

PATOGENIA DA INFECÇÃO EXPERIMENTAL COM A ESTIRPE VIRULENTE DO VÍRUS DE GUMBORO: ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA, IMUNOHISTOQUÍMICA E VIROLÓGICA EM AVESTRUZES JOVENS (*Struthio camelus*).

Analy Ramos Mendes, Tereza Cristina Cardoso, Heitor Flávio Ferrari, Maria Cecília Rui Luvizotto, Manoel Garcia Neto. – Ciências da Vida – Curso de Medicina Veterinária – Departamento de Apoio, Produção e Saúde Animal – Laboratório de Virologia – Campus de Araçatuba.

O avestruz (*Struthio camelus*) é uma espécie comercial melhorada que se originou na África e tem aumentado em popularidade nos últimos anos, caracterizada por pequenas operações, consistindo de apenas alguns pares de criação para operações mais intensivas em larga escala (El-Attrache *et al.*, 2001). As ratitas são susceptíveis a doenças severas de aves domésticas, incluindo a Influenza Aviária (IA), e por essa razão, em 1997, a People's Republic of China postou um embargo na importação de aves domésticas processadas nos Estados Unidos pois alguns rebanhos do Texas apresentaram anticorpos para IA (Clavijo *et al.*, 2003).

No Brasil as operações em larga escala são principalmente de produção de carne e produtos de couro. Em decorrência da utilização de métodos mais intensivos de criação pelos produtores, houve um aumento na preocupação sanitária, havendo um aumento nas práticas de medicina veterinária preventiva tal como monitoramento de doenças e vigilância sanitária. Embora a produção comercial de avestruzes seja comum, pouca pesquisa foi empreendida sobre a ocorrência de vírus patogênicos, os quais geralmente infectam rebanhos comerciais.

A Doença Infecciosa da Bursa (DIB) ou Doença de Gumboro é uma doença viral aguda, altamente contagiosa que causa perdas econômicas no Brasil. O vírus da DIB (VDIB) pertence ao gênero *Avibirnavirus* e é considerado o causador de uma importante e aguda doença contagiosa da indústria de aves domésticas e se espalhou mundialmente. Em geral, o VDIB, cujo genoma consiste de dupla fita de RNA (segmento A e B), tem ativamente dividido linfócitos B como células alvo para sua replicação. A doença de Gumboro consiste em uma virose que acomete aves jovens, tendo como principal característica uma quase total destruição dos centros foliculares linfóides e, da mesma forma, lesionando vários outros órgãos como timo, baço e fígado, embora em menor intensidade. O objetivo desse estudo foi avaliar a susceptibilidade de avestruzes jovens à infecção à estirpe virulenta do VDIB analisando os resultados histopatológicos, imunohistoquímicos e virológicos, nunca descritos anteriormente.

O vVDIB utilizado foi a estirpe Faragher 52/70 gentilmente fornecidos pelos Laboratórios Merial (Campinas, SP Brasil) propagados em pintinhos de um dia de idade. O vVDIB foi adaptado em nosso laboratório para infectar embriões de galinha livres de patógenos específicos (SPF) e a respectiva titulação utilizada foi $10^{2.6}$ DIE₅₀/ml.

Os avestruzes de 4 semanas de idade foram obtidos do Centro Experimental de Pesquisa com Avestruz (CEPA) da Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, Brasil. Após um exame externo, as respectivas aves foram colocadas abaixo de pressão positiva durante 24 h antes da infecção e amostras de sangue foram colhidas. Um total de oito aves foi usado, dividido em pares para evitar o estresse. As aves receberam 2 ml de vVDIB ($10^{2.6}$ DIE₅₀/ml) pela via oral. Como controle negativo, aves (n=4) provenientes do CEPA foram utilizados, colocadas abaixo de pressão positiva no mesmo momento e submetidas aos mesmos procedimentos como feito com as aves infectadas (Rodriguez-Chavez *et al.*, 2002a, b e c).

Após 48h de infecção, as aves foram eutanaziadas, o sangue foi coletado e realizou-se a necropsia. Bursa, timo, baço e fígado, a partir das aves infectadas e não infectadas, foram fixados em formalina neutra tamponada a 10% e processadas em parafina. Todas as seções foram submetidas a examinação histológica e a análise baseada em trabalhos anteriores (Tanimura *et al.*, 1995; Cardoso *et al.*, 1998).

O DAS-ELISA foi realizado como descrito por Cardoso *et al.*, (1998). Os VDIB foram titulados em embriões de galinha (SPF) de 10 dias de idade e os títulos obtidos pela dose média infectante de embriões (EID₅₀/ml). Os títulos foram interpretados pelo DAS-ELISA já descrito.

A respectiva suspensão da bursa, timo, fígado e baço foram submetidos primariamente a uma digestão proteolítica e a extração de RNA foi realizada utilizando-se o protocolo do Trizol®. O RNA foi amplificado por RT-PCR utilizando-se o One Step RNA PCR Kit (Invitrogen, Life Technologies) de acordo com informações do fabricante. A visualização dos produtos amplificados foi realizada por meio de eletroforese em gel de agarose a 1,5% com brometo de etídio (0.5µg/ml).

Para análise histopatológica os tecidos fixados em parafina foram cortados em micrótomo (4-6 µm) e as lâminas preparadas foram coradas com hematoxilina e eosina (HE) e a análise das lesões microscópicas foram comparadas com os tecidos não infectados. Lâminas não coradas foram utilizadas para análise imunohistoquímica começando-se por desparafinização com xilól e hidratação com soluções decrescentes de álcool e água. As lâminas passaram por recuperação antigênica em Tampão citrato pH 6.0 e por bloqueio da peroxidase endógena com peróxido de hidrogênio e metanol. As ligações inespecíficas foram bloqueadas com leite em pó desnatado a 20%. Após lavagem em PBS Tween 20, foi realizada incubação em câmara úmida over-night à 4°C com o anticorpo policlonal produzido em coelhos (Cardoso *et al.*, 1998). Após, foram realizadas novas lavagens e as lâminas foram cobertas com o anticorpo secundário (IgG anti-galinha + peroxidase) em câmara úmida por uma hora à temperatura ambiente. Finalmente, houve a revelação com o substrato cromógeno DAB diluído em Tris-HCl adicionado de peróxido de hidrogênio. As lâminas foram contra-coradas com Hematoxilina de Harris, desidratadas em soluções crescentes de álcoois e xilol e montadas. Os tecidos das aves não infectadas serviram como controle negativo.

Os principais sinais clínicos foram depressão, penas arrepiadas, prostração, diarreia, cabeça pendente, posição agachada e morte que começou a ocorrer após 18 horas da infecção. A macroscopia após necropsia revelou desidratação e intensa necrose do abdome. Na microscopia as Bursas de Fabricius mostraram necrose multifocal, atrofia e depleção dos folículos linfóides. Fígado e timo apresentaram intensa infiltração por células mononucleares (principalmente linfócitos) e necrose.

O ensaio em DAS-ELISA para detecção de antígenos em bursa, timo, baço, fígado, SNC e rim mostrou-se positivo para cada órgão respectivo. O RNA do vVDIB foi detectado em todos os órgãos analisados e os respectivos títulos foram calculados. Bursa e timo foram os órgãos onde os maiores títulos foram achados, comparando-se com fígado e baço. Na imunohistoquímica, o antígeno foi detectado no citoplasma de células infectadas na bursa e no timo com grande intensidade. O antígeno também foi invariavelmente encontrado no fígado e baço, principalmente na periferia de pequenos vasos. Por outro lado, o antígeno viral foi detectado no SNC e no rim o que nunca havia sido descrito anteriormente. Não foram detectados antígenos virais em nenhum órgão dos animais controle não infectados.

O primeiro surto de uma nova forma similar ao VDIB muito virulento foi observado em 1997 em rebanhos brasileiros (Di Fabio *et al.*, 1999). A doença se espalhou e no fim de 1999 mais de 200 fazendas encontravam-se contaminadas. Nos dias de hoje, em face ao aumento na produção de ratitas, estudos são necessários para estabelecer programas sanitários para o controle da doença. Neste estudo, após a infecção experimental com a estirpe virulenta do vírus da doença de Gumboro, os respectivos resultados, particularmente os sinais clínicos foram similares àqueles relatados por Di Fabio *et al.* (1999) para a estirpe muito virulenta do vírus. Para todas as análises virológicas aqui realizadas, foi possível confirmar a presença do vVDIB em tecidos das aves infectadas.

Considerando-se estes achados, os sinais clínicos e a análise virológica certamente indicam que o vVDIB pode replicar em avestruzes jovens. Longe do que os autores sabem, o vVDIB está presente nos dias atuais na América do Sul, pelo menos no Brasil. Pesquisas e relatos adicionais serão necessários para estabelecer um programa sanitário nacional apropriado para as novas criações de aves domésticas a fim de proteger a disseminação da doença no país comprometendo a produção de aves.

Referências Bibliográficas

- Cardoso, T. C., Sousa, R.L.M., Alessi, A.C., Montassier, H.J., Pinto, A.A. 1998. A double antibody sandwich ELISA for rapid diagnosis of virus infection and to measure the humoral response against infectious bursal disease on clinical material. *Avian Pathology* 27:450-454.
- Clavijo, A., Riva J., Pasick, J. 2003. Pathogenicity of a ratite-origin influenza A H5 virus in Ostriches (*Struthio camelus*). *Avian Diseases* 47:1203-7.
- Di Fabio, J., Rossini, L.I., Etteradossi, N., Toquin, N., Gardin, Y. 1999. European-like pathogenic infectious bursal disease viruses in Brazil. *Veterinary Record* 145:203-204.
- El-Attrache, J., Vilegas, P., O'Connor, B., Buhr, J.R., Rowland, G.N. 2001. Adenovirus pathogenicity in immature ostriches. *Avian Diseases* 45:442-446.
- Rodriguez-Chavez, I.R., Rosenberger, J.K., Cloud, S.S. 2002a. Characterization of the antigenic, immunogenic, and pathogenic variation of infectious bursal disease virus due to propagation in different host system (bursa, embryo and cell culture). I Antigenicity and Immunogenicity. *Avian Pathology* 31:463-471.
- Rodriguez-Chavez, I.R., Rosenberger, J.K., Cloud, S.S. 2002b. Characterization of the antigenic, immunogenic, and pathogenic variation of infectious bursal disease virus due to propagation in different host system (bursa, embryo and cell culture). II. Antigenicity and the epitope level. *Avian Pathology* 31:473-483.
- Rodriguez-Chavez, I.R., Rosenberger, J.K., Cloud, S.S., Pope, C.R. 2002c. Characterization of the antigenic, immunogenic, and pathogenic variation of infectious bursal disease virus due to propagation in different host system (bursa, embryo and cell culture). III. Pathogenicity. *Avian Pathology* 31:485-492.
- Tanimura, N., Tsukamoto, K., Nakamura, K., Narita, M., Maeda, M. 1995. Association between pathogenicity of infectious bursal disease virus and viral antigen distribution detected by immunohistochemistry. *Avian Diseases* 39:9-20.

Bolsa: FAPESP Processo número: 05/529943