

AVALIAÇÃO DA RELAÇÃO ANTIGÊNICA E IMUNOGÊNICA ENTRE AMOSTRAS DE CAMPO E AMOSTRAS VACINAIS DO VÍRUS DA DOENÇA INFECCIOSA BURSAL, ATRAVÉS DO "WESTERN BLOTTING"

HAMILTON LUIZ de SOUZA MORAES¹, CARLOS TADEU PIPPI SALLE², VLADIMIR PINHEIRO do NASCIMENTO²

RESUMO – Foram analisadas cinco amostras de vírus da Doença Infecciosa Bursal (DIB), isoladas de frangos de corte no Centro de Diagnóstico e Pesquisa em Patologia Aviária (CDPA) e quatro amostras de vírus vacinais utilizados em vacinas comerciais, quanto às suas características antigênicas e imunogênicas. Inoculou-se em cobaias, 10² DIE (Dose Infecciosa para embrião)/50 ml de uma suspensão de cada um dos vírus, replicados na membrana cório-alantóide de embrião de galinha (MCA). As amostras foram submetidas ao Sódium dodecyl sulfato – eletroforese gel de poliácridamida (SDS-PAGE), o perfil protéico de cada uma foi avaliado através do "western blotting" e cruzadas com todos os anti-soros induzidos por elas, chegando-se a conclusão de que as proteínas virais encontradas nos antígenos de campo e de vacina eram semelhantes, mostrando um padrão idêntico ao descrito na literatura para o sorotipo 1 do vírus da DIB, isto é, VP1 86 kDa, VPX 48 kDa, VP2 37 kDa, VP3 34 kDa e VP4 28 kDa. Assim sendo, chegou-se a conclusão de que os problemas da DIB no sul do Brasil se devem mais a doenças intercorrentes, programas de vacinação, título e tipo de vacinas utilizados, do que a cepas variantes do sorotipo 1 do vírus.

Palavras-chave: patologia aviária, avicultura, sanidade avícola, medicina de aves, doenças infecciosas, aves, doença infecciosa da bursa: relação antigênica e imunogênica, "western blotting".

ANTIGENIC AND IMMUNOGENIC RELATIONSHIP BETWEEN FIELD AND VACCINAL SAMPLES OF THE INFECTIOUS BURSAL DISEASE: A COMPARATIVE STUDY

ABSTRACT – Five samples of Infectious Bursal Disease (IBD) virus, isolated from broilers at the Center for Diagnostics and Research in Avian Pathology (CDPA) and four samples of commercially available vaccinal viruses were analyzed, regarding their antigenic and immunogenic characteristics. A suspension of 10² IDE/ 50 ml of each CAM- replicated virus was initially inoculated in guinea pigs. The samples were then subjected to the SDS-PAGE, and the protein profile of each one was evaluated, by means of a "western blotting" procedure. The samples (field and vaccinal) were crossed against all antiserum produced by the former, which allowed the reaching of the following conclusions: there is a similarity among the viral proteins found in the field samples, which are also identical to the standard described in the literature for IBD serotype 1, i.e. VP1 86 kDa, VPX 48 kDa, VP2 37 kDa, VP3 34 kDa, and VP4 28 kDa. It can also be concluded that IBD problem in the south of Brazil would be due, in a greater extent, to intercurrent diseases, vaccination programmes and vaccine type and titer used, rather than by variant strains of virus serotype 1.

Key words: avian pathology, poultry, poultry health, medicine, infectious diseases, birds, infectious bursal disease: antigenic and immunogenic relationship, western blotting.

INTRODUÇÃO

Estudando as propriedades biofísicas e bioquímicas, DOBOS (1979) caracterizou o vírus da DIB como um membro da família Birnaviridae, que inclui também alguns vírus de peixe, moluscos e de drosófila. Conforme MÜLLER et al. (1979), o vírus tem entre 55 e 65 nm de diâmetro, não é envelopado e é composto por um RNA de dupla hélice com um genoma bissegmentado, designados segmentos A e B. Estes segmentos codificam as proteínas estruturais do vírus que são denominadas de VP1, VPX, VP2, VP3 e VP4 de acordo com DOBOS (1979).

SALLE (1989), trabalhando com pintos de 1 dia de idade, com níveis de anticorpos maternos variáveis e provenientes de quatro empresas avícolas, observou que após a agressão com uma amostra clássica do sorotipo 1 do vírus da DIB (52/70), aos 14 e 21 dias, a proteção por anticorpos maternos, induzidos por vacinas produzidas com amostras virais também do sorotipo 1, variou entre 7% e 100%. O autor chegou à conclusão que investigar os programas de vacinação, os métodos de aplicação das vacinas, a cepa vacinal (suave, intermediária ou forte) e as doenças intercorrentes eram, naquele momento, mais importantes do que a procura de cepas variantes do vírus da Doença de Gumboro (DG).

1. Méd. Vet., M.Sc. – Centro de Diagnóstico e Pesquisa em Patologia Aviária – CDPA. Convênio Faculdade de Veterinária da UFRGS/CPVDF-FEPAGRO, Av. Bento Gonçalves 8824, 91540-000 Porto Alegre – RS/BRASIL.

2. Méd. Vet., Ph.D. – Centro de Diagnóstico e Pesquisa em Patologia Aviária – CDPA. Convênio Faculdade de Veterinária da UFRGS/CPVDF-FEPAGRO, Av. Bento Gonçalves 8824, 91540-000 Porto Alegre – RS/BRASIL.

Recebido para publicação em 25/11/1997.

Mesmo com o uso intensivo de vacinas contra a DIB em todos os países de avicultura industrial, o problema persiste. Baseados em testes *in vivo* ou em provas sorológicas, vários autores sugerem o aparecimento de cepas variantes do sorotipo 1 do vírus da DIB, para explicarem a não resolução do problema.

BECHT et al. (1988), comparando os sorotipos 1 e 2 do vírus da DIB, através de SDS-PAGE e "western blotting", concluíram que há diferença entre os polipeptídeos do segmento A do genoma do vírus, sendo o sorotipo 1 maior que o 2 em torno de 70 pares de bases. No segmento B a diferença é menos acentuada, mas significativa, chegando a 20 pares de bases. Entretanto, TURE e SAIF (1992), não conseguiram estabelecer diferença entre amostras clássicas e variantes do sorotipo 1 e uma amostra do sorotipo 2 do vírus da DIB, usando o teste de "western blotting" e ensaio imunoenzimático (ELISA), com anticorpos monoclonais e policlonais, na tentativa de relacionar antigenicamente estas amostras.

As diferenças entre as amostras clássicas e variantes do sorotipo 1 foram estudadas a nível de proteína viral por vários autores. Para melhor compreensão dos problemas existentes com as falhas de vacinação e na tentativa de se chegar as proteínas do vírus indutoras de proteção, vários experimentos foram realizados. FAHEY et al. (1991), produziram anticorpos monoclonais para caracterizar os epítomos envolvidos na neutralização do vírus da Infecção da Bolsa de Fabrício (IBF), e chegaram à conclusão de que somente os anticorpos monoclonais que reagiram com a proteína VP2, nas provas de "western" ou de imunoprecipitação, protegeram passivamente frangos jovens contra a infecção.

SCHNITZLER et al. (1993), determinaram, através da reação de polimerase em cadeia (PCR) e "western", que a proteína viral VP2 possui uma região central variável, a qual induz a formação de anticorpos neutralizantes. A troca de quatro aminoácidos desta região pode levar ao aparecimento de um novo sorotipo do vírus da IBF.

O objetivo do presente trabalho foi verificar se haviam diferenças antigênicas entre amostras de campo e de vacina do Vírus da Infecção da Bolsa de Fabrício (VIBF), através da prova de "Western Blotting", utilizando-se anticorpos policlonais induzidos por estas amostras.

MATERIAIS E MÉTODOS

Amostras de Campo – Foram selecionadas 05 (cinco) bolsas de Fabrício (BF), oriundas de frangos de corte vacinados e não vacinados contra a DG, que foram remetidos ao Centro de Diagnóstico e Pesquisa em Patologia Aviária (CDPA) e diagnosticados como Doença de Gumboro (DG). Estes materiais receberam a seguinte numeração: 13, 15, 16, 18 e 20.

Amostras Vacinais – Foram escolhidas 04 (quatro) vacinas comerciais contra a DG, disponíveis no mercado, que foram codificadas com os números 23, 25, 26 e 27. Todas as amostras foram propagadas em membrana cório-alantóide (MCA) de embriões livres de patógenos específicos (SPF), (VILLEGAS, 1981; LUKERT e SAIF, 1991) e tituladas conforme ROSENBERGER e CLOUD (1989), antes de serem inoculadas nos cobaios (Tabela 1). Os materiais utilizados para a inoculação nos cobaios foram inativados com 0,1% de beta propiolactona de acordo com JACKWOOD e SAIF (1987).

TABELA 1 – Título das amostras, campo e vacina, em MCA de embriões de galinha SPF

Amostra	Título* (DIE50/ml)
13	$1 \times 10^{2,5}$
15	$1 \times 10^{2,8}$
16	$1 \times 10^{2,0}$
18	$1 \times 10^{3,1}$
20	$1 \times 10^{2,0}$
23	$1 \times 10^{3,5}$
25	$1 \times 10^{3,7}$
26	$1 \times 10^{3,8}$
27	$1 \times 10^{3,5}$

* Título = maior diluição que expressou as lesões do vírus da DIB na MCA de embriões SPF.

Adjuvante – Foi utilizado o adjuvante completo de Freund (ACF), marca Sigma Co., misturado em partes iguais aos antígenos (Ag), JACKWOOD e SAIF (1982).

Soros Hiperimunes – Foram administrados 4 ml de inóculo (2 ml de Ag + 2 ml de ACF), intramuscular, em cada cobaio, e 4 ml intraperitoneal 04 (quatro) semanas depois. Os inóculos continham 10^2 Dose Infecçiosa para o Embrião/50 ml (DIE/50ml) de vírus em cada amostra, sendo utilizados 05 (cinco) cobaios por antígeno. Uma semana após a última inoculação, os animais foram sangrados e os soros guardados de acordo com JACKWOOD e SAIF (1982).

SDS-Page – As proteínas estruturais das amostras foram separadas em gel de "corrida" 12,5%, e gel "stacking" 3,5%, usando um sistema SDS-PAGE conforme LAEMMLI (1970), modificado.

"Western Blot" – As proteínas estruturais dos antígenos, separadas pelo SDS-PAGE, foram examinadas pela técnica de "Western blotting", descrita por BURNETTE (1981). Após a transferência das amostras para as membranas de nitrocelulose, estas foram cortadas em tiras e incubadas com os anti-soros, pro-

venientes de animais inoculados com as amostras de campo e vacina, diluídos a 1/100. A ligação dos anticorpos foi identificada com um soro antiimunoglobulina de coelho conjugado com peroxidase, marca Sigma Co., diluído a 1/2000 e incubado durante 2 horas a temperatura ambiente. A revelação da reação foi feita com diaminobenzidina e interrompida com a lavagem das tiras em água destilada.

Determinação do peso molecular – Os pesos moleculares, das proteínas separadas eletroforéticamente, foram determinados utilizando-se a equação

da reta, onde os pesos são calculados por aproximação tendo como base os padrões utilizados.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

1- Resultados eletroforéticos das amostras de campo e vacina, e da amostra padrão do VIBF em SDS-PAGE

Os resultados da corrida em gel de poliacrilamida das amostras de campo e de vacina do presente trabalho, da amostra padrão do sorotipo 1 do vírus da IBF e do marcador de peso molecular, são mostrados na Figura 1.

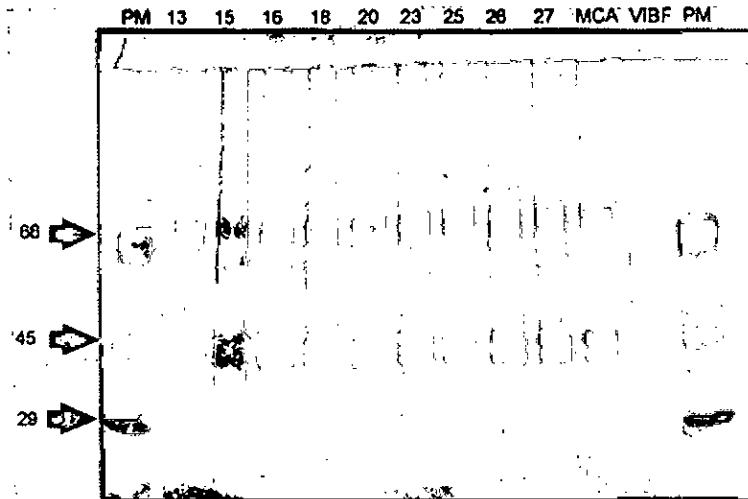


FIGURA 1 – SDS-PAGE das amostras de vírus de campo e de vacina, da mca e do VIBF

2 – Resultados da transferência das reações antígeno/anticorpos para a membrana de nitrocelulose "WESTERN BLOTTING".

Na Figura 2, está o resultado da prova onde se utilizou como antígeno uma amostra purificada de vírus da Doença Infecciosa Bursal (VDIB), do

sorotipo 1, obtida junto ao Central Veterinary Laboratory, Reino Unido, e como anticorpo os antiseros induzidos pelas amostras de campo e vacina. Foram caracterizados os antígenos com pesos moleculares de 100 kDa, 73 kDa, 69 kDa, 63 kDa, 57 kDa, 48 Kda, 30 kDa e 24 kDa.

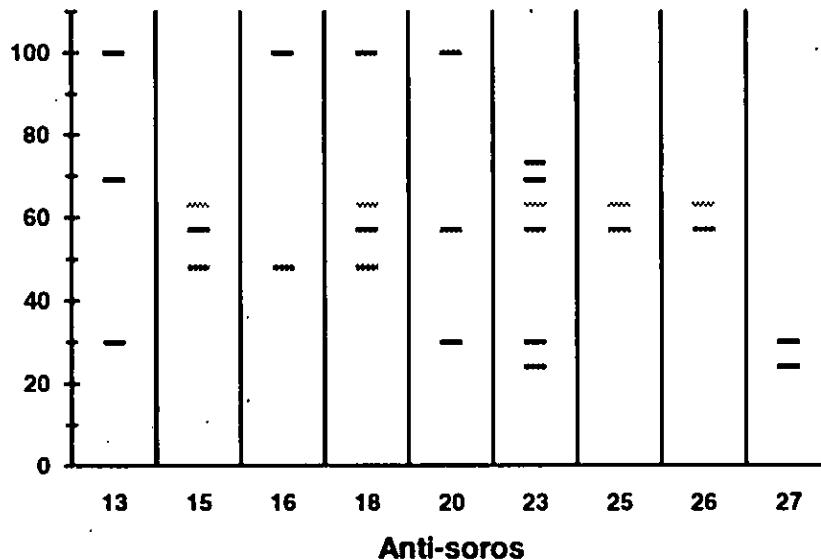


FIGURA 2 – Western blot: padrão de reconhecimento das proteínas do VDIB

Na análise das amostras de campo e vacina do presente trabalho, com os anti-soros produzidos contra elas, mostrado nas Figuras 3 a 11, vári-

as bandas foram reveladas em cada soro, com um alto grau de reatividade cruzada entre todas as amostras.

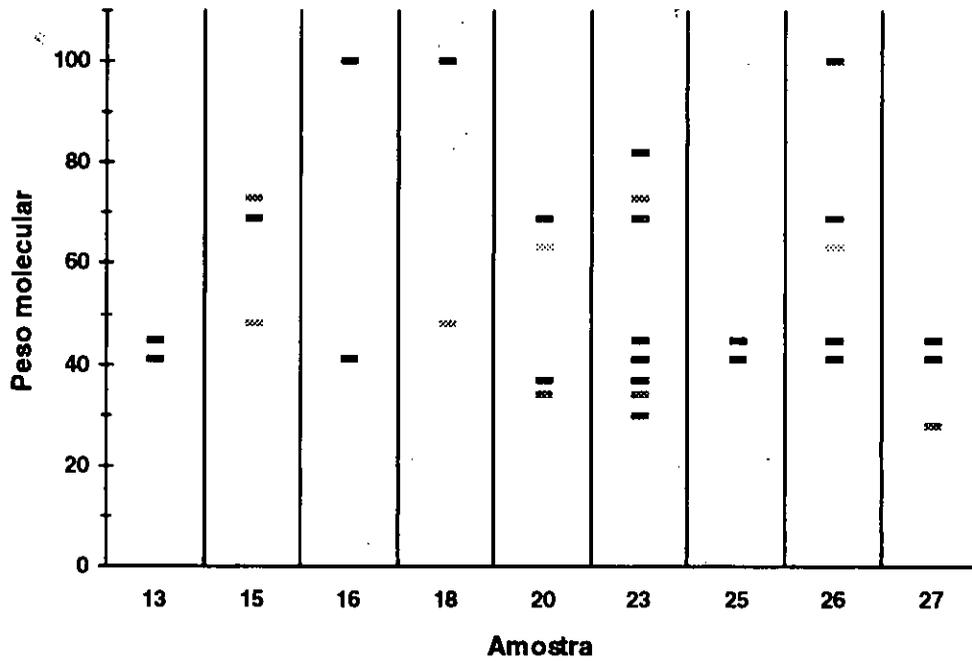


FIGURA 3 – Western blot: padrão de reconhecimento do soro anti-13

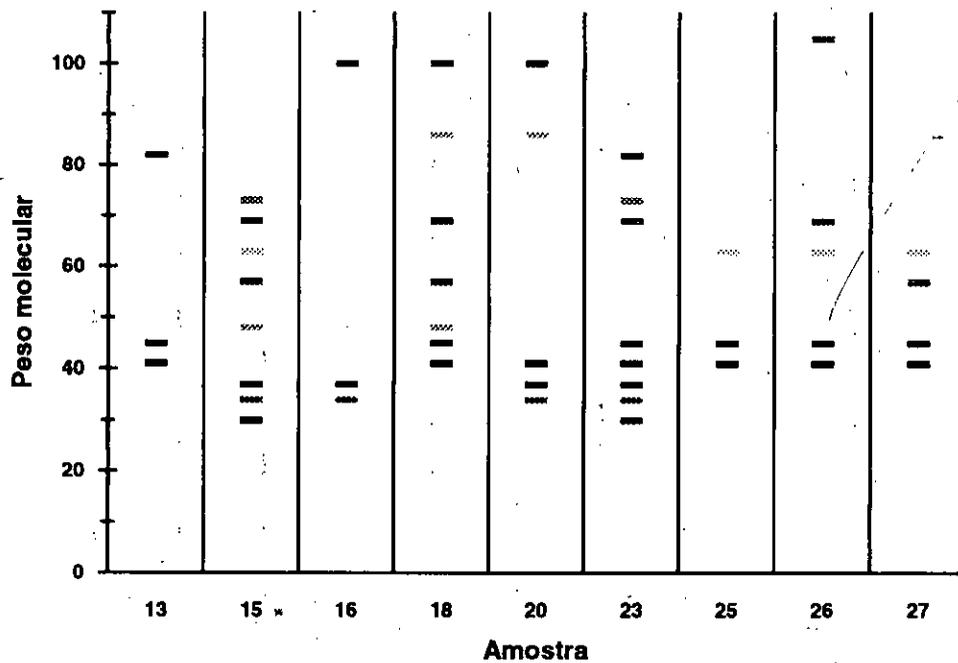


FIGURA 4 – Western blot: padrão de reconhecimento do soro anti-15

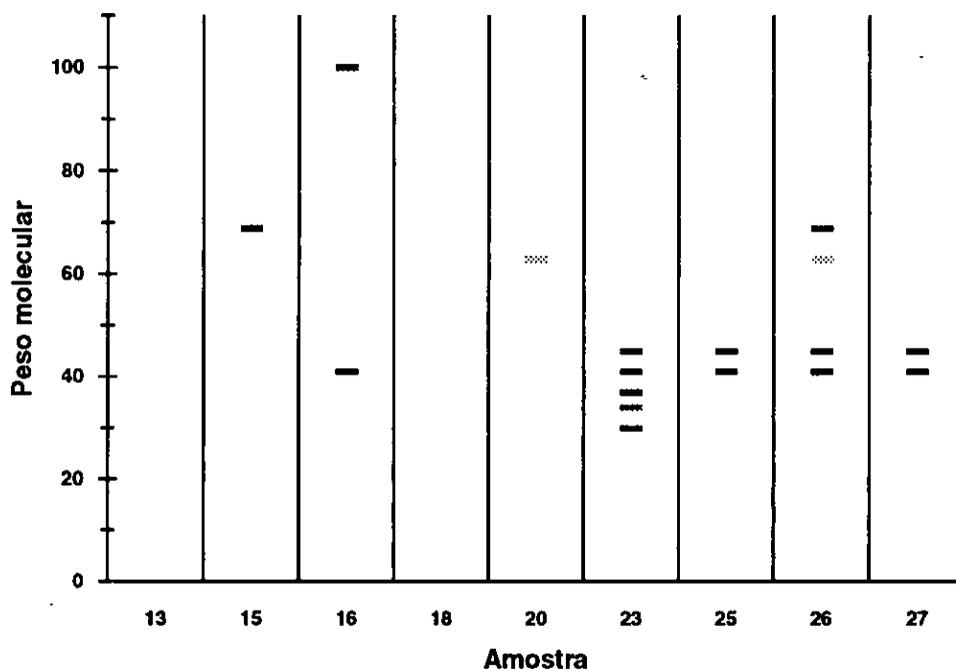


FIGURA 5 – Western blot: padrão de reconhecimento do soro anti-16

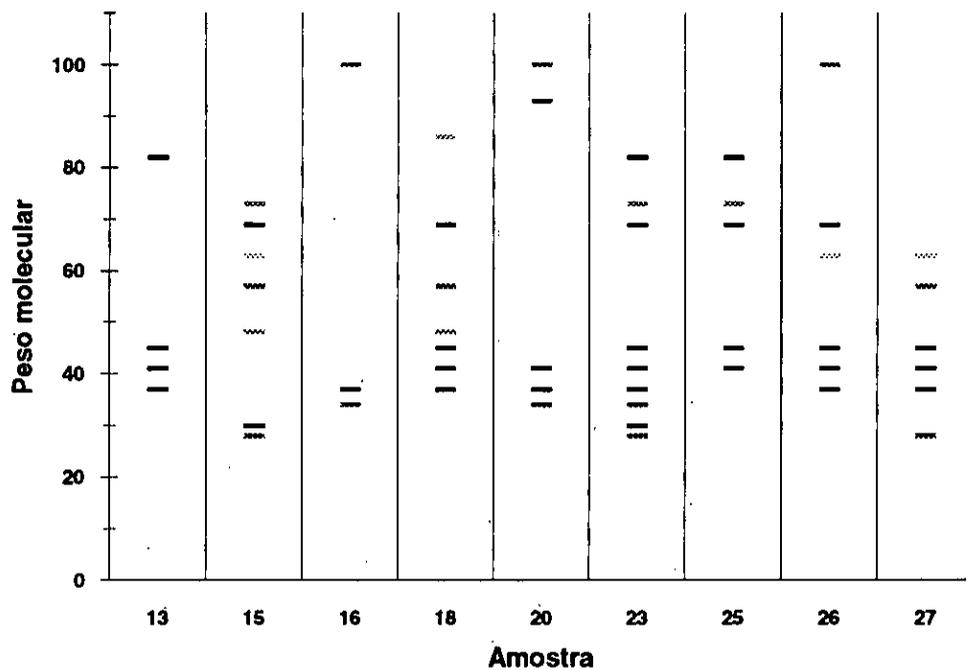


FIGURA 6 – Western blot: padrão de reconhecimento do soro anti-18

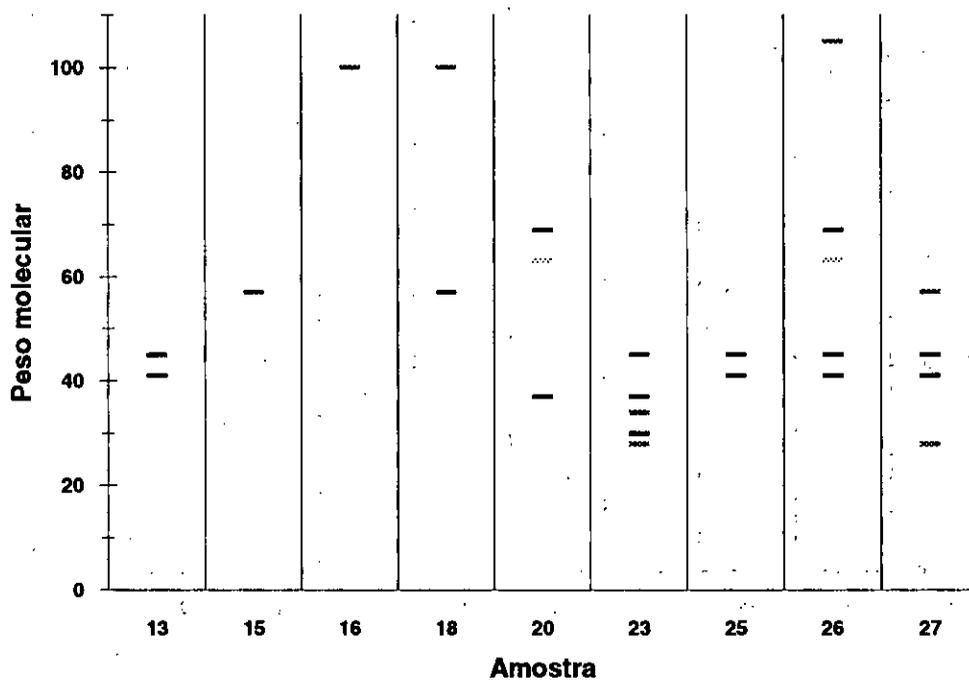


FIGURA 7 – Western blot: padrão de reconhecimento do soro anti-20

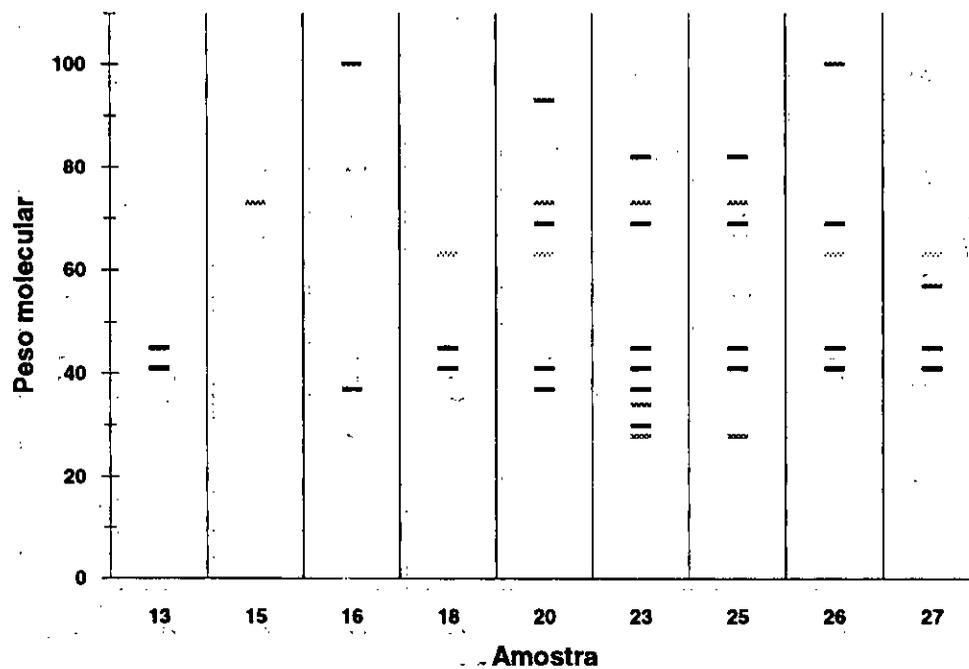


FIGURA 8 – Western blot: padrão de reconhecimento do soro anti-23

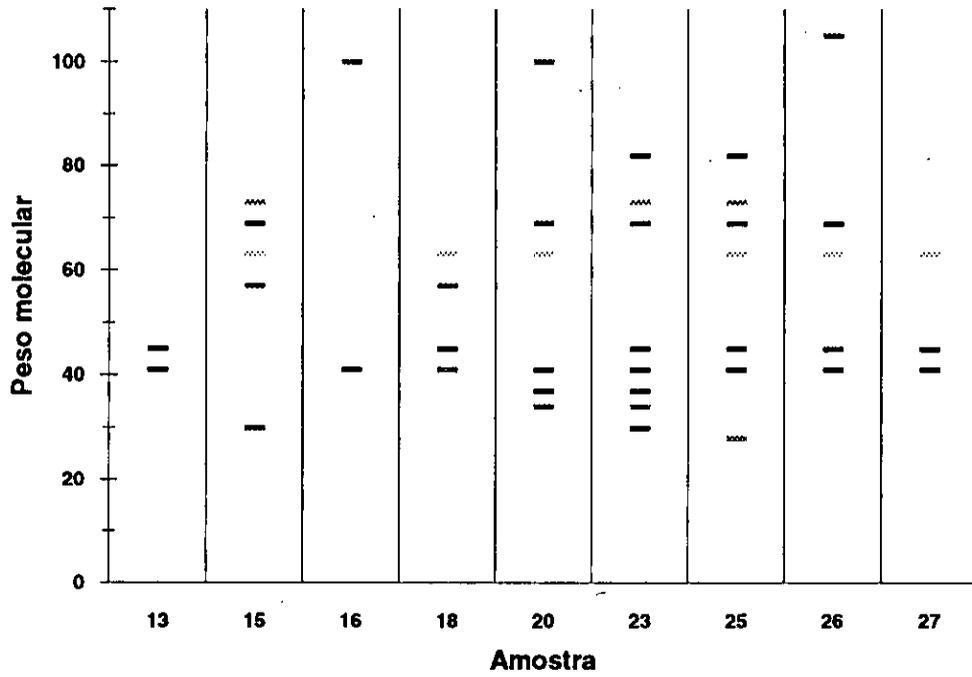


FIGURA 9 – Western blot: padrão de reconhecimento do soro anti-25

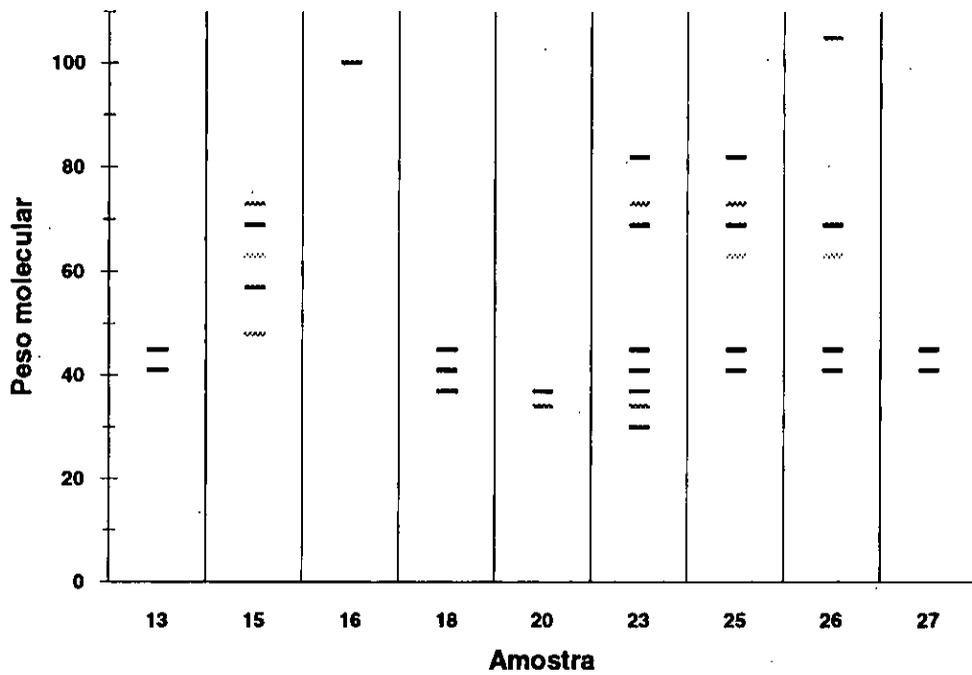


FIGURA 10 – Western blot: padrão de reconhecimento do soro anti-26

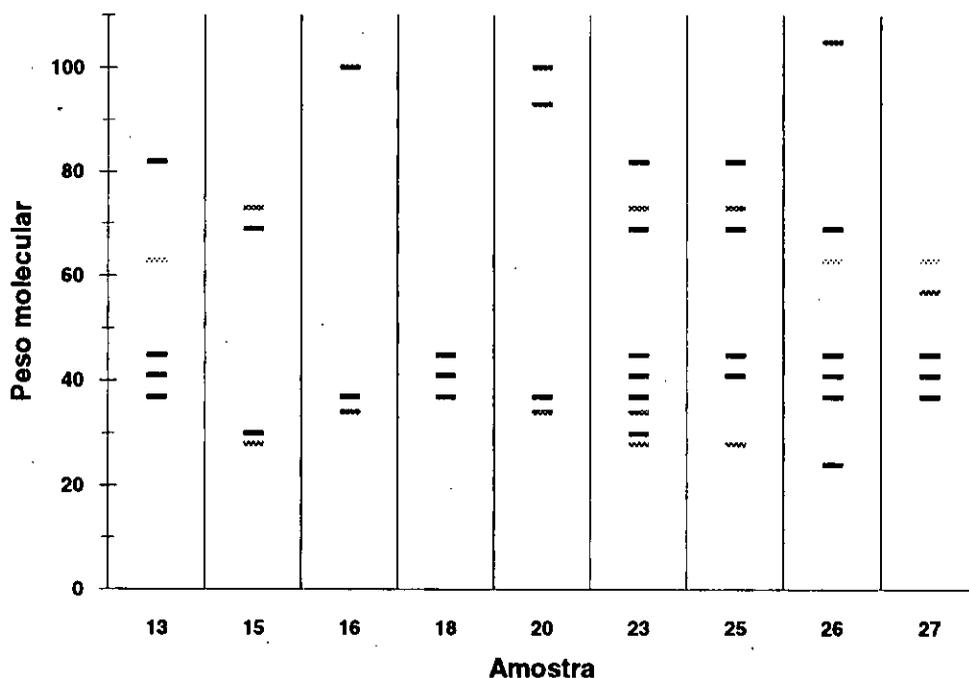


FIGURA 11 – Western blot: padrão de reconhecimento do soro anti-27

Na Tabela 2, estão representados os pesos moleculares das bandas que foram caracterizadas na prova de “western”, das amostras de campo. Verifica-se que os pesos moleculares encontrados para a VP1 são de 100 kDa, 93 kDa, 86 kDa, 73 kDa e 69 kDa. Já, nas proteínas VPX, VP2, VP3 e VP4, houve uma constância, aparecendo valores de 48 kDa, 37 kDa, 34 kDa e 28 kDa. Algumas bandas não foram detectadas nas amostras 13, 16, 18 e 20. A Tabela 3 mostra os pesos moleculares das bandas encontradas

nas amostras de vacinas, onde se verifica um perfil semelhante ao das amostras de campo, com diferenças apenas na VP1, onde os pesos moleculares encontrados são de 73 kDa, 69 kDa e 63 kDa e na VP4 da amostra 26, onde aparece um peso de 24 kDa. As demais proteínas são identificadas com os mesmos pesos moleculares encontrados nas amostras de campo. Nas Figuras de 3 a 11 aparecem, ainda, bandas com peso molecular de 57 kDa, que poderia ser um polipeptídeo precursor das VP2, VP3 e VP4.

TABELA 2 – Pesos moleculares das bandas de Proteínas Virais (VP) nas amostras de campo, determinadas por “Western Blotting”

Proteína viral	13	15	16	18	20
VP1	NA*	73/69**	100	100/86	100/93
VPX	NA	48	NA	48	NA
VP2	37	37	37	37	37
VP3	NA	34	34	NA	34
VP4	NA	28	NA	NA	NA

* Não apareceram bandas com este peso molecular

** Valores em kDa

TABELA 3 – Pesos moleculares das bandas de Proteínas Virais (VP) nas amostras de vacinas, determinadas por "Western Blotting"

Proteína Viral	23	25	26	27
VP1	73/69**	73/69	69	63
VPX	NA*	NA	NA	NA
VP2	37	NA	37	37
VP3	34	NA	NA	NA
VP4	28	28	24	28

* Não apareceram bandas com este peso molecular ** Valores em kDa

DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

A análise de cepas variantes do sorotipo 1 do VIBF tem se tornado mais importante nos últimos anos, devido ao aumento dos prejuízos econômicos causados por surtos da doença de Gumboro, em lotes de frangos vacinados com vacinas produzidas com a amostra clássica do sorotipo 1 do VIBF. Vários estudos têm sido realizados com este objetivo, empregando diferentes técnicas. Assim, JACKWOOD et al. (1985), utilizando a prova de vírus-neutralização, chegaram à conclusão de que 6 das 13 cepas analisadas no trabalho eram subtipos do sorotipo 1. Em 1988, BECHT et al. relataram diferenças estruturais na proteína viral VP2 entre os sorotipos 1 e 2 do vírus da DG.

Vários autores têm descrito o perfil das proteínas virais (VP) no sorotipo 1 do vírus da IBF, encontrando pesos moleculares diferentes para cada uma das quatro VP. DOBOS (1979), trabalhando com amostras purificadas do vírus da IBF encontrou as seguintes proteínas virais com seus respectivos pesos moleculares: VP1 (90 kDa), VP2 (41 kDa), VP3 (35 kDa), VP4 (28 kDa) e VPX (47 kDa). BECHT (1980), trabalhando com amostras de vírus altamente purificadas, encontrou pesos moleculares de 86 kDa (VP1), 48 kDa (VPX), 40 kDa (VP2), 32 kDa (VP3) e 28 kDa (VP4). A proteína viral 1 não foi plenamente identificada no "western" do sorotipo 1, com o peso molecular referido no trabalho de TODD e MCNULTY (1979), que encontraram valores de 97, 56 e 53 kDa, diferindo dos aqui encontrados, que foram 100, 73, 69, 63 e 57 kDa. Entretanto, nas provas com as amostras de campo e de vacina do presente experimento, aparece uma banda, com peso molecular de 86 kDa, que é referida no trabalho de BECHT (1980) como sendo a proteína viral VP1.

No experimento, foi encontrada uma proteína com peso molecular de 48 kDa, o que está de acordo com os resultados de TODD e MCNULTY (1979) e de BECHT (1980), e muito próximo do relatado por DOBOS (1979), que designou de VPX a proteína viral precursora da VP2, com peso molecular de 47 kDa. A proteína denominada de VP2, principal indutora de proteção ao hospedeiro

conforme AZAD et al. (1987) e BECHT et al. (1988), é descrita por vários autores com pesos moleculares entre 37 e 42 kDa. FAHEY et al. (1985) relacionaram o peso molecular de 37 kDa com a VP2. Já MÜLLER e BECHT (1982) encontraram para a mesma proteína um peso de 40 kDa. DOBOS (1979), comparando as proteínas do vírus da Infecção da Bolsa de Fabrício, relatou que a VP2 tinha um peso molecular de 41 kDa. JACKWOOD et al. (1985) diferiram dos outros autores, encontrando um peso molecular de 42 kDa para a proteína VP2. Nenhum dos pesos moleculares relatados acima apareceu no "western" da amostra padrão do presente experimento. No entanto, quando se analisam os "western" das Figuras 4 a 12, aparece uma banda com 37 kDa, concordando com o trabalho de FAHEY et al. (1985). O registro de um peso molecular de 30 kDa indicou a presença da proteína viral VP3, que é o mesmo encontrado por TODD e MCNULTY (1979), para esta proteína. A VP3 forma junto com a VP2, a quase totalidade do virion do vírus da doença de Gumboro, conforme trabalho de DOBOS (1979).

Quando as bandas são analisadas na Tabela 3, observa-se que os números encontrados são identificáveis com as proteínas virais relatadas por vários pesquisadores, conforme revisão feita por KIBENGE et al. (1988). Nas bandas detectadas nas amostras de campo verifica-se que a VP2, que é o polipeptídeo que contém o sítio responsável pela indução de anticorpos neutralizantes contra o vírus da DIB (AZAD et al., 1987; BECHT et al., 1988) aparece em todas as amostras de campo com um peso molecular de 37 kDa, o mesmo valor referido por FAHEY et al. (1985). A VPX foi caracterizada apenas nas amostras 15 e 18 com um peso de 48 kDa, o mesmo que é relatado por MÜLLER e BECHT (1982). Nas amostras 13, 16 e 20 não foi detectada nenhuma banda com este peso molecular. Para a VP1 foram encontradas bandas com peso de 100 kDa, 93 kDa, 86 kDa, 73 kDa e 69 kDa, confundindo a sua identificação, mas dentro dos padrões de variação apresentados no trabalho de KIBENGE et al. (1988) onde a VP1 oscilou entre os valores de 51 kDa e 95 kDa. Apenas na amostra 18 aparece o peso de 86 kDa, relatado

por BECHT (1980) como sendo da VP1. A VP3, nas amostras 15, 16 e 20 apresentou peso molecular de 34 kDa, igual ao relatado por DOBOS (1979) e JACKWOOD et al. (1985). Na amostra 18 foi encontrada uma banda com peso de 28 kDa, o que caracteriza a VP4, de acordo com o trabalho de MÜLLER e BECHT (1982). Nas demais amostras esta banda não foi caracterizada. Quando se observa a Tabela 4, fica claro que o perfil das proteínas virais das amostras vacinais é semelhante ao das amostras de campo. Deve ser chamada a atenção principalmente para a proteína VP2, na qual se concentram as diferenças genéticas existentes entre variantes do sorotipo 1 da DIB (HUDSON et al., 1986). Esta banda aparece com um peso molecular de 37 kDa em todas as amostras, com exceção da amostra 25 que não revelou bandas nesta posição. A única proteína viral que não aparece em nenhuma amostra vacinal é a denominada de VPX (48 kDa). Nestas amostras a VP1 aparece com peso molecular de 73 kDa e 69 kDa, diferindo dos encontrados nas amostras de campo. A VP3 foi determinada apenas na amostra 23, com peso de 34 kDa. Já a VP4 aparece nas amostras 23, 25 e 27 com peso de 28 kDa e foi encontrada na amostra 26 com peso molecular de 24 kDa que é referido por TODD e MCNULTY (1979) também como sendo da VP4.

A análise das Figuras de 3 a 11, observa-se uma banda de 57 kDa que, conforme sugerido por HUDSON et al. (1986), pode ser um polipeptídeo precursor das proteínas VP2, VP3 e VP4. As diferenças nos pesos moleculares estimados podem ser devidas à metodologia empregada no experimento, de acordo com o trabalho de KIBENGE et al. (1988). Outra possível razão para estas variações pode ser a diferença na clivagem dos sítios das proteínas precursoras, quando diferentes sistemas são empregados na replicação viral. Assim, LANGE et al. (1987) e MÜLLER e BECHT (1982), relatam diferenças quando o vírus da DIB é replicado em cultura de tecidos ou diretamente na bolsa de Fabricio.

Os resultados obtidos no presente trabalho reforçam a opinião de SALLE (1989) que, ao avaliar a proteção conferida à progênie de matrizes vacinadas, constatou deficiências que atribuiu a falhas no programa de vacinação utilizado pelas empresas, bem como a existência de enfermidades intercorrentes. CHANG e HAMILTON (1982) estudaram a interação do vírus da DIB com a aflatoxina e concluíram que essa última aumentava significativamente a letalidade do vírus. A importância das conclusões acima referidas fica ainda maior ao se acrescentarem os dados de SALLE e WENDELSTEIN (1992) nos quais fica registrado que no período de 1985 a 1991, 15 a 29% das doenças diagnosticadas no sul do Brasil, eram de aflatoxicose.

Apesar do trabalho de LUNGE et al. (1997), ter caracterizado, com restrição enzimática (PCR) da proteína viral VP2, diferentes amostras do vírus da DIB no

campo, os resultados do presente experimento mostraram que as amostras trabalhadas de vírus da DIB, tanto de campo, quanto de vacina, diferentes das amostras trabalhadas por estes autores, não apresentaram variações antigênicas, quando se utilizou as provas de SDS-PAGE e "Western blotting". Com estes dados pode-se concluir, também, concordando com o trabalho de SALLE (1989), que as vacinas parecem ter condições de imunizar satisfatoriamente os animais e que os casos de DIB, nesta região do Brasil, devam-se mais a falhas nos programas de vacinação, título e tipo das vacinas utilizadas, e a doenças intercorrentes, do que a variações na estrutura antigênica do vírus de campo.

BIBLIOGRAFIA CITADA

- AZAD, A.A.; JAGADISH, M.N.; BROWN, M.A.; HUDSON, P.J. Deletion mapping and expression in *Escherichia coli* of the large genomic segment of a birnavirus. *Virology*, v. 161, p. 145-152, 1987.
- BECHT, H. Infectious bursal disease virus. *Current topics in microbiology and immunology*, v. 90, p.107- 121, 1980.
- BECHT, H.; MÜLLER, H.; MÜLLER, H. K. Comparative studies on structural and antigenic properties of two serotypes of infectious bursal disease virus. *Journal General Virology*, London, v. 69, p. 631-640, 1988.
- BURNETTE, W. N. "Western Blotting": eletroforetic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate polyacrilamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Analytical Biochemistry*, v. 112, p. 195-203, 1981.
- CHANG, C. F.; HAMILTON, P.B. Increased severity and new symptoms of infectious bursal disease during aflatoxicosis in broiler chickens. *Poultry Science*, v. 61, p. 1061-1068, 1982.
- DOBOS, P. Peptide map comparison of the proteins of infectious bursal disease virus. *Journal of Virology*, v. 32, n. 3, p. 1046-1050, 1979.
- FAHEY, K.; McWATERS, P.; BROWN, M.A.; MURPHY, V.J.; HEWISH, R. Virus - neutralizing and passively protective monoclonal antibodies to infectious bursal disease virus of chickens. *Avian Diseases*, Kennett Square, v. 35, p. 365-373, 1991.
- FAHEY, K.; O'DONNELL, I. J.; AZAD, A. A. Characterization by western blotting of the immunogens of infectious bursal disease virus. *Journal of General Virology*, London, v. 66, p. 1479 - 1488, 1985.
- HUDSON, P. J.; MCKERN, N. M.; POWER, B. E.; AZAD, A. A. Genomic structure of the large RNA segment of infectious bursal disease virus. *Nucleic Acids Research*, v. 14, p. 5001-5012, 1986.
- JACKWOOD, D. J.; SAIF, Y. M. Characteristics and serologic studies of infectious bursal disease virus in turkeys. *Avian Diseases*, Kennet Square, v. 26, n. 4, p. 871-872, 1982.
- JACKWOOD, D. J.; SAIF, Y. M. Diversity of infectious bursal disease viruses. *Avian Diseases*, Kennett Square, v. 31, n. 4, p. 766-770, 1987.

- JACKWOOD, D. J.; SAIF, Y. M.; MOORDHEAD, P. D. Immunogenicity and antigenicity of infectious bursal disease virus serotypes and II in chickens. *Avian Diseases*, Kennett Square, v. 29, n. 4, p. 1184-1194, 1985.
- KIBENGE, F. S. B.; DHILLON, A. S.; RUSSEL, R. G. Biochemistry and immunology of infectious bursal disease virus. *Journal General Virology*, London, v. 69, p. 1757-1775, 1988.
- LAEMMLI, V. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, London, v. 227, p. 680-685, 1970.
- LANGE, H.; MÜLLER, H.; KAEUFER, I.; BECHT, H. Pathogenic and structural properties of wild type infectious bursal disease virus (IBDV) and virus grown in vitro. *Archives of Virology*, v. 92, p. 187-196, 1987.
- LUKERT, P. D.; SAIF, Y. M. Infectious bursal disease. In: CALNEK, B. W.; BARNES, J. H.; BEARD, C. W.; REID, W. M.; YODER Jr. H. W. (Eds.) *Diseases of Poultry*. Ames: Iowa State University Press, 1991, p. 648-663.
- LUNGE, V. R.; FONSECA A. S. R.; VERDI FILHO, R.; OLIVEIRA, C.; CHIARAMONTE, V. e IKUTA, N. Caracterização de genótipos de campo do vírus da doença de gumboro (IBDV) no Brasil. In: *Anais da Conferência APINCO 97 de Ciência e Tecnologia Avícolas*. São Paulo: APINCO, 1997, p.32.
- MÜLLER, H.; SCHOLTISSEK, C.; BECHT, H. The genome of infectious bursal disease virus consists of two segments of double-stranded RNA. *Journal Virology*, v. 31, p. 584-589, 1979.
- MÜLLER, H.; BECHT, H. Biosynthesis of virus specific proteins in cells infected with infectious bursal disease virus and their significance as structural elements for infectious virus and incomplete particles. *Journal Virology*, v. 44, p. 384-392, 1982.
- ROSEMBERGER, J.K.; CLOUD, J. The effects of age, route of exposure, and coinfection with infectious bursal disease virus on the pathogenicity and transmissibility of chicken anemia agent (CAA). *Avian Diseases*, Kennett Square, v.33, p. 753-759, 1989.
- SALLE, C.T.P. Importância dos anticorpos maternos na doença de gumboro. *Avicultura e Suinocultura Industrial*, São Paulo, n.957, p.112-114, 1989.
- SALLE, C. T. P.; WENDELSTEIN, A. C. Situação da aflatoxicose no sul do Brasil. In: *CICLO DE CONFERÊNCIAS DA ASSOCIAÇÃO DOS MÉDICOS VETERINÁRIOS ESPECIALISTAS EM AVICULTURA*, 3., 1992, Porto Alegre. *Anais...* Porto Alegre, 1992. p. 43.
- 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*, London, v. 74, p. 1563-1571, 1993.
- TODD, D.; McNULTY, M. S. Biochemical studies with infectious bursal disease virus: comparison of some of its properties with infectious pancreatic necrosis virus. *Archives of Virology*, v. 60, p. 265-277, 1979.
- TURE, O.; SAIF, Y.M. Structural proteins of classic and variant strains of infectious bursal disease viruses. *Avian Diseases*, Kennett Square, v. 36, n. 4, p. 829-836, 1992.
- VILLEGAS, P. *Laboratory manual: avian virus diseases*. 2. ed. Athens: College of Veterinary Medicine, University of Georgia, 1981. p. 28-29.