

CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DO VIRUS DA LARINGOTRAQUEITE INFECCIOSA RESPONSÁVEL PELO SURTO EM 2002-2003 EM PODEIRAS NO ESTADO DE SÃO PAULO

JL Chacón^{1*}, AJ Piantino Ferreira¹

Laboratório de Ornitopatologia (LABOR)FMVZ-USP, São Paulo, SP.

e-mail: jchaconv@usp.br*

Introdução

A Laringotraqueíte infecciosa (LTI) é uma doença respiratória viral e altamente contagiosa das aves que produz aumento da mortalidade e severa diminuição do crescimento e da produção de ovos, levando a grandes perdas econômicas durante o surto clínico. Uma propriedade biológica de importância epidemiológica do vírus da LTI (VLTi) é a capacidade do agente de estabelecer infecções latentes, possibilitando desta maneira a permanência da doença de forma endêmica na região acometida (3). A LTI foi descrita no Brasil desde 1974; mas, o primeiro surto clínico severo com comprometimento sanitário e econômico ocorreu na região de Bastos – Tupã (SP) entre 2002 e 2003. Até o momento, a origem do vírus responsável pelo surto manteve-se desconhecida, se uma estirpe de origem vacinal ou uma estirpe de campo patogênica (2). O objetivo deste estudo foi utilizar as técnicas de PCR-RFLP e seqüenciamento de DNA para caracterizar geneticamente o(s) VLTi envolvidos no surto clínico da região de Bastos-Tupã.

Material e Métodos

Amostras: treze amostras positivas ao VLTi pela PCR e isolamento viral e coletadas durante o surto clínico foram incluídas neste estudo. Como padrões comparativos, foram incluídas amostras vacinais cedidas pela CDA-SAA-SP.

Deteção do VLTi: DNA extraído das amostras de campo e dos controles foram submetidos a uma reação de Nested-PCR para amplificação de um fragmento do gene E do VLTi. Foram utilizadas os iniciadores e as condições descritas por Chacón *et al.* (2005)(2).

PCR-RFLP: DNA das 13 amostras LTI-positivas foram submetidas a outras reações de PCR para amplificação de um fragmento dos genes TK e E. Os produtos amplificados do gene TK foram digeridos com as enzimas *HaeIII*, *Sau96I* e *NciI*, e os produtos amplificados do gene E foram digeridos com *DdeI*.

Seqüenciamento de DNA e análise filogenética: DNA de duas amostras (LTI-22 e LTI-27) que apresentaram diferente padrão na PCR-RFLP foram submetidas a uma reação de Nested-PCR que amplifica uma região do gene TK (4). O produto do Nested foi purificado e seqüenciado. A homologia das seqüências do VLTi obtidas foi avaliada por alinhamento e comparação usando BLASTn. Para determinar a relação entre as amostras de VLTi, foi realizada a análise filogenética das seqüências alinhadas. As seqüências geradas foram utilizadas para geração da árvore filogenética, utilizando-se o critério de otimização de distância, como algoritmo Neighbor-Joining e modelo de substituição Kimura-2 parâmetros e 1000 repetições de bootstrap com o programa MEGA 3.1.

Resultados e Discussão

A combinação dos padrões de restrição obtidos pelas técnicas de PCR-RFLP classificou as 13 amostras de campo em dois padrões (A e B). O padrão A incluiu 10

amostras que se mostraram diferentes das cepas vacinais incluídas no estudo (uma cepa vacinal de origem de cultivo celular e duas cepas vacinais de origem de embrião de galinha). As outras três amostras de campo mostraram-se indistinguíveis das cepas vacinais (Fig.1).

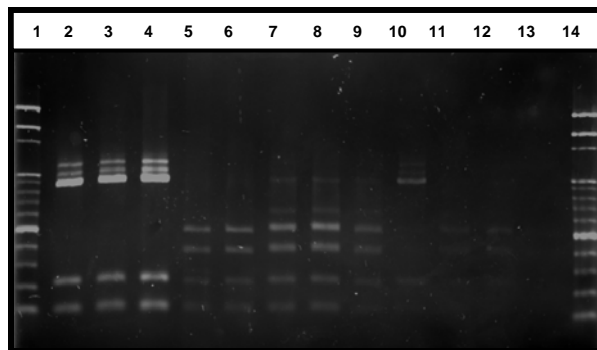


Fig. 2 PCR-RFLP do gene TK de estirpes de campo e vacinais do VLTi. Produtos de PCR digeridos com *HaeIII*. 1 e 14: Marcador molecular. 2, 3 e 4: cepas vacinais; 5-12: amostras de campo, 13: controle negativo.

As seqüências de nucleotídeos dos dois isolados brasileiros mostraram 99.3% de identidade entre elas, e 98.5 a 99.5% de identidade com cepas de outros países. As amostras brasileiras formaram um grupo separado (Fig. 2).

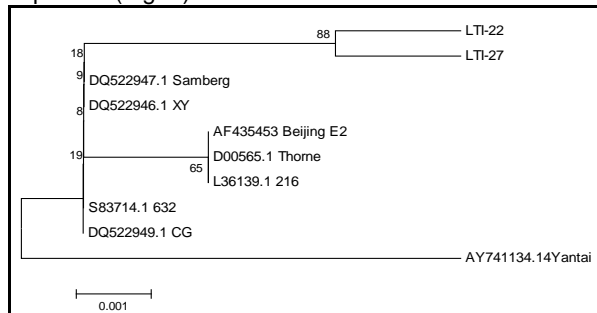


Figura 2. Árvore filogenética baseada em seqüências correspondente ao gene TK do VLTi.

Conclusão

Durante o surto clínico da LTI na região de Bastos-Tupã, foram detectadas duas cepas virais, sendo uma delas de origem vacinal. A cepa de origem não vacinal mostrou maior freqüência de detecção, sugerindo que a seja o agente responsável pelo surto.

Bibliografia

1. Chacón JL, Brandão P, Villarreal LY, Gama, N, Ferreira AJP. Brazilian Journal of Poultry Science 2007; 9(1): 61-68
2. Chacón JL, Brandão PE, Villarreal LY, Ferreira AJP. XXIII Congresso de Microbiologia 2005.
3. Guy JS, Bagust TJ. Laryngotracheitis. Diseases of Poultry. 11 Ed. 2003; Ames. 2003. P 121-134.
4. Han MG, Kim SJ. Veterinary Microbiology 2001; 83 (4): 321-331.

Apoio