. C. Smart, and P. J. Wyeth. Outbreak of virulent infectious bursal disease in East Anglia. *Vet. Rec.* 125:271–272. 1989.

5. Di Fabio, J., I. I. Rossini, N. Etteradossi, M. D. Toquin, and Y. Gardin. European-like pathogenic infectious bursal disease in Brazil. *Vet. Rec.* 14:203–204. 1999.

6. Etteradossi, N., C. Amauld, D. Toquin, and G. Rivallan. Critical amino acid changes in VP2 variable domain are associated with typical and atypical antigenicity in very virulent infectious bursal disease viruses. *Arch. Virol.* 143:1627–1636. 1998.

7. Jackwood, D. J., R. J. Jackwood, and S. E. Sommer. Identification and comparison of point mutations associated in classic and variant infectious bursal disease viruses. *Virus Res.* 49:131–137. 1997.

8. Jackwood, D. J., and Y. M. Saif. Antigenic diversity of infectious bursal disease viruses. *Avian Dis.* 31:766–770. 1987.

9. Juneja, S. S., Rammed, D. Dela, M. S. Oberoi, and A. Singh. Molecular characterization of field isolates and vaccine strains of infectious bursal disease virus. *Comp. Immun. Microbiol. Infect. Dis.* 31:11–23. 2007.

10. Lin, Z., A. Kato, Y. Onuki, T. Nakamura, E. Sasmaz, and S. Ueda. Sequence comparisons of a highly virulent infectious bursal disease virus prevalent in Japan. *Avian Dis.* 37:315–323. 1993.

11. Lufert, P. D., and Y. M. Saif. Infectious bursal disease. In: *Diseases of poultry*, 11th ed. Y. M. Saif, ed. Iowa State University Press, Ames, IA, pp. 161–179. 2003.

12. Manin, A. M., F. Fallacara, I. Barbieri, G. Tosi, G. Rivallan, N. Etteradossi, R. Ceruti, and P. Cordioli. Genetic and antigenic characterization of infectious bursal disease virus isolates in Italy during the period 2002–2005. *Avian Dis.* 51:863–872. 2007.

13. Vakharia, V. N., J. He, B. Ahmed, and D. B. Snyder. Molecular basis of antigenic variation in infectious bursal disease virus. *Virus Res.* 31:265–273. 1994.

14. Van den Berg, T. P. Acute infectious bursal disease in poultry: a review. *Avian Pathol.* 29:175–194. 2000.

15. Van den Berg, T. P., M. Gonze, and G. Meulemans. Acute infectious bursal disease in poultry: isolation and characterization of a highly virulent strain. *Avian Pathol.* 20:133–143. 1991.

16. Wu, C. C., P. Rubinelli, and T. L. Lin. Molecular detection and differentiation of infectious bursal disease virus. *Avian Dis.* 51:515–526. 2007.

17. Yamaguchi, T., C. Kasuga, K. Terashita, M. T. Maw, K. Ohya, and H. Fukushi. Nucleotide sequence analysis of VP2 hypervariable domain of infectious bursal disease virus detected in Japan from 1993 to 2004. *J. Vet. Med. Sci.* 69:733–738. 2007.

18. Yuwen, Y., Y. Gao, H. Gao, X. Qi, T. Li, W. Liu, and X. Wang. Sequence analysis of VP2 hypervariable region of eight very virulent infectious bursal disease virus isolates from the Northeast of China. *Avian Dis.* 52:284–290. 2008.

19. Zierenberg, K., H. Nieper, T. P. van den Berg, C. D. Eccoli, M. Voss, and H. Müller. 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. *Arch. Virol.* 145:113–125. 2000.

20. Zierenberg, K., R. Raue, and H. Müller. Rapid identification of “very virulent” strains of infectious bursal disease virus by reverse transcription-polymerase chain reaction combination with restriction enzyme analysis. *Avian Pathol.* 30:55–62. 2001.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by a grant from the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo/FAPESP (No. 02/10110-3) and a student fellowship from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq/PBIC) to M. G. Vogel.

Artigo II

ANALYSIS ON PARTIAL SEQUENCE OF THE VP1 GENE OF THE INFECTIOUS BURSAL DISEASE VIRUS ISOLATED FROM BRAZIL

**Maria Judite Bittencourt Fernandes, Isabela Cristina Simoni, Ricardo Harakava,
Eliana Borges Rivas, Ana Lúcia Cardoso, Maria Beatriz C. Oliveira, Clarice Weis**

Arns

Manuscrito em preparação

**Analysis on partial sequence of the VP1 gene of the infectious
bursal disease virus isolated from Brazil**

**Maria Judite Bittencourt Fernandes¹, Isabela Cristina Simoni¹, Ricardo Harakava¹,
Eliana Borges Rivas¹, Ana Lúcia Cardoso¹, Maria Beatriz C. Oliveira², Clarice Weis
Arns^{3*}**

¹ Instituto Biológico, São Paulo, Brazil

² Lohmann Animal Health, Brazil

³ State University of Campinas/UNICAMP, Brazil

*Tel: +55 19 3521-6267; fax: +55 19 3521-6276; E-mail: arns@unicamp.br

Abstract: In this study, seventeen Brazilian infectious bursal disease viruses (IBDV) samples were characterized by partial sequence of VP1 gene. By comparing the deduced amino acid (aa) VP1 sequences of these IBDV samples with those of published IBDV strains verified that thirteen samples presented the unique aa substitutions to very virulent (vv) IBDV strains: N145T, E146D, G147 and D242E, within the fragment studied. In the phylogenetic tree, these samples also branched together with the vvIBDVs and in a distinct cluster from the classical (cv) IBDV strains and vaccines. These samples already had been previously classified as vv based on hypervariable region VP2 gene (vvVP2). Other three samples were characterized as cvIBDV strains by sequence and phylogenetic analysis. However, one sample (Br/03/DR) vvVP2 presented the aa sequence VP1 more similar to the cv strains and clustered with them in the tree. Studies on the phylogeny of VP1 gene have suggested a possible segment B reassortment event and more recently hypothesized a partial correlation between the expansion of vvIBDVs and this reassortment. In this case, our sample carrying vvVP2 and cvVP1 could be a descendent of these IBDVs before the reassortment of vvVP1. Or alternatively, this sample is simply a natural reassorted virus originated between segments of the different strains or with the live attenuated vaccine.

Key words: Brazilian infectious bursal disease virus; VP1; very virulent strain; phylogenetic and sequence analysis; natural reassorted.

1. Introduction

Infectious bursal disease virus (IBDV) causes a disease among young chickens of great economic importance to the poultry industry worldwide both for the mortality as the immunosuppression (Lukert and Saif, 2003). IBDV belongs to the *Birnaviridae* family containing a bisegmented double-stranded RNA genome within a nonenveloped icosahedral capsid of 60 nm. The segment A encodes for a 110 kDa polyprotein which is autoprocessed into structural proteins, VP2 and VP3, and the viral protease, VP4. The 17 kD nonstructural protein, VP5 is also encoded by this segment. The segment B encodes for a 90 kD VP1 protein having RNA-dependent RNA polymerase (RdRp) activity. This protein can be found as a free polypeptide and as a genome-linked protein (Vpg) beyond forming complexes with the capsid protein VP3 (Van den Berg, 2000; Müller et al., 2003).

Two distinct serotypes of IBDV are recognized (1 and 2). Only the serotype 1 is pathogenic for chickens and classified according to the antigenicity and/or pathogenicity in classical virulent (cv) strains, very virulent (vv) strains, antigenic variant strains, and attenuated strains (Van den Berg et al., 2004; Wu et al., 2007). This classification has been based mainly on the VP2 gene sequence, more specifically on the hypervariable region (vVP2) corresponding to the induction of neutralizing antibodies and the serotype specificity (Brown et al., 1994; Eterradossi et al., 1998; Vakharia et al., 1994; Zierenberg et al., 2000). However, the fundamental molecular basis for pathogenicity is not yet clear and the VP2 was not the sole responsible gene (Nagarajan and Kibenge, 1997; Boot et al., 2000).

At first, studies generating chimeric or segment reassortant viruses by reverse genetic system did not correlate the VP1 protein to the virulence of vvIBDV (Boot et al., 2000, Brandt et al., 2001) but later there was demonstrated its role in part of this virulence (Liu and Vakharia, 2004; Boot et al., 2005). Furthermore, the phylogeny based on the VP1 sequence of vvIBDV strains indicated that the segment B is genetically distinct from that all of other IBDV strains (Brown and Skinner, 1996; Yamaguchi et al., 1997; Nagarajan and Kibenge, 1997; Islam et al., 2001).

Yamaguchi et al. (1997) and Le Noüen et al. (2005) defined partial sequences representative phylogenetically of the full genomic sequences from segment A and B that allowed their use in molecular epidemiology studies. Based in one of these regions from VP1 gene described in Le Noüen et al. (2005), we analyzed the sequences and phylogeny of the Brazilian IBDV samples previously characterized in cv and vv strains based on the vVP2 sequence (Fernandes et al., 2009).

2. Material and methods

2.1. Field Strains

Seventeen IBDV samples collected during the period 1997-2005 and characterized as very virulent (vv) and classic virulent (cv) strains by Fernandes et al. (2009).

2.2. Reverse transcription and polymerase chain reaction (RT/PCR)

The viral RNAs from homogenates of bursas of Fabricius prepared previously in Fernandes et al. (2009) were extracted with the QIAamp Viral RNA Kit (Qiagen Inc.,

Valencia, CA) according to the manufacturer's instructions. The primers are described in Le Noüen et al. (2006) and amplified a 594bp fragment of IBDV VP1 gene. The amplification was performed using the program described in Hernández et al. (2006) and adapted by us for one-tube procedure with the AccessQuick™ RT-PCR System (Promega, Madison, WI) in the Perkin-Elmer Co., Norwalk, Conn. thermal cycler. Briefly, 5µl of dsRNA viral was mixed with 4.5µl of ultra-pure water and denatured by boiling for 5 min at 98°C and immediately immersed in ice by 3-5 min. After, the following mixture was added to the tube: 12.5µl of AccessQuick Master Mix (2x) and 1µl of each primer and AMV reverse transcriptase (Promega). The cDNA was synthesized at 42°C for 60min and the amplification included an initial denaturation step (5 min at 95°C) and 35 cycles of 95°C for 30 sec, 55°C for 1 min and 72°C for 1 min. A final extension was performed at 72°C for 5 min. The PCR products were subjected to electrophoresis on a 1.5% agarose gel supplemented with 1% ethidium bromide.

2.3. Nucleotide sequence and phylogenetic analysis

The purified PCR products with PCR Purification Kit (Promega) were sequencing using Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction (Applied Biosystems) in the ABI 377 automatic DNA sequencer. The sequences were aligned by Clustal X and subjected to BLAST search to determine their identity with other reported sequences. The phylogenetic analysis using the aligned nt sequences by eye with sequence alignment editor (Se-Al) version 1.0 was performed by distance based neighbor-joining (NJ) method with the Kimura two-parameter option using PAUP 4.0 with 1000 bootstrap replicates. The strains included for comparison with respective accession numbers were: commercial

vaccines: D78 (AJ878654), CEVAC IBDL (AJ878660); Bursine 2 (AJ878655) and 228E (AJ878657); classical strains: F52-70 (AJ878643) and Cu-1wt (AJ878644); variants: variant A (AJ878675) and variant E (AF133904); very virulent strains: DV86 (AJ878667), D6948 (AF240687), 99009 (AJ878672), 94432 (AJ878678), UK-661 (AJ878666), Uy-2 (D823085), OKYM (D49707) and BD 3/99 (AF 362770); serotype 2: 23/82 (AJ878684); and reassortant strains: 02015.1 (AJ878685), 02015.2 (AJ878686), SH95 (AY134875) and ZJ2000 (DQ166818).

3. Results

Seventeen samples were positive for IBDV VP1 gene. Based previously on hypervariable region VP2 sequence in Fernandes et al. (2009), three of them are classic (cv) strains and fourteen are very virulent (vv). Their features are described in Table 1.

Table 1. Data of seventeen IBDV samples positive in RT-PCR to VP1 gene.

Sample	Place (State)	Isolation Year	Age (days)	Vaccine Status	Flock	strains *
Br/97/BA	São Paulo	1997	45	n.k.	L	cv
Br/00/BS	São Paulo	2000	38	n.k.	B	vv
Br/01/BGK	São Paulo	2001	-	n.k.	L	vv
Br/01/BGS	São Paulo		27	n.k.	L	vv
Br/01/BJM	São Paulo		60	+	L	vv
Br/01/BNK	São Paulo		-	+	L	vv
Br/01/CA	São Paulo		35	+	L	vv
Br/01/CB	São Paulo		42	n.k.	L	vv
Br/01/CC	São Paulo		42	+	L	vv
Br/03/CK	São Paulo	2003	39	+	L	vv
Br/03/DB	São Paulo		36	+	L	vv
Br/03/DQ	Paraná		27	n.k.	B	vv
Br/03/DR	Paraná		29	n.k.	B	vv
Br/03/DU	Paraná		31	n.k.	B	vv
Br/04/CR	São Paulo	2004	35	+	L	vv
Br/04/DE	Paraná		24	+	B	cv
Br/04/DN	Paraná		24	+	B	cv

B = broiler; L = layer; n.k. = not known; cv: classic virulent; vv: very virulent;
 *classification on VP2 sequence.

The VP1 nt sequences of 17 samples were aligned and compared with those of the vaccines and published IBDV. Their representative deduced amino acid (aa) sequences are shown in Figure 1. All the four common residues (T145N, E146D, G147N and D242E) for vvIBDV strains within the fragment studied (aa 68-248) were found in our vv samples except the Br/03/DR sample. In these positions, it presented the typical aa of the cv strains. The vv samples presented 99% of identity among them and 94-95% with the others vv strains and had 12-13% divergence with cv and vaccines. The phylogenetic tree obtained through the Neighbor-Joining (NJ) method of these samples and published IBDV strains is shown in Figure 2. The vv samples branched together with the other vvIBDVs but in a

distinct cluster from the cvIBDVs strains and even serotype 2. The sample Br/03/DR clustered together with cvIBDVs and the SH95 and 2015.2 reassortments.

		*	80	*	100	*	120	*	140	*	160	*	
UK661	:												: 106
Br/00/BS	:	P.....-		-									: 104
Br/01/BJM	:	-.....V.....											: 105
Br/01/BGK	:												: 106
Br/01/BNK	:	-PV.....											: 105
Br/04/CR	:	D.....											: 106
Br/03/CK	:												: 106
Br/03/DB	:												: 106
Br/03/DQ	:												: 106
Br/03/DR	:	G.....								DEG.....			: 105
Br/97/BA	:									NEG.....			: 106
Br/04/DE	:	-...-...P.....				S.....				NED.....			: 103
Br/04/DN	:					S.....				NED.....			: 106
F52	:			A.....						F.....		NEG...E.....	: 106
CEVAC	:											NED.....	: 106
228E	:	D.....		V.....								NEG.....	: 106
PENEEYETDQILPDLAWMRQIEGAVLKPTLSLPIGDQYFPRYYPTHRPSKEKPNAYPPDIALLKQMIYFLQVPEATDNLKDEVTLTQNIIRDKAYGSGTYMGQA													
		180	*	200	*	220	*	240					
UK661	:												: 181
Br/00/BS	:												: 179
Br/01/BJM	:												: 180
Br/01/BGK	:												: 181
Br/01/BNK	:												: 180
Br/04/CR	:												: 181
Br/03/CK	:												: 181
Br/03/DB	:												: 181
Br/03/DQ	:												: 181
Br/03/DR	:									D.....			: 180
Br/97/BA	:									D.....			: 181
Br/04/DE	:									D.....			: 178
Br/04/DN	:			-...-						D.....			: 179
F52	:									D.....			: 181
CEVAC	:									D.....			: 181
228E	:									D.....			: 181
TRLVAMKEVATGRNPKNKDPLKLGYTFESIAQLLDITLPVGPGEEDDKPWVPLTRVPSRMLVLTGDDVDGEFEVEDY													

Figure 1: Deduced amino acid sequences of VP1 gene (aa 68-248) of 14 Brazilian samples, vaccines (CEVAC and 228E), cv strain F52 and vv strain UK661. Dots indicate positions where the sequence is identical to UK661.

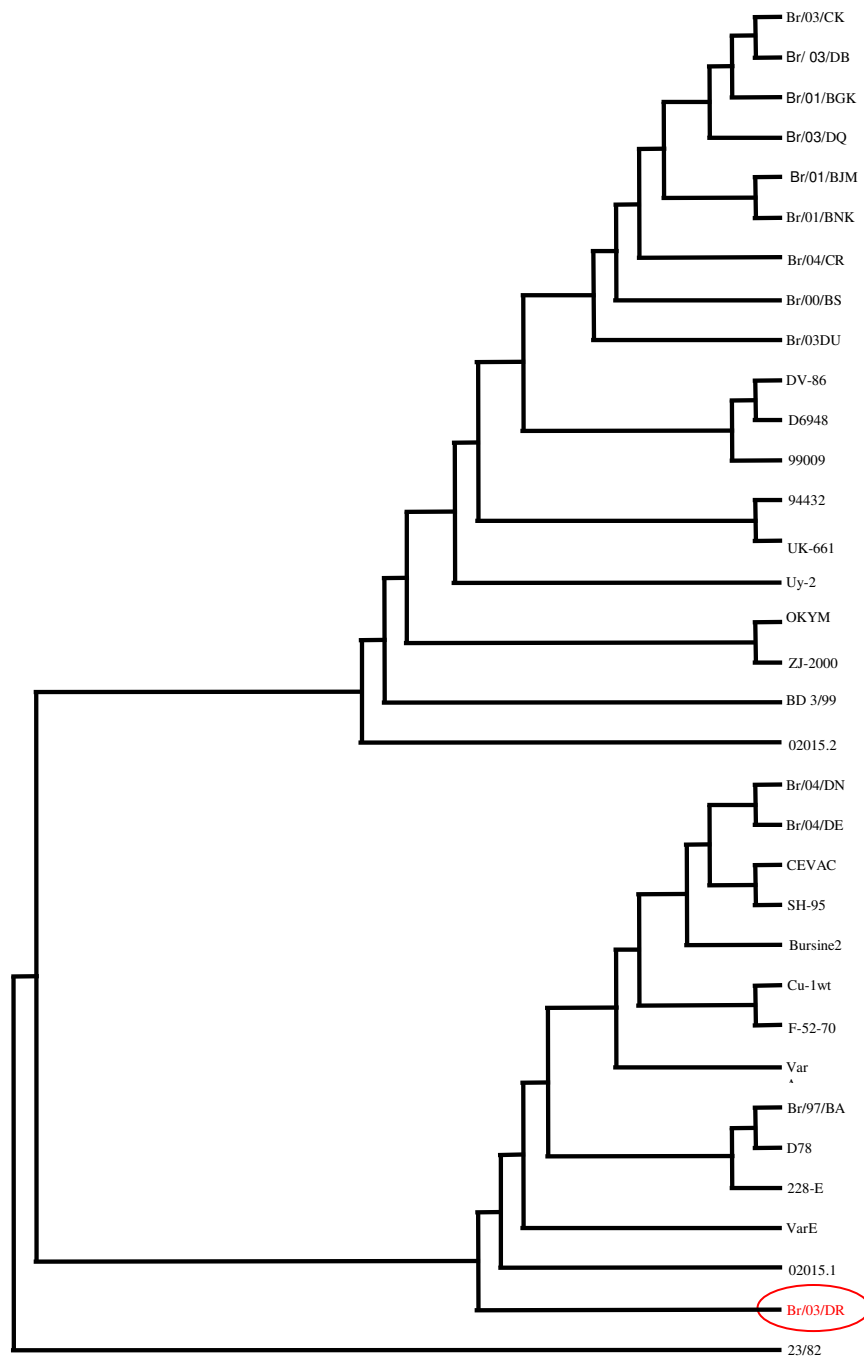


Figure 2: Phylogenetic tree of 13 Brazilian IBDV samples (rhombus symbol), reference strains (cv and vv) and vaccines. Accession numbers are shown in Material and Methods. The neighbor-joining analysis was based in nucleotide sequences of the VP1 gene fragment using the PAUP program. Numbers at nodes indicate the bootstrap confidence values using 1000 replicates. Only bootstraps >50% are shown.

4. Discussion

Sequence analysis of VP2 gene hypervariable region of segment A from Infectious bursal disease viruses (IBDV) has been used to differentiate the strains in very virulent (vv), classic virulent (cv) and variant (van den Berg, 2000; Müller et al., 2003; Wu et al., 2007). Although the most reports had commonly correlated this VP2 gene with the virulence and pathogenicity, studies targeted the VP1 gene has increased lately since the discovery that VP2 is not the sole responsible to the vv phenotype (Boot et al., 2000).

In our previous report, Brazilian IBDV samples from one decade were studied based on the VP2 sequence analysis (Fernandes et al., 2009). In this present study, a fragment from VP1 gene of segment B of these IBDV samples was amplified and their sequences were compared with of others samples, vaccines and references strains and used to construct the phylogenetic tree. This fragment is within the two clusters (cluster a and b) described in Noïen et al. (2006) as representatives to phylogenetic analysis.

Multiple full length sequence analysis of B segment over the years of diverse vv strains from different countries have revealed the presence of 17 common amino acids (aa) residues with eight unique to these strains (Brown et al., 1996, Yamaguchi et al., 1997, Kong *et al.*, 2004, Hernández et al., 2006, Lojkíc et al., 2008). The deduced aa sequence of the Brazilian vv samples presented the three peptide TDN between aa 145-147 and 242E, all common vv aa residues within the fragment studied. Ren et al. (2009) correlated the absence of 146E residue and others two positions in Chinese strain YS07 as responsible to its attenuated virulence but they also correlated the unique mutations in VP2 sequence to the low mortality of this isolate.

In the phylogenetic tree, the Brazilian vvVP1 also branched in a distinct cluster from the cvIBDV strains and even serotype 2 like Yamaguchi et al. (1997) and Islam et al. (2001) had already suggested that the genome segment B would be distinct phylogenetically from that the others IBDV strains. The origin of these vvVP1 would be probably from a genetic reassortment from an unidentified source and besides responsible to the emergence of vvIBDV. Hon et al. (2006) using to the estimation the time of emergence of the most recent common ancestor (TMRCA) and to coalescence techniques of the both genome segments to the IBDV confirmed this reassortment and estimated that it occurred in mid-1980s while that of the vv segment A emerged 20 years before concluding that this reassortment event segment B together with the vv segment A is that caused the enhancement of virulence and expansion of vvIBDVs in mid-1980s. According to this study, our sample Br/03/DR presenting a segment B derived from cvIBDV strain but with the segment A of vvIBDV strain (Fernandes et al., 2009) would be a descendent of the IBDV before this reassortment of vvVP1.

Natural reassortments have also been described in China. Sun et al. (2003) verified that the vv field strain SH95 (vvVP2/cvVP1) maintained its virulence even without the vvVP1 as our sample. The VP1 would not be correlated with the virulence of the vvIBDV as Boot et al. (2000) initially showed. By the other side, Wei et al. in 2004 and 2006, described two reassortants with virulence but without vvVP2 (cvVP2/vvVP1) contrasting with the above studies but like other studies including the VP1 in the virulence of these vvIBDV (Liu and Vakharia, 2004; Boot et al., 2005). Both studies made a warning about the use of live vaccines and the risk of a possible genetic exchange in the generating these reassorteds. However it is known that the rate of genomic reassortment event in nature is low and

depends of many factors. Le Noüen et al. (2006) although have also found a natural reassorted among 50 strains of IBDV of diverse years and locality considered that the co-evolution of both segments is more frequent. It is known that the use of vaccines with intermediate virulence to control the disease with vv strains can be responsible for partial immunosuppression and mild bursal lesions. The viral multiplication although did not revert the virulence could be a source of a genetic exchange originating a natural reassorted virus. This could be another explanation for the origin from the sample Br/03/DR.

Therefore, it is fundamental the full length sequencing of both segments for providing the exact relationship between the genetic composition and the pathogenicity of this sample. The role of cvVP1 of this sample in virulence cannot yet to be established. Anyway, this is a first report of Brazilian natural reassorted IBDV.

5. References

- Boot, H.J., Agnes, A., ter Huurne, A.A., Hoekman, A.J., Peeters, B.P., Gielkens, A.L. 2000. Rescue of very virulent and mosaic infectious bursal disease from cloned cDNA: VP2 is not the sole determinant of the virulent phenotype. *J. Virol.* 74(15), 6701-6711.
- Boot, H.J., Hoekman, A.J.W.; Gielkens, A.L.J., 2005. The enhanced virulence of very virulent infectious bursal disease virus is partly determined by its B-segment. *Arch. Virol.* 150, 137-144.
- Brown, M.D., Green, P., Skinner, A., 1994. 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. *J. Gen. Virol.* 75, 675-680.

- Brown, M.D., Skinner, M.A., 1996. Coding sequences of both genome segments of an European 'very virulent' infectious bursal disease virus. *Virus Res.* 40, 1-15.
- Eterradossi, N., Arnauld, C., Toquin, D., Rivallan, G., 1998. Critical amino acid changes in VP2 variable domain are associated with typical and atypical antigenicity in very virulent infectious bursal disease viruses. *Arch. Virol.* 143, 1627-1636.
- Fernandes, M.J. B., Simoni, I.C., Vogel, M.G., Harakava, R., Rivas, E.B., Oliveira, M.B. C., Kanashiro, A.M.I., Tessari, E.N.C., Gama, N.M.S.Q., Arns, C.W., 2009. Molecular Characterization of Brazilian Infectious Bursal Disease Virus Isolated from 1997 to 2005. *Avian Dis.* 53, 449-454.
- Hernández, M., Banda A., Hernández, D., Panzera, F., Pérez, R., 2006. Detection of very virulent strains of infectious bursal disease virus (vvIBDV) in commercial broilers from Uruguay. *Avian Dis.* 50, 624-631.
- Hon, C.-C.; Lam, T.-Y.; Drummond, A.; Rambaut, A. Lee, Y.-F.; Yip, C.-W.; Zeng, F.; Lam, P.-Y.; Ng, P.T.W.; Leung, F.C.C., 2006. Phylogenetic analysis reveals a correlation between the expansion of very virulent infectious bursal disease virus and reassortment of its genome segment B. *J. Virol.* 80, 8503-8509.
- Islam, M.R., Zierenberg, K., Müller, H., 2001. The genome segment B encoding the RNA-dependent RNA polymerase protein VP1 of very virulent infectious bursal disease virus (IBDV is phylogenetically distinct from that of all other IBDV strains. *Arch. Virol.* 146, 2481-2492.
- Kong, L.L.; Omar, A.R.; Hair-Bejo, M.; Aini, I.; Seow, H.F., 2004. Sequence analysis of both genome segments of two very virulent infectious bursal disease virus field isolates with distinct pathogenicity. *Arch. Virol.* 149, 425-434.

- Le Nouën, C., Rivallan, G., Toquin, D., Darlu, P., Morin, Y., Beven, V., Boisseson, C., Cazaban, C., Comte, S., Gardin, Y., Eterradossi, N., 2001. Very virulent infectious bursal disease virus: reduced pathogenicity in a rare natural segment B-reassorted isolate. *J Gen. Virol.* 87, 209-216.
- Le Nouën, C., Rivallan, G., Toquin, D., Eterradossi, N., 2005. Significance of the genetic relationships deduced from partial nucleotide sequencing of infectious bursal disease virus genome segments A or B. *Arch.Virol.* 150, 313-325.
- Liu, M., Vakharia, V.N., 2004. VP1 protein of infectious bursal disease virus modulates the virulence in vivo. *Virology* 330, 62-73.
- Lojkić, I.; Bidin, Z.; Pokrić, B., 2008. Sequence analysis of both genome segments of three Croatian infectious bursal disease field viruses. *Avian Dis.* 52, 513-519.
- Lukert, P.D., Saif, Y.M., 2003. Infectious bursal disease. In: Y.M. Saif, H.J. Barnes, J.R. Glisson, A.M. Fadly, L.R. McDougald; D.E. Swayne, 2003. *Disease of Poultry* 11th edn. (pp161-179). Ames: Iowa State Press.
- Müller, H.; Islam, R.; Raue, R., 2003 Research on infectious bursal disease—the past, the present and the future. *Vet. Microbiol.* 97, 153–165.
- Nagarajan, M.M., Kibenge, F.S.B., 1997. Infectious bursal disease virus: a review of molecular basis for variations in antigenicity and virulence. *Can. J. Vet. Res.* 61, 81-88.
- Ren, X.; Xue, C.; Zhang, Y.; Chen, F.; Cao, Y., 2009. Genomic analysis of one Chinese strains YS07 of infectious bursal disease virus reveals unique genetic diversity. *Virus Genes* 39 (2), 246-248.

- Sun, J.-H.; Lu, P.; Yan, Y-X; Hua, X.-G.; Jiang, J.; Zhao, Y., 2003. Sequence and analysis of genomic segment A and B of very virulent infectious bursal disease virus isolated from China. *J. Vet. Med. B* 50, 148-154.
- Vakharia, V. N., He, J., Ahamed, B. and Snyder, D.B., 1994. Molecular basis of antigenic variation in infectious bursal disease virus. *Virus Res.* 31, 265-273.
- Van den Berg, T.P., 2000. Acute infectious bursal disease in poultry: a review. *Avian Pathol.* 29, 175-194.
- Van den Berg, T.P., Morales, D., Eterradossi, N., Rivallan, G., Toquin, D., Raue, R., Zierenberg, K., Zhang, M.F., Zhu, Y.P., Wang, C.Q., Zheng, H.J., Wang, X., Chen, G.C., Lim, B.L., Müller, H., 2004. Assessment of genetic, antigenic and pathotypic criteria for the characterization of IBDV strains. *Avian Pathol.* 33, 470-476.
- Wei, Y.; Li, J.; Zheng, J.; Xu, H.; Li, L.; Yu, L., 2006. Genetic reassortment of infectious bursal disease virus in nature. *BBRC*, 350, 277-287.
- Wei, Y.; Yu, S.; Zheng, J.; Chu, W.; Xu, H.; Yu, S.; Yu, L., 2008. Reassortment infectious bursal disease virus isolated in China. *Virus Res.* 131:279-282.
- Wu, C.C., Rubinelli, P., Lin, T. L., 2007. Molecular detection and differentiation of infectious bursal disease virus. *Avian Dis.* 51, 515-526.
- Yamaguchi, T., Ogawa, M., Miyoshi, M., Inoshima, M., Fukushi, H., Hirai, H., 1997. Sequence and phylogenetic analyses of highly virulent infectious bursal disease virus. *Arch. Virol.* 142, 1441-1458.

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O monitoramento contínuo dos IBDV é de extrema importância e fundamental não só para o conhecimento da epidemiologia molecular deste vírus que ainda tem um grande significado para a avicultura, mas também para o controle da IBD, na manutenção ou redefinição de medidas preventivas, vacinas efetivas e programas de vacinação.

Este trabalho fez um estudo em uma década da presença e classificação dos IBDV no Brasil padronizando-se a técnica de RT-PCR “one-step” para um fragmento do gene VP2 correspondente a região hipervariável da proteína VP2 de IBDV. Das 66 amostras de bursas de Fabrício estudadas, 43 foram provenientes de granjas de corte e 23 de postura. A idade média das aves foi de 35 dias com variações de 10 até 120 dias de idade sendo que a maioria foi vacinada com esquemas múltiplos de vacinas e sintomas da IBD. A identificação de IBDV foi feita em 41 amostras, com 25 amostras sendo classificadas como vv, sendo 12 provenientes de granjas de postura e 13 de corte, e outras 16 foram classificadas como cv sendo 15 de corte e uma de postura. A distribuição dos vvIBDV durante a década de estudo mostra que independente do tipo de granja, iniciou-se a identificação dos vvIBDVs a partir de 1999, com aumento entre 2001 a 2003 e posterior declínio, coincidindo com a introdução das vacinas fortes no mercado. Além disso, a presença dos cvIBDV também mostra a necessidade da manutenção da vacinação. Surto da doença clássica ocorrem ainda hoje em lotes não vacinados mas também surtos pós-vacinal, o que questiona o uso de vacinas fortes e o aparecimento de rearranjos naturais devido provavelmente a troca genética dos vírus com as vacinas.

A caracterização molecular de IBDV principalmente dos vírus “vv” é uma boa ferramenta inicial para identificação e classificação dos IBDV. Na sequência da VP2 de três de nossas amostras vv foi observado mutações únicas que indicam continuas mudanças genéticas ocorrendo nestes vvIBDV brasileiros, fato comum em vírus de RNA segmentados que podem sofrer mudanças contínuas entre outros fatores pela pressão vacinal. Estas diferenças na sequência observadas em nossas amostras brasileiros devem ser avaliadas quanto à patogenicidade e virulência em testes *in vitro* e *in vivo* assim como outras características do vírus. As nossas amostras cv apresentaram uma semelhança maior com as vacinas utilizadas em nosso país do que com as outras amostras cv mostrando que a vacinação aplicada está sendo não só eficiente como substituindo as cepas selvagens pelas vacinais.

O estudo do gene VP1 também foi feito nas amostras que se apresentaram positivas para IBDV pela análise anterior do gene VP2, devido a perspectiva de que este gene VP1 também tenha influência na virulência dos vvIBDV já que apenas o gene VP2 não seria o único responsável por esta virulência. Na verdade, especula-se que a alta virulência destes vírus possa ser um efeito sinérgico de mutações de ambos os segmentos. Alterações na virulência de outros vírus RNA causada por mutações em sua RdRp também são documentadas. Em 17 amostras houve a identificação do gene VP1 de IBDV pela RT-PCR sendo que 13 amostras tinham sido classificadas pela análise anterior do gene VP2 como vv e 3 como cv. Estas amostras mantiveram também esta classificação pela sequência e filogenia do gene VP1. Apenas uma amostra com sequência VP2vv apresentou a sequência de VP1cv e agrupou-se no ramo destas na árvore filogenética. Este é o primeiro relato de um rearranjo natural de IBDV isolado no Brasil.

O estudo da evolução genética de IBDV através do sequenciamento completo dos dois segmentos e correlação das diferenças antigênicas e patogenicidade de um maior número de amostras se faz necessário e é primordial para fornecer e acumular informações e conhecimento deste vírus.

5. CONCLUSÕES

- Este é um estudo continuado em uma década da presença de vvIBDV no Brasil.
- A identificação de IBDV, através da RT-PCR de um fragmento do gene VP2, foi feita em 41 das 66 amostras de bursas de galinha coletadas no período de 1997-2005 provenientes de Estados do Brasil.
- A caracterização molecular destas amostras positivas pela RT-PCR/REA classificou 25 amostras como “very virulent” (vv) e 16 como clássicas-virulentas (cv) além da obtenção de seis grupos moleculares.
- O sequenciamento e a filogenia destas amostras também confirmou o caráter vv e cv com a presença dos marcadores moleculares vv (222A, 242I, 256I e 294I). Três amostras vvIBDV (/BR/03/CK, Br/03DB e Br/04/CR) apresentaram mutações únicas mostrando continuas mudanças genéticas.
- Dezesete amostras foram positivas pelo RT-PCR para IBDV pela análise de um fragmento do gene VP1.
- As amostras vv (13) e cv (3) classificadas pela análise da região hipervariável do gene VP2 mantiveram esta classificação pela sequência e filogenia do gene VP1.
- Uma amostra, a BR/03/DR, com sequência VP2vv apresentou a sequência de VP1cv assim como se agrupou no ramo destas na árvore filogenética. Este é o primeiro relato de um rearranjo natural de IBDV isolado no Brasil (vvVP2cvVP1).

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abdel-Alim, G.A.; Saif, Y.M. Immunogenicity and antigenicity of very virulent strains of infectious bursal disease virus. **Avian Diseases**, **45**: 92-101, 2001.
- ABEF - Associação Brasileira dos Produtores e Exportadores de frango. Relatório Anual 2007-2008. Disponível em: <<http://www.abef.com.br>>. Acesso em: 09 jan. 2009.
- Allan, W.H.; Faragher, J.T.; Cullen, G.A. Immunosuppression by the infectious bursal agent in chickens immunized against Newcastle disease. **Veterinary Record**, **90**: 511-512, 1972.
- Ashraf, A.; Tang, Y.; Saif, Y.M. Development of differential RT-PCR assays and molecular characterization of the complete VP1 gene of five strains of very virulent infectious bursal disease virus. **Avian Diseases**, **51**: 935-941, 2007.
- Azad, A.; Jagadish, M.N.; Brown, M.A.; Hudson, P.J. Deletion mapping and expression in *E. coli* of the large genomic segment of a birnavirus. **Virology**, **161**: 145-152, 1987.
- Banda, A.; Villegas, P. Genetic characterization of very virulent infectious bursal disease viruses from Latin America. **Avian Diseases**, **48**: 540-549, 2004.
- Bayliss, C.D.; Spies, U.; Shaw, K.; Peters, R.W.; Papageorgiou, A.; Müller, H.; Boursnell, M.E.G. A comparison of the sequences of segment A of four infectious bursal disease virus strains and identification of a variable region in VP2. **Journal of General Virology**, **71**: 1303-1312, 1990.
- Becht, H. Infectious bursal disease virus. **Current Topical of Microbiology and Immunology**, **90**: 107-121, 1981.

- Bolis, D.A.; Paganini, F.J.; Simon, V.A.; Zuanaze, M.F.; Scanavini Neto, H.; Correa, A.R.A.; Ito N.M.K. Gumboro disease: evaluation of serological and anatomopathological responses in vaccinated broiler chickens challenged with very virulent virus strain. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, **5(2)**: 137-146, 2003.
- Boot, H.J.; Agnes, A.; ter Huurne, A.A.; Hoekman, A.J.; Peeters, B.P.; Gielkens, A.L. Rescue of very virulent and mosaic infectious bursal disease from cloned cDNA: VP2 is not the sole determinant of the virulent phenotype. **Journal of Virology**, **74(15)**: 6701-6711, 2000.
- Boot, H.J.; Hoekman, A.J.W.; Gielkens, A.L.J. The enhanced virulence of very virulent infectious bursal disease virus is partly determined by its B-segment. **Archives of Virology**, **150**: 137-144, 2005.
- Brown, M.D.; Green, P.; Skinner, A. 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 of General Virology**, **75**: 675-680, 1994.
- Brown, M.D.; Skinner, M.A. Coding sequences of both genome segments of an European 'very virulent' infectious bursal disease virus. **Virus Research**, **40**: 1-15, 1996.
- Cao, Y.C.; Yeung, W.S.; Law, M.; 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 Diseases**, **42**: 340-351, 1998.
- Chettle, N.; Stuart, J.C.; Wyeth, P.J. Outbreak of virulent infectious bursal disease in East Anglia. **Veterinary Record**, **125**: 271-272, 1989.
- Cosgrove, A.S. An apparently new disease of chickens avian necrosis. **Avian Diseases**, **6**: 385-389, 1962.

- Di Fabio, J.; Rossini, L.I.; Etteradossi, N.; Toquin, M.D.; Gardin, Y. European-like pathogenic infectious bursal disease viruses in Brazil. **Veterinary Record**, **14**: 203-204, 1999.
- Dobos, P.; Hill, B.J.; Hallett, R.; Kells, D.T.C.; Becht, H.; Teninges, D. Biophysical and biochemical characterization of five animal viruses with bisegmented double-stranded RNA genomes. **Journal of Virology**, **32**: 593-605, 1979.
- Dolz, R.; Majó, N.; Ordóñez, G.; Porta, R. Viral genotyping of infectious bursal disease viruses isolated from the 2002 acute outbreak in Spain and comparison with previous isolates. **Avian Diseases**, **49**: 332-339, 2005.
- Dormitorio, T.V., Giambrone, J.J.; Duck, L.W. Sequence comparisons of the variable VP2 region of eight infectious disease virus isolates. **Avian Diseases** **41**: 36-44, 1997.
- Dormitorio, T.V., Giambrone, J.J.; Guo, K.; Jackwood, D.J. Molecular and phenotypic characterization of infectious disease virus isolates. **Avian Diseases** **51**: 597-600, 2007.
- Etteradossi, N.; Rivallan, G. Toquin, D.; Guittet, M. Limited antigenic variation among recent infectious bursal disease virus isolates from France. **Archives of Virology** **142**: 2079-2087, 1997.
- Etteradossi, N.; Arnould, C.; Toquin, D.; Rivallan, G. Critical amino acid changes in VP2 variable domain are associated with typical and atypical antigenicity in very virulent infectious bursal disease viruses. **Archives of Virology**, **143**: 1627-1636, 1998.
- Fauquet, C.M.; Mayo, M.A.; Maniloff, J.; Desselberger, U.; Ball, LA. In: _____ (Ed.), **Virus Taxonomy**, p. 561-569, London: Elsevier Academic Press, 2005.

- Giambrone, J.J. Microculture neutralization test for serodiagnosis of three avian viral infections. **Avian Diseases**, **24**: 284-287, 1980.
- Gomes, A.D.; Abreu, J.T.; Redondo, A.F.; Martins, N.R.S.; Resende, J.S.; Resende, M. Genotyping of infectious bursal disease virus strains by restriction fragment length polymorphism analysis of VP1, VP2, and VP3 genes. **Avian Diseases**, **49**: 500-506, 2005.
- Hassan, M.K.; Saif, Y.M.; Shawky, S. Comparison between antigen-capture ELISA and conventional methods used for titration of infectious bursal disease virus. **Avian Diseases**, **40**: 562-566, 1996.
- Hernández, M.; Banda, A.; Hernández, D.; Panzera, F.; Pérez, R. Detection of very virulent infectious bursal disease virus (vvIBDV) in commercial broilers from Uruguay. **Avian Diseases**, **50**: 624-631, 2006.
- Hirai, K.; Shimakura, S.; Hirose, M. Immunodiffusion reaction to avian infectious bursal virus. **Avian Diseases**, **16** (4): 961-964, 1972.
- Hitchner, S.B. Infectivity of infectious bursal disease virus for embryonating eggs. **Poultry Science**, **49**: 511-516, 1970.
- _____. History of biological control of poultry diseases in the U.S.A. **Avian Diseases**, **48**: 1-8, 2004.
- Hon, C.C.; Lam, T.Y.; Drummond, A.; Rambaut, A. Lee, Y.F.; Yip, C.W.; Zeng, F.; Lam, P.Y.; Ng, P.T.W.; 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**, **80**: 8503-8509, 2006.

- Hudson, P.J.; Mckern, N.M.; Power, B.E.; Azad, A.A. Genomic structure of large RNA segment of infectious bursal disease virus. **Nucleic Acids Research**, **14**: 5001-5012, 1986.
- 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 Diseases**, **45**: 297-306, 2001.
- Jackwood, D.J.; Jackwood, R.J. Infectious bursal disease viruses: molecular differentiation of antigenic subtypes among serotype 1 viruses. **Avian Diseases**, **38**: 531-537, 1994.
- Jackwood, D.J.; Jackwood, R.J., Sommer, S.E. Identification and comparison of point mutations associated in classic and variant infectious bursal disease viruses. **Virus Research**, **49**: 131-137, 1997.
- Jackwood, D.J.; Hanes, G.; Miller, H. Infectious bursal disease viral RNA amplification using RT/PCR from bursa tissue following phenol:chloroform inactivation of the virus. **Avian Diseases**, **40**: 457-460, 1996.
- Jackwood, D.H.; Saif, Y.M. Antigenic diversity of infectious bursal disease virus. **Avian Diseases**, **31**: 766-770, 1987.
- Jackwood, D.H.; Saif, Y.M.; Hughes, J.H. Characteristics and serological studies of two serotypes of IBDV in turkeys. **Avian Diseases** **26(4)**: 871-881, 1982.
- _____. Replication of infectious bursal disease virus in continuous cell lines. **Avian Diseases**, **31**: 370-375, 1987.
- Jackwood D.J.; Sommer, S.E. Restriction fragment length polymorphisms in the VP2 gene of infectious bursal disease viruses. **Avian Diseases**, **41**: 627-637, 1997.

- _____. Genetic characteristics of infectious bursal disease viruses from four continents. **Virology**, **365**: 369-375, 2007.
- Jackwood, D.H ; Sommer, S.E.; Knoblich, H.V. Amino acid comparison of infectious bursal disease viruses placed in the same or different molecular groups by RT/PCR-RFLP. **Avian Diseases**, **45**: 330-339, 2001.
- Jaenisch, F. R. Biossegurança e cuidados sanitários para frangos. 1999. Disponível em: <<http://www.avisite.com.br/cet/trabalhos.asp?codigo=18>>. Acesso em: 30 out. 2006.
- Juneja, S.S.; Ramneek, Deka, D.; Oberoi, M.S.; Singh, A. Molecular characterization of field isolates and vaccine strains of infectious bursal disease virus. **Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases**, **31(1)**: 11-23, 2007.
- Kasanga, C.J.; Yamaguchi, T.; Wanbura, P.N.; Maeda-Machang'u, A.D.; Ohya, K.; Fukushi, H. Molecular characterization of infectious bursal disease vírus (IBDV): diversity of very virulent IBDV in Tanzânia. **Archives of Virology**, **152**: 783-790, 2007.
- Kibenge, F.S.B.; Jackwood, D.J.; Mercado, C.C. Nucleotide sequence analysis of genome segment A infectious bursal disease virus. **Journal of General Virology**, **71**: 569-577, 1990.
- Kibenge, F.S.B.; Qian, B.; Cleghorn, J.R.; Martin, C.K. Infectious bursal disease virus polyprotein processing does not involve cellular proteases. **Archives of Virology**, **142**: 2401-2419, 1997.
- Kwon, H.M.; Kim, S.J. Sequence analysis of the variable VP2 gene of infectious bursal disease viruses passaged in Vero cells. **Virus Genes**, **28(3)**: 285-291, 2004.
- Lasher, H.N.; Davis, V.S. History of infectious bursal disease in the U.S.A. - The first two decades. **Avian Diseases**, **41**: 11-19, 1997.

- Lee, L.H.; Yu, S.L.; Shieh, H.K. Detection of infectious bursal disease virus infection using the polymerase chain reaction. **Journal of Virological Methods**, **40**: 243-254, 1992.
- Lim, B.L.; Cao, Y.; Yu, T.; Mo, C. Adaptation of very virulent infectious bursal disease virus to chicken embryonic fibroblasts by site-directionated mutagenesis of residues 279 and 284 of viral coat protein VP2. **Journal of Virology**, **73(4)**: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 Diseases**, **37**: 315-323, 1993.
- Liu, H.J.; Giambrone, J.J.; Dormitorio, T. Detection of genetic variations in serotype I isolates of infectious bursal disease virus using polymerase chain reaction and restriction endonuclease analysis. **Journal of Virological Methods**, **48**: 281-291, 1994.
- Liu, M.; Vakharia, V.N. VP1 protein of infectious bursal disease virus modulates the virulence in vivo. **Virology**, **330**: 62-73, 2004.
- Lombardo, E.; Maraver, A.; Castón, J.R.; Rivera, J.; Fernández-Aria, A.; Serrano, A.; Carrascosa, J.L.; Rodriguez, J.F. VP1, the putative RNA-dependent RNA polymerase of infectious bursal disease virus, forms complexes with the capsid protein VP3, leading to efficient encapsidation into virus-like particles. **Journal of Virology**, **73(8)**: 6973-6983, 1999.
- Lombardo, E.; Maraver, A.; Espinosa, I.; Fernández-Aria, A.; Rodriguez, J.F. VP5, the nonstructural polypeptide of infectious bursal disease virus, accumulates within the host plasma membrane and induces cell lysis. **Virology**, **277**: 345-357, 2000.

- Lukert, P.D; Saif, Y.M. Infectious bursal disease. In: Y.M. Saif, H.J. Barnes, J.R. Glisson, A.M. Fadly, L.R. McDougald; D.E. Swayne. **Disease of Poultry** 11th ed. Ames: Iowa State Press. 2003, p. 161-179.
- Maraver, A.; Clemente, R.; Rodriguez, J.F.; Lombardo, E. Identification and molecular characterization of the RNA polymerase-binding motif of infectious bursal disease virus inner capsid protein VP3. **Journal of Virology**, **77(4)**: 2459-2468, 2003.
- Marquardt, W.W.; Johnson, R.B.; Odenwald, W.F.; Schlotthober, B.A. An indirect enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for measuring antibodies in chickens infected with infectious bursal disease virus. **Avian Diseases**, **24**: 375-385, 1980.
- 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 IBDV from fowl, turkeys and ducks: Demonstration of a second serotype. **Avian Pathology**, **9**: 395-404, 1980.
- McNulty, M.S.; Allan, G.M.; McFerran, J.B. Isolation of infectious bursal disease virus from turkeys. **Avian Pathology**, **8**: 205-212, 1979.
- Montassier, H.J. Doença de Gumboro: Imunologia. In: **II Simpósio da Doença de Gumboro**, FACTA, Campinas/SP, 2001, p37-45.
- Müller, H.; Nitschke, R. The two segments of infectious bursal disease virus are circularized by a 90,000-Da protein. **Virology**, **59**: 174-177, 1987.
- Müller, H.; Scholtissek, C.; Becht, H. The genome of infectious bursal disease virus consists of two segments of double-stranded RNA. **Journal of Virology**, **31**: 584-589, 1979.
- Müller, H.; Schnitzler, F.; Bernstein, F.; Becht, H.; Cornelissen, D.; Lütticken, D.H. Infectious bursal disease of poultry: antigenic structure of the virus and control. **Veterinary Microbiology**, **33**: 175-183, 1992.

- Müller, H.; Islam, R.; Raue, R. Research on infectious bursal disease—the past, the present and the future. **Veterinary Microbiology**, **97**: 153–165, 2003.
- Mundt, E. Tissue culture infectivity of different strains of infectious bursal disease virus is determined by distinct amino acids in VP2. **Journal of Virology**, **80**: 2067-2076, 1999.
- Mundt, E.; Beyer, J.; Müller, H. Identification of a novel viral protein in infectious bursal disease virus-infected cells. **Journal of General Virology**, **76**: 437-443, 1995.
- Nagarajan, M.M.; Kibenge, F.S.B. Infectious bursal disease virus: a review of molecular basis for variations in antigenicity and virulence. **Canadian Journal of Veterinary Research**, **61**: 81-88, 1997.
- Nakano, M.; Castro Portugal, M.A.S.; Saliba, A.M.; Nobre, D.; Narimatsu, M.N. Ocorrência da “Doença de Gumboro” no Brasil. Diagnóstico anátomo-patológico. **O Biológico**, **38**: 60-61, 1972.
- Ojkic, D.; Martin, E.; Swinton, J.; Binnington, B.; Brash, M. Genotyping of Canadian field strains of infectious bursal disease virus. **Avian Pathology**, **36(5)**: 427-433, 2007.
- Remonini P.; Calderón M.G.; Aguirre, S.; La Torre, O.P.J.; Mattion, N. Characterization of infectious bursal disease virus from Argentina. **Avian Diseases**, **50**: 245-251, 2006.
- Rodrigues, O.; Pereira, R.A. Diagnóstico clínico e envio de material ao laboratório. **In: II Simpósio da Doença de Gumboro, FACTA, Campinas/SP, 2001**, p 67-73.
- Santos, B.M.; Moraes, M.P.; Barrios, P.R.; Marin, S.Y.; Nascimento, W.M. Ocorrência de doença infecciosa bursal após vacinação com vacina atenuada com baixa passagem. **Arquivos do Instituto Biológico**, **71 (4)**: 511-513, 2004.

- Sapats, S.; Gould, G.; Trinidad, L.; Parede, L.H.; David, C.; Ignjatovic, J. An ELISA for detection of infectious bursal disease virus and differentiation of very virulent strains based on single chain recombinant chicken antibodies. **Avian Pathology**, **34** (6): 449-455, 2005.
- Saukas, T.N. **Caracterização de amostras do vírus da doença infecciosa bursal (Doença de Gumboro) isolada no Brasil**. Dissertação (Mestrado), Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 1978.
- Schnitzler, D.; Bernstein, F.; Müller, H.; Becht, H. The genetic basis for the antigenicity of the VP2 protein of the infectious bursal disease virus. **Journal of General Virology**, **74**, 1563-1571, 1993.
- Snyder D.B.; Lana, D.P.; Cho, B.R.; Marquardt, W.W. Group and strain specific neutralization sites of infectious bursal disease viruses defined with monoclonal antibodies. **Avian Diseases**, **32**: 527-534, 1988.
- Snyder D.B.; Marquardt, W.W.; Mallinson, E.T.; Savage, P.K.; Allan, D.C. Rapid serological profiling by enzyme-linked immunosorbent assay. III. Simultaneous measurements of antibodies bronchitis, infectious bursal disease viruses, and Newcastle disease viruses in single serum dilution. **Avian Diseases**, **28**: 12-24, 1984.
- Spies, U.H.; Muller, H.; Becht, H. Properties of RNA polymerase activity associated with infectious bursal disease virus and characterization of its products. **Virus Research**, **8**: 127-140, 1987.
- _____. Nucleotide sequence of infectious bursal disease virus genome segment A delineates two major open reading frames. **Nucleic Acids Research**, **17** (19): 7982, 1990.

- Sun, J.H.; Lu, P.; Yan, Y.X; Hua, X.G.; 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 B**, 50: 148-154, 2003.
- Tacken, M.G.J.; Rottier, P.J.M.; Gielkens, A.L.J.; Peeters, B.P.H. Interactions in vivo between the proteins of infectious bursal disease virus: capsid protein VP3 interacts with the RNA-dependent RNA polymerase, VP1. **Journal of General Virology**, 81: 209-218, 2000.
- Tham, K.M.; Young, L.W.; Moon, C.D. Detection of Infectious bursal disease virus by reverse transcription-polymerase chain reaction amplification of the virus segment A gene. **Journal of Virological Methods**, 53: 201-212, 1995.
- Vakharia, V. N.; He, J.; Ahamed, B.; Snyder, D.B. Molecular basis of antigenic variation in infectious bursal disease virus. **Virus Research**, 31: 265-273, 1994.
- van den Berg, T.P. Acute infectious bursal disease in poultry: a review. **Avian Pathology**, 29: 175-194, 2000.
- van den Berg, T.P.; Gonze, M.; Meulemans, G. Acute infectious bursal disease in poultry: isolation and characterization of a highly virulent strain. **Avian Pathology**, 20: 133-143, 1991.
- van den Berg, T.P.; Meulemans, G. Acute infectious bursal disease in poultry: protection afforded by maternally derived antibodies and interference with live vaccination. **Avian Pathology**, 20: 409-421, 1991.
- van den Berg, T.P.; Morales, D.; Eterradosi, N.; Rivallan, G.; Toquin, D.; Raue, R.; Zierenberg, K.; Zhang, M.F.; Zhu, Y.P.; Wang, C.Q.; Zheng, H.J.; Wang, X.; Chen, G.C.; Lim, B.L.; Müller, H. Assessment of genetic, antigenic and pathotypic criteria for the characterization of IBDV strains. **Avian Pathology**, 33(5): 470-476, 2004.

- van Loon, A.A.; 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**, **83**: 121-129, 2002.
- von Einem, U.I.; Gorbalenya, A.E.; Schirrmeier, H.; Behrens, S.E.; Letzel, T.; Mundt, E. VP1 of infectious bursal disease virus is an RNA-dependent RNA polymerase. **Journal of General Virology**, **85**: 2221-2229, 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**, **350**: 277-287, 2006.
- Winterfield, R.W.; Hitchner, S.B. Etiology of an infectious nephritis-nephrosis syndrome of chickens. **American Journal of Veterinary Research**, **23**: 1273-1279, 1962.
- Winterfield, R.W.; Hitchner, S.B.; Appleton, G.S.; Cosgrove, A.S. Avian nephrosis, nephritis and Gumboro disease. **L & M News and Views**, **3**: 103, 1962.
- Wu, C.C.; Lin, T.L.; Zhang, H.G.; Davis, V.S.; Boyle, J.A. Molecular detection of infectious bursal disease virus by polymerase chain reaction. **Avian Diseases**, **36**: 221-226, 1992.
- Wu, C.C.; Rubinelli, P.; Lin, T. L. Molecular detection and differentiation of infectious bursal disease virus. **Avian Diseases**, **51**: 515-526. 2007.
- Yamaguchi, T.; Ogawa, M.; Miyoshi, M.; Inoshima, M.; Fukushi, H.; Hirai, H. Sequence and phylogenetic analyses of highly virulent infectious bursal disease virus. **Archives of Virology**, **142**: 1441-1458, 1997.
- Yu, L.; Song, K.; Zhang, Y.; Deng, R. Cloning and expression of the VP2 gene of an infectious bursal disease virus. **Avian Diseases**, **40**: 170-178, 2000.

- Zierenberg, K.; Nieper, H.; van den Berg, T.P.; Ezeokoli, C.D.; Voß, M.; Müller, 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**, **145**: 113-125, 2000.
- Zierenberg, K.; Raue, R.; Muller, H. Rapid identification of “very virulent” strains of infectious bursal disease virus by reverse transcription-polymerase chain reaction combination with restriction enzyme analysis **Avian Pathology**, **30**: 55-62, 2001.

7. ANEXOS

7.1 Anexo 1: Uma das 21 amostras muito virulentas depositadas no Genbank sob número EU835882.

7.2 Anexo 1: Uma das 7 amostras clássico virulentas depositadas no Genbank sob número EU835883.

ANEXO 1

1: EU835882 [Reports](#) [\[S\]](#) [Infectious bursal](#) [\[gi:194293488\]](#)

LOCUS	EU835882	438 bp	RNA	linear	VRL 21-JUL-2008
-------	----------	--------	-----	--------	-----------------

DEFINITION Infectious bursal disease virus isolate Br/04/CR viral protein 2 (VP2) gene, partial cds.

ACCESSION EU835882

VERSION EU835882.1 GI:194293488

KEYWORDS .

SOURCE Infectious bursal disease virus (Gumboro virus)

ORGANISM [Infectious bursal disease virus](#)
 Viruses; dsRNA viruses; Birnaviridae; Avibirnavirus.

REFERENCE 1 (bases 1 to 438)

AUTHORS Fernandes,M.J.B., Simoni,I.C., Rivas,E.B., Harakava,R. and Arns,C.W.

TITLE Molecular identification of Brazilian infectious bursal disease viruses during the period 1997-2005

JOURNAL Unpublished

REFERENCE 2 (bases 1 to 438)

AUTHORS Fernandes,M.J.B., Simoni,I.C., Rivas,E.B., Harakava,R. and Arns,C.W.

TITLE Direct Submission

JOURNAL Submitted (19-JUN-2008) Centro de Pesquisa e Desenvolvimento de Sanidade Animal, Instituto Biologico, Avenida Conselheiro Rodrigues Alves 1252, Sao Paulo, Sao Paulo 04014-002/CP12898, Brazil

FEATURES Location/Qualifiers

source 1..438
 /organism="Infectious bursal disease virus"
 /mol_type="genomic RNA"
 /isolate="Br/04/CR"
 /db_xref="taxon:10995"
 /segment="A"
 /country="Brazil"
 /collection_date="2004"

gene <1..>438
 /gene="VP2"

CDS <1..>438
 /gene="VP2"
 /note="hypervariable region"
 /codon_start=1
 /product="viral protein 2"
 /protein_id="ACF39926.1"
 /db_xref="GI:194293488"
 /translation="VYTTITAADNYQFSSQYQAGGVTTITLFSANIDAITSLSIGGELVF
 QTSVQDLILGATIIYLIIGFDGTAVITRAVAADNGLTAGTDNLMF FNIVIPTNREITQPI
 SIRLEIVTSRRGGQAGBQMSWSASGSLAVTINGGNYPGALRPVT"

ORIGIN

1	gtetatacta	taacagcagc	cgataattac	cagttctcat	cacagtacca	agcaggtggg
61	gtaacaaatc	cactgtttctc	agctaataac	gatgccatca	caagcctcag	catcgggggg
121	gaactcgtgt	ttcaaaacaag	cgtccaagac	cttatactgg	gtgctaccat	ctaccttata
181	ggcttttgatg	ggactgcggt	aatcaccaga	gctgtggccg	cagacaatgg	nctgacggcc
241	ggcactgaca	accttatgcc	attcaatatt	gtgattccaa	ccaacgagat	aacccagcca
301	atcacctcca	tcaaaactgga	gatagtgacc	tccaaaagag	gtggtaagc	gggggaacag
361	atgtcatggt	cagcaagtgg	gagcctagcn	gtgacgattc	acggggggcaa	ctatccaggg
421	goccttcgtc	ccgtcaca				

ANEXO 2



1: [EU835883](#). [Reports](#) Infectious bursal...[gi:194293490]

LOCUS EU835883 438 bp RNA linear VRL 21-JUL-2008
 DEFINITION Infectious bursal disease virus isolate Br/04/DN viral protein 2 (VP2) gene, partial cds.
 ACCESSION EU835883
 VERSION EU835883.1 GI:194293490
 KEYWORDS .
 SOURCE Infectious bursal disease virus (Gumboro virus)
 ORGANISM [Infectious bursal disease virus](#)
 Viruses; dsRNA viruses; Birnaviridae; Avibirnavirus.
 REFERENCE 1 (bases 1 to 438)
 AUTHORS Fernandes,M.J.B., Simoni,I.C., Rivas,E.B., Harakava,R. and Arns,C.W.
 TITLE Molecular identification of Brazilian infectious bursal disease viruses during the period 1997-2005
 JOURNAL Unpublished
 REFERENCE 2 (bases 1 to 438)
 AUTHORS Fernandes,M.J.B., Simoni,I.C., Rivas,E.B., Harakava,R. and Arns,C.W.
 TITLE Direct Submission
 JOURNAL Submitted (19-JUN-2008) Centro de Pesquisa e Desenvolvimento de Sanidade Animal, Instituto Biologico, Avenida Conselheiro Rodrigues Alves 1252, Sao Paulo, Sao Paulo 04014-002/CP12898, Brazil
 FEATURES
 source Location/Qualifiers
 1..438
 /organism="Infectious bursal disease virus"
 /mol_type="genomic RNA"
 /isolate="Br/04/DN"
 /db_xref="taxon:[10995](#)"
 /segment="A"
 /country="Brazil"
 /collection_date="2004"
[gene](#) <1..>438
 /gene="VP2"
[CDS](#) <1..>438
 /gene="VP2"
 /note="hypervariable region"
 /codon_start=1
 /product="viral protein 2"
 /protein_id="[ACF39927.1](#)"
 /db_xref="GI:194293491"
 /translation="VYTITAADDYQFSSQYQPGGVTTITLFSANIDAITSLSVGGELVFQTSVQGLVLGATIFYFIGFDGTTVITRAVAANGLTAGTDNLMPFNLVIPTNEITQBITSIKLEVVTSSKGGQAGDQMSWSASGSLAVTXHGGNYPGALRPVT"
 ORIGIN
 1 gtctacacca taactgcagc cgatgattac caattctcat cacagtacca accaggtggg
 61 gtaacaatca cactgttctc agccaacatt gatgctatca caagcctcag cggtggggga
 121 gagctcgtgt ttcaaacaag cgtccaaggc cttgtactgg gcgccaccat ctactttata
 181 ggctttgatg ggactacggt aatcaccagg gctgtggcgg caaacaatgg gctgacggcc
 241 ggcaccgaca atcttatgcc attcaatctt gtgattccaa ccaacgagat aaccagacca
 301 atcacatcca tcaaaactgga ggtagtacc tccaaaagt gtggccaggc aggggatcag
 361 atgtcatggt cggcaagtgg gagcctagca gtgacgatnc acggtggcaa ctatccaggg
 421 gcccttcgtc ccgtcaca