

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE VETERINÁRIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

DOENÇA INFECCIOSA BURSAL: ESTUDO SOBRE AMOSTRAS VACINAIS E  
DE CAMPO, IMUNIDADE MATERNA E DESAFIO COM AMOSTRA MUITO  
VIRULENTA DO VÍRUS

TESE DE DOUTORADO

Hamilton Luiz de Souza Moraes

Porto Alegre  
2004

M827d Moraes, Hamilton Luiz de Souza

Doença Infecciosa Bursal: estudo sobre amostras vacinais e de campo, imunidade materna e desafio com amostras muito virulenta do vírus / Hamilton Luiz de Souza Moraes - Porto Alegre: UFRGS, 2004.

96f.; il. – Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Veterinária, Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Porto Alegre, BR-RS, 2004. Carlos Tadeu Pippi Salle, Orient.

1. Doença Infecciosa Bursal (DIB) 2. Patogenicidade  
3. Vacinas 4. Equação de regressão 5. Amostra virulenta :  
vírus 6. Anticorpos maternos I. Salle, Carlos Tadeu Pippi,  
Orient. II. Título

CDD 619.44

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE VETERINÁRIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

Hamilton Luiz de Souza Moraes

DOENÇA INFECCIOSA BURSAL: ESTUDO SOBRE AMOSTRAS VACINAIS E  
DE CAMPO, IMUNIDADE MATERNA E DESAFIO COM AMOSTRA MUITO  
VIRULENTA DO VÍRUS

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Ciências Veterinárias no Programa de Pós-Graduação da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, pela Comissão formada pelos professores:

---

Prof. Dr. Carlos Tadeu Pippi Salle  
Orientador e Presidente da Comissão

---

Prof. Dr. Adriano da Silva Guahyba  
Membro da Comissão

---

Prof. Dr. Benito Guimarães Brito  
Membro da Comissão

---

Profa. Dra. Luciana Ruschel dos Santos  
Membro da Comissão

Porto Alegre, 11 de fevereiro de 2004

À Beatriz, a Tatiana e a Samantha que estão sempre comigo.

## A UM GRANDE AMIGO

Foi num momento de término deste trabalho que a presença do meu amigo Ari ficou muito forte. Colega, companheiro de todas as horas, conselheiro e grande incentivador, FEZ MUITA FALTA. Este era o Ari que hoje COM CERTEZA compartilhou comigo o sentimento de tarefa cumprida. A ti dedico esta tese, não pela tua participação direta no trabalho, mas pelos ensinamentos profissionais e de vida, obrigado.

## Agradecimentos

Ao meu amigo Tadeu, que mais uma vez esteve ao meu lado durante todo o trabalho, não negando nenhum momento de atenção, companheirismo e criatividade. Obrigado pela confiança e incentivo.

Ao Prof. Dr. Vladimir Pinheiro do Nascimento, pelo apoio e amizade.

Ao Prof. Claudio Canal, pela colaboração e sugestões.

Ao Luiz Henrique Ribas (Zico) que esteve sempre pronto para resolver os problemas que impediam o desenvolvimento do trabalho.

Aos alunos e estagiários, Eduardo, Marcelo e Thales, que ajudaram desde a primeira hora.

Aos funcionários, Silvio e Omar, pela amizade e colaboração durante o trabalho.

Aos colegas médicos veterinários, Ana Rocha, Lucas Moraes, Denise Garcia, Adriana Padilha, Jacqueline Artencio, Laurício Rubin, Nilzane Beltrão, Rosecler Pereira e ao biólogo Felipe Salle, pela colaboração e fundamental ajuda na realização do trabalho.

A todos os alunos, estagiários, estudantes de pós graduação que convivem conosco no CDPA, pela colaboração nos trabalhos de rotina.

A Prof<sup>a</sup> Vera Wald, pela colaboração nas análises estatísticas.

As empresas avícolas que ajudaram na realização do trabalho, fornecendo as aves e a ração.

Ao Carlos Augusto Pinto da Altech Comércio e Importação Ltda., que acreditou no trabalho e forneceu os “kits” de ELISA.

## RESUMO

No artigo 1 descreve-se que não há diferenças antigênicas e imunogênicas entre 4 amostras vacinais, comercializadas no Brasil, cinco isolados de campo do vírus da DIB, através da prova de “western blotting”. Concluiu-se que os problemas da DIB no sul do Brasil se deviam mais a doenças intercorrentes, falhas nos



programas de vacinação, título e tipo de vacinas utilizados, do que cepas variantes do sorotipo 1 do vírus.

No artigo 2 é descrito, a patogenicidade de três vacinas intermediárias (I1, I2 e I3), duas intermediárias mais patogênicas (IP1 e IP2) e três contendo vírus forte (F1, F2 e F3) foram avaliadas. Observou-se que os animais que receberam as vacinas IP1, IP2, F1, F2 e F3 apresentaram tamanho de bolsa, significativamente, menor em relação ao controle e daqueles que receberam I1, I2 e I3. Por outro lado, as vacinas I1 e I3 induziram a formação de um título de anticorpos superior ao do controle e semelhantes entre si, diferindo de I2, IP1, IP2, F1, F2 e F3, cujo título foi, significativamente, maior. Histologicamente, notamos que as vacinas I1, I2 e I3 apresentaram graus de lesões semelhantes entre si, porém I2 e I3 não diferiram do controle, enquanto I1 mostrou diferença. Já as vacinas fortes mostraram a capacidade de induzir lesões, significativamente, maiores que as demais vacinas empregadas. Esses resultados sugerem que as vacinas fortes são capazes de provocar severas lesões bursais, sendo que, a bursometria e o peso relativo da bolsa de Fabrício, não são suficientes para a avaliação da patogenicidade das vacinas. Além disso, os títulos de anticorpos produzidos são maiores para as vacinas fortes, apesar de algumas vacinas intermediárias induzirem títulos semelhantes.

O Artigo 3 relata os resultados obtidos com pintos de corte de duas empresas avícolas, A e B, com diferentes esquemas de vacinação nas reprodutoras, os quais foram desafiados com uma amostra muito virulenta do vírus da DIB, GAR1,

genotipada como G11. As aves foram separadas em quatro grupos, dois vacinados e dois não vacinados no 1º dia de vida. As aves foram desafiadas no 1º, 4º, 7º, 10º, 13º, 16º, 19º e 22º dias de vida. A cada dia de desafio eram coletados e medidos, antes e depois, os seguintes itens do grupo: peso relativo da bolsa de Fabrício, diâmetro da bolsa, bolsa de Fabrício para exame histológico e soro para medir os anticorpos contra a DIB, através de Elisa e avaliação clínica da DIB. Os resultados mostraram uma queda de anticorpos sem diferença significativa entre aves vacinadas e não vacinadas. Analisando os diferentes resultados, foi estabelecido que um título de Elisa (log10) de 3,4, foi o ponto de corte entre aves saudáveis e aves doentes. Foram construídas equações de regressão, para o estabelecimento do melhor dia para a vacinação ou do título de Elisa (log10), que as aves podem ter numa determinada idade. Assim sendo, os pintos da Empresa A deveriam receber vacina contra a DIB a partir do 6º - 7º dia, e os da Empresa B deveriam receber a vacina entre o 11º-12º dia de idade. Com os resultados obtidos neste experimento fica claro que as aves não devem ser vacinadas no 1º dia de vida, que o esquema de vacinação das reprodutoras ocasiona diferenças na proteção da progênie e que não se deve aplicar o mesmo esquema de vacinação indiscriminadamente para todos os lotes de frangos.

## SUMMARY

Article 1 describes that it does not exist antigenic and immunogenic differences among four vaccines, commercialized in Brazil and five field isolated strains of the virus of the IBD, through the test of western blotting. The conclusion was that the problems of IBD in south Brazil were due to other diseases, imperfections on vaccination schemes, titer and type of used vaccines, than variant strain virus of serotype 1.

Article 2 describe the pathogenicity of eighth commercial brazilian vaccines against infectious bursal disease (IBD). In present work, the pathogenicity of 3 intermediate vaccines (I1, I2 and I3), 2 intermediate more pathogenic (IP1 and IP2) and 3 containing strong virus (F1, F2 and F3) was evaluated. It was observed that birds that received vaccines IP1, IP2, F1, F2 and F3 had the size of bursa significantly lower in relation to the control and the animals that received I1, I2 and I3. On the other hand, the vaccines I1 and I3 induced higher titers of antibodies than the control and lower than I2, IP1, IP2, F1, F2 and F3. Histologically, the vaccines I1, I2 and I3 presented a similar degree of injuries, however I2 and I3 were not different from the control, while I1 showed some difference. The strong vaccines induced more pronounced lesions than the other vaccines tested. These results suggest that the

strong vaccines are able to provoke severe bursal injuries. However, bursometry and relative height of the bursa of Fabricius were not appropriate for the evaluation of the pathogenicity. Moreover the antibody titers induced by strong vaccines were higher than the others, although some intermediate vaccines induced similar titers.

Article 3 reports the results of broiler chicks belonging to two poultry companies, A and B, with different breeders' vaccination plans were challenged with a very virulent sample of IBD virus (GAR1), genotyped as G11. Birds were separated in four groups, two vaccinated at the first day of life and two unvaccinated. They were then challenged at the 1<sup>st</sup>, 4<sup>th</sup>, 7<sup>th</sup>, 10<sup>th</sup>, 13<sup>th</sup>, 16<sup>th</sup>, 19<sup>th</sup> and 22<sup>nd</sup> days. At every day of challenge, before and after the procedure, the following data were collected from each group: Bursa of Fabricius (BF) relative weight, BF diameter, BF for histology examination, serum for measuring antibodies against IBDV through the ELISA test and clinical evaluation of IBD.

Results obtained have shown a non-significant drop in antibody level between the vaccinated and the unvaccinated groups. When analyzing the different results, it could be established that an ELISA titre of 3,4 log<sub>10</sub> was the cutoff between healthy and sick birds. Regression equations were built to determinate the best time for vaccination and also the ELISA log titre birds should present in a given age. Based on that, chicks from Company A should receive a vaccine dosis against IBD from the 6<sup>th</sup> to 7<sup>th</sup> day of life, while the ones from Company B should get it between the 11<sup>th</sup> and the 12<sup>th</sup> day.

Finally, the overall results suggest that the birds should not be vaccinated at one day old, and also that the breeders' different vaccination schemes result in progenies with different levels of maternal protection, and as a consequence the same vaccination plan should not be applied indiscriminately to broilers from different poultry companies.

## INTRODUÇÃO

A produção de carnes de frangos no período de 1970 a 2003 no Brasil aumentou de 217 mil para 7,7 milhões de toneladas (UBA, 2004). O consumo “per capita” em 2003 foi de 33,8kg, representando um aumento de 1.434% em relação a 1970 (ASGAV). Tal expansão induziu o setor avícola a buscar o mercado externo. A abertura de novos mercados permitiu o incremento das exportações. Foram exportadas 1,922 milhão de toneladas de carne de frango, representando uma evolução de 20% sobre 2002. A receita cambial decorrente das exportações atingiu US\$ 1,796 bilhão com crescimento positivo de 28,98% sobre o ano anterior, somando-se as vendas internacionais de produtos avícolas industrializados. O Brasil

manteve-se como segundo maior exportador do produto em volumes comercializados, e o 1º lugar em receita com exportações de carne de frango, ocupando 38% do mercado internacional, recuperando a condição de segundo maior produtor mundial.

No Rio Grande do Sul o fenômeno se repete. A Associação Gaúcha de Avicultura (ASGAV) informa que no Estado existem 14 frigoríficos com Inspeção Federal e 6 com Inspeção Estadual. Toda a estrutura que envolve a avicultura é responsável por 45 mil empregos diretos e 800 mil indiretos; 8,5 mil produtores integrados, com um plantel permanente de 60 milhões de pintos de corte e 25 milhões de avós/matrizes/poedeiras comerciais.

No ano de 2003, a avicultura gaúcha alojou 624,1 milhões de pintos e abateu 611,5 milhões de aves, produzindo um total de 917 mil toneladas de carne (668 mil toneladas para o mercado brasileiro). O faturamento no ano de 2003 foi de R\$1,6 bilhão sendo que o valor relacionado à exportação foi de US\$ 476 milhões (em torno de 535 mil toneladas exportadas). No ano de 2002, o Rio Grande do Sul participou com 14% da comercialização brasileira. Em comparação com outros estados, ficou em 3º no número de aves abatidas e em 2º lugar em toneladas produzidas. Entre as dez maiores empresas avícolas nacionais, estão no nosso estado a Avipal S/A Avicultura e Agropecuária, a Cooperativa R. A. Languiru, a Doux Frangosul S/A, a Perdigão Agro-industrial S/A e a Predileto Pena Branca Alimentos do Sul S/A. Estes dados servem para ilustrar a importância do mercado avícola, praticamente estabelecido em todas as áreas do estado. A postura comercial é representada por 148

empresas e 180 mini e pequenos produtores, sendo que 4 empresas possuem incubatórios independentes. No ano, a produção de ovos comerciais foi de 4,0 milhões e 100 mil caixas com 30 dúzias, com um faturamento de R\$75.000.000,00. O consumo de insumos básicos foi de 2,2 milhões de toneladas de milho, 750 mil toneladas de farelo de soja e 220 mil toneladas de sorgo.

Além do aspecto econômico, a avicultura desempenha um papel social muito importante, pois ao viabilizar o minifúndio evita a migração das populações rurais para as metrópoles. Com isto, colabora para a diminuição dos cinturões de miséria e da criminalidade urbana.

A Doença Infecciosa Bursal (DIB), é uma virose aguda e altamente contagiosa que acomete as galinhas jovens, caracterizando-se por diarreia, inflamação e atrofia da bolsa de Fabrício, causando variados graus de imunodepressão conforme descrição de Lukert & Saif (1997). Além das lesões descritas para a doença, a queda na produção, medida pelo ganho de peso e conversão alimentar, estará comprometida se o plantel de reprodutoras, que deu origem aos frangos de corte, não for vacinado contra a DIB de acordo com Wyeth (1981).

A DIB está disseminada por todos os plantéis avícolas do Brasil. Esta situação é extremamente preocupante pelos prejuízos que acarreta. No entanto, cabe ressaltar que a própria avicultura se encarrega de estampar paradoxos no que tange, principalmente, à prevenção e controle, ou seja, apesar de hiperimunizar as reprodutoras com sucessivas vacinações visando a proteção da progênie, os frangos de corte continuam sendo vacinados, na maioria das vezes, no primeiro dia de vida.

As justificativas usadas para embasar este tipo de procedimento carecem de base científica. Mesmo assim, são gastos milhões de reais ao ano com um processo vacinal sem comprovação de eficácia, sem conhecimento do nível de transmissão dos anticorpos maternos, e muito menos da proteção conferida por estes frente ao desafio pela cepa muito virulenta do vírus da DIB (G11). Esta realidade é o reflexo das tomadas de decisões sem a geração de critérios objetivos para sustentá-las e que podem levar à perpetuação do problema. Isto pode ser resolvido com a geração de modelos que expressem os critérios e tornem a decisão fundamentada cientificamente.

Trabalhos realizados anteriormente no CDPA sugeriram que, nas situações estudadas, os problemas com a DIB se deviam ao mau uso da vacina, à doenças intercorrentes, ou programas de vacinação mal planejados. Em nenhuma ocasião foi caracterizada a presença de cepas variantes que justificassem os surtos de campo. Por outro lado, nos dias de hoje existem evidências da presença de outros tipos de vírus que, teoricamente, não estariam cobertos pelo estímulo imunogênico induzido pelas vacinas comerciais disponíveis. Exemplo disso é o aparecimento de casos de DIB ocasionados por infecções com cepas similares àquelas muito virulentas encontradas em outros países. No campo, a controvérsia existente na atualidade é sobre a proteção que as vacinas comerciais utilizadas nas reprodutoras podem oferecer à progênie, frente ao desafio com esta nova cepa. Além disso, não conhecemos a patogenicidade das vacinas utilizadas, e muitas vezes, amostras vacinais que destróem a bolsa, são aplicadas em pintos no primeiro dia de vida. No



laboratório, é desconhecido o título protetor de anticorpos maternos conferido pelo estímulo vacinal. Também não se conhece a dinâmica de queda desses anticorpos em pintos comerciais e, sem essa informação, o estabelecimento da data da primeira vacinação no campo corre o risco de ser inócua ou, até mesmo, prejudicial aos animais. Na prática, diferentes esquemas de vacinação são recomendados e utilizados mas, apesar disso, surtos da doença tem acontecido no Brasil. O presente estudo, dividido em três experimentos, foi feito para investigar se haviam diferenças entre as amostras de campo e amostras vacinais do vírus da DIB, a patogenicidade de diferentes amostras vacinais e o papel dos anticorpos maternos, em aves vacinadas no primeiro dia de vida, e não vacinadas, na proteção contra o desafio de uma amostra muito virulenta do vírus, isolada no Brasil.

## ESTRUTURA DA TESE

Revisão bibliográfica:

Há uma revisão geral englobando vários aspectos da doença, do vírus da DIB e de vacinas e vacinações, além das revisões específicas de cada artigo. Algumas citações podem aparecer tanto na revisão geral, quanto nas específicas.

Trabalhos científicos publicados e remetidos para publicação.

Artigo 1 – “AVALIAÇÃO DA RELAÇÃO ANTIGÊNICA E IMUNOGÊNICA ENTRE AMOSTRAS DE CAMPO E AMOSTRAS VACINAIS DO VÍRUS DA DOENÇA INFECCIOSA BURSAL, ATRAVÉS DO “WESTERN BLOTTING”.

Neste trabalho foi verificado a semelhança entre amostras de campo e amostras vacinais, chegando à conclusão, na época, que os problemas decorrentes das falhas de vacinação eram devido a outros motivos e não às diferenças antigênicas entre as amostras vacinais e as de campo.

Artigo 2 - “DOENÇA INFECCIOSA BURSAL: AVALIAÇÃO DA PATOGENICIDADE DE VACINAS COMERCIALIZADAS NO BRASIL EM AVES LIVRES DE PATÓGENOS ESPECÍFICOS”.

Este experimento verificou a patogenicidade de 8 vacinas comerciais utilizadas no Brasil, fabricadas com diferentes amostras de vírus da DIB, intermediária, intermediária mais patogênica e forte. A conclusão foi que as diversas amostras

demonstraram patogenicidades diferentes, inclusive algumas amostras com comportamento igual ao do vírus patogênico de campo.

Artigo 3 – “DOENÇA INFECCIOSA BURSAL: AVALIAÇÃO DA IMUNIDADE MATERNA E DA PROTEÇÃO CONFERIDA PELA VACINAÇÃO NO PRIMEIRO DIA DE VIDA , FRENTE AO DESAFIO COM UMA AMOSTRA MUITO VIRULENTO DO VÍRUS.

Neste trabalho foi verificada a queda natural dos anticorpos maternos de pintos vacinados e não vacinados no primeiro dia de vida, através do desafio com uma amostra muito virulenta do vírus (G11). Concluiu-se que não havia diferença entre os dois grupos (vacinados e não vacinados) e sim entre as empresas.

Discussão e conclusões

Estão colocadas de maneira que o leitor possa ter uma idéia dos resultados dos trabalhos e das razões que levaram a realização dos mesmos. Também procura discutí-los de forma a interligá-los temporal e cientificamente e conduz a perspectivas de novos projetos sobre o tema.

## REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A Doença de Gumboro (DG), também conhecida como Infecção da Bolsa de Fabrício (IBF), ou Doença Infecciosa Bursal (DIB), é uma virose aguda e altamente contagiosa que acomete as aves jovens, caracterizando-se por diarreia, inflamação e atrofia da bolsa de Fabrício (BF), causando variados graus de imunodepressão (Lukert & Saif, 1997). O vírus tem como alvo o tecido linfóide, com

especial predileção pela BF, com consequentes efeitos imunossupressores (Hirai et al., 1974). A doença ocorre mais frequentemente em frangos jovens, com idade variando entre 3 a 5 semanas. A DIB cursa por 5 a 7 dias, causando uma alta morbidade e uma mortalidade média que se situa entre 5 e 6% (Cosgrove,1962).

Desde 1962, quando Cosgrove descreveu a DIB, várias foram as classificações dadas ao vírus. Cho & Edgar (1969) caracterizaram-no como sendo da família Picornaviridae. Por outro lado, Pattison et al. (1975) classificaram o agente da DIB como integrante da família Reoviridae.

A bolsa de Fabrício (BF), alvo principal do vírus da DIB, apresenta lesões que vão desde o aumento de diâmetro e peso, em consequência de hiperemia e edema, até o terceiro dia após a infecção, a atrofia, chegando a aproximadamente 1/3 de seu peso normal em 8 dias (CHEVILLE, 1967).

Hitchner (1970) relata que a BF, após dois ou três dias da infecção apresenta conteúdo gelatinoso e amarelado cobrindo a superfície serosa e alterando a coloração desta, que passa de esbranquiçada para creme.

Dobos (1979), estudando as propriedades biofísicas e bioquímicas, caracterizaram 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 mede entre 55 e 65 nm de diâmetro, não é envelopado e é composto por um RNA de dupla hélice com um genoma bissegmentado, designados de segmentos A e B.

Além dos prejuízos diretos da doença, perdas consideráveis ocorrem através do efeito imunossupressor do vírus e da interação entre a DIB e outras enfermidades nas duas primeiras semanas de vida. Numerosos trabalhos têm demonstrado um aumento de suscetibilidade das aves a outras infecções após a exposição ao vírus da DG. Os prejuízos causados pelos severos transtornos nas funções imunológicas da bolsa de Fabrício, decorrentes da infecção nos primeiros dias de vida pelo vírus da DIB, foram observados por Allan et al. (1972).

Conforme Rinaldi et al. (1972), a maioria das infecções detectadas têm sido associadas com a doença subclínica; embora estes surtos não causem mortalidade, esta resultaria em prejuízo no ganho de peso. Fadly et al. (1976), trabalhando com aves bursectomizadas quimicamente (Ciclofosfamida) e infectadas com o vírus da DIB, descreveram o desenvolvimento da Hepatite por Corpúsculo de Inclusão (HCI), quando as aves foram inoculadas com três semanas de idade, em comparação com as testemunhas que mesmo infectadas com o vírus da HCI não desenvolveram a doença. Aves expostas ao vírus da DIB, tiveram sua susceptibilidade à agressão com vírus da Doença de Marek aumentada em 56,3% dos casos, conforme Giambrone et al. (1976). Os achados de Almassy & Kakuk (1976), estão

de acordo com os anteriores, quando descrevem que aves expostas ao vírus da DIB diminuíram a habilidade de desenvolver anticorpos inibidores da hemoaglutinação (HI) contra a doença de Newcastle (DNC). As aves que não tinham anticorpos detectáveis contra a DNC representavam 75% do lote, nas restantes os níveis de anticorpos foram muito baixos, quando comparados aos de aves não expostas ao vírus da DIB .

Giambrone et al. (1977), trabalhando com *Mycoplasma synoviae* (Ms), doença de Newcastle (DNC) e Bronquite Infecciosa (BI), mostraram uma queda acentuada nos níveis de anticorpos contra aquelas enfermidades, quando as aves foram expostas ao vírus da DIB no primeiro dia de vida. Os autores utilizaram a soroaglutinação rápida em placa e inibição da hemoaglutinação (HI) para Ms, vírus-neutralização para BI e para DNC também a prova de HI.

Rosemberger & Cloud (1989), demonstraram que o agente da Anemia das Galinhas (AG) aumentava a sua patogenicidade, quando no primeiro dia de vida os pintos eram inoculados com o vírus da DIB. As aves foram altamente suscetíveis ao vírus da AG, inoculado no 1<sup>o</sup>, 14<sup>o</sup>, e 21<sup>o</sup> dia, documentado pelo número de aves com aplasia de medula óssea e hematócritos abaixo de 25.

A agressão com vírus da DIB, no primeiro dia de vida das aves, mostrou uma queda na resposta imune quando estes animais foram submetidos aos

vírus da Doença de Newcastle, Bronquite Infecciosa e Laringotraqueíte de acordo com Rosemberger & Gelb (1978).

Para demonstrar que a imunossupressão causada pelo vírus da DG abria as portas para os microorganismos patogênicos, Okoye et al. (1991) inocularam em dois grupos de 30 frangos de corte com 24 dias de idade *Aspergillus flavus* ou *Aspergillus flavus* mais o vírus da DG. Os animais que foram inoculados com o *Aspergillus flavus* mais o vírus, apresentaram lesões mais graves no pulmão, fígado, rins e baço do que os inoculados apenas com o fungo. As aves inoculadas com o fungo e o vírus apresentaram também um menor ganho de peso.

Os trabalhos mostrando o efeito imunossupressor do vírus da DG sobre as galinhas, principalmente nas primeiras três semanas, foram se sucedendo e detalhando os níveis de supressão dos linfócitos B e T e dos órgãos envolvidos na resposta imunológica. Assim, Sivanandan & Maheswaran (1980) comparando o número de linfócitos B e T no sangue periférico de galinhas infectadas com o vírus da DIB, no primeiro dia e às três semanas de idade, concluíram que a diminuição dos linfócitos B era diferente em cada idade. As aves infectadas no primeiro dia de vida mostravam uma menor quantidade de linfócitos B do que as infectadas às três semanas. Os linfócitos T foram marcadamente menos afetados nos dois grupos.



Dohms & Jaeger (1988), trabalhando com frangos de corte de lotes comerciais com três semanas de idade, inocularam *Brucella abortus*, antígeno independente do timo, e eritrócitos de ovinos, antígeno timo dependente, antes, durante e depois dos animais serem infectados por via intranasal e intraocular com  $10^4$  <sub>DIE/50</sub> mL de uma amostra do vírus da DIB (SCT). Utilizando extratos de glândula de Harder e soro dos frangos para calcular os títulos de anticorpos locais e sistêmicos para cada antígeno, sete dias depois da sua administração, concluíram que tanto a função imunológica local, quanto a sistêmica, foram comprometidas pelos tratamentos.

Imai et al. (1999) descreveram a ação conjunta de uma amostra muito virulenta do vírus da DIB, inoculada aos 35 dias de idade e uma amostra do vírus da anemia infecciosa das galinhas (VAIG), inoculada aos 40 dias de idade. Ao examinarem as aves 7 dias depois do desafio com VAIG, encontraram uma diminuição dos anticorpos vírus neutralizantes contra a anemia infecciosa das galinhas, inibidos pela inoculação do vírus da DIB. Além disso, os VAIG foram recuperados do plasma destes animais.

A infecção pelo vírus da DIB, pode ser evitada pela presença de anticorpos maternos nas primeiras três semanas de vida. Hitchner (1971), trabalhando com aves jovens de até três semanas de idade, inoculou vírus da DIB em animais com

e sem anticorpos maternos contra esta doença, obtendo 100% de lesões na bolsa de Fabrício dos animais susceptíveis e 25% naqueles que possuíam anticorpos.

Existem diferentes tipos de vacinas contra a DIB disponíveis no mercado, elaboradas com vírus vivo ou inativado. Assim, Wyeth et al. (1981), testando nove lotes de frangos de corte provenientes de matrizes vacinadas contra a DIB, com vacina contendo vírus vivo, às 8 semanas de idade, mais vacina oleosa com vírus morto, às 20 semanas, demonstraram que houve ganho de peso de 7,97%, em relação aos frangos originados de matrizes vacinadas apenas com vacina com vírus vivo, ou quando eram vacinadas duas vezes com vacina oleosa. Os autores relataram também que a conversão alimentar melhorou em relação aos lotes controles.

Da mesma forma que a infecção, a imunização ativada por vacinas contra a DIB pode ser inibida pelos anticorpos maternos. Os anticorpos maternos nem sempre protegem a progênie contra o desafio por vírus virulento (campo), de acordo com Winterfield & Thacker (1978). Devido a isto, a vacinação teria que ser utilizada numa idade jovem.

Algumas cepas de vírus vacinais são capazes de vencer a barreira de anticorpos maternos e outras não de acordo com Jackwood et al. (1985). Foi sugerido

que aqueles vírus que têm esta capacidade, também lesariam a bolsa de Fabrício, originando alguma imunodepressão (Winterfield et al., 1978).

Edwards et al. (1982), trabalharam com pintos White Leghorn, livres de patógenos específicos, vacinados no 1<sup>o</sup> dia de vida com uma amostra vacinal capaz de conferir proteção, na presença de anticorpos maternos, mas causando danos à bolsa de Fabrício (BF), concluíram que: oito de dez BF examinadas, 7 dias depois da vacinação, mostraram severos danos, tais como destruição da arquitetura folicular, depleção linfóide, aumento do tecido conjuntivo, muco, cistos e enrugamento do epitélio. As lesões foram regredindo a partir da 2<sup>a</sup> semana. Aos 28 dias, 6 de 10 BF removidas mostraram pelo menos 50% do total da área recuperada, com folículos aparentemente normais. A regeneração continuou até aos 70 dias, embora fossem evidentes as lesões remanescentes da vacinação no 1<sup>o</sup> dia. As BF das aves vacinadas sempre foram menores do que as das aves não vacinadas .

Munoz (2001), relatou que as vacinas formuladas com amostras intermediárias do vírus da DIB, causaram até 65% de depleção linfocitária bursal no sétimo dia pós-vacinação, e amostras intermediárias mais patogênicas causaram até 85% e que as amostras fortes do vírus podiam chegar até 90% de depleção. Luengo et al. (2001), afirmaram que a vacinação com cepas intermediárias pode implicar num potencial decréscimo na imunocompetência de frangos, após a vacinação.

Com o surgimento de vacinas cada vez mais virulentas, os pesquisadores começaram a trabalhar para tentar diferenciar as amostras patogênicas de campo (selvagens), das amostras patogênicas de vacinas (domesticadas). Jackwood & Sommer (2002) tentando fazer esta diferença trabalharam com marcadores genéticos que possibilitavam a diferenciação entre amostras patogênicas de campo e amostras vacinais do vírus da DIB. Este marcador é a sequência de restrição da enzima NgoM IV, que foi encontrada em 10 amostras de campo do vírus da DIB e em nenhuma das 16 vacinas intermediárias testadas. Mas, quando foram utilizadas vacinas chamadas “intermediárias-plus” e amostras fortes, não foi possível, através desta enzima, diferenciar a amostra patogênica de campo das amostras vacinais, porque elas também possuíam o mesmo marcador da amostra patogênica do vírus.

Com vários pesquisadores demonstrando que as vacinas podem causar imunodepressão, novos métodos de vacinação e novas vacinas estão sendo trabalhadas, para tentar amenizar este problema.

Giambrone et al. (2001) estudaram a segurança e a eficácia de uma vacina, administrada no embrião, combinada com o vírus da doença de Marek (VDM) e VDIB, em frangos de corte comerciais com anticorpos maternos, nos Estados Unidos. A vacina foi usada quando os embriões tinham 18 dias de idade. Quando a vacina foi dada com a dose inteira os autores verificaram que, aumentou a mortalidade embrionária e também a mortalidade até a terceira semana após a

eclosão. Quando a dose foi dada pela metade, a mortalidade embrionária e pós eclosão não aconteceram. Entretanto, lesões microscópicas significativas na bolsa de Fabrício foram evidentes na primeira semana mas, não na terceira semana de vida das aves. Para testar a eficácia da vacina os autores desafiaram as aves na terceira semana de vida com uma amostra virulenta clássica do VDIB (APHIS) e com uma variante antigênica (variante E). As vacinas produziram 87% de proteção contra a amostra clássica e 60% com a variante.

Buscando vacinas que não comprometam a bolsa de Fabrício, Chang et al. (2003) trabalharam com a proteína viral VP2 de uma amostra padrão do VDIB (STC), que foi amplificada por RT-PCR, sendo clonado usando como vetor um plasmídeo eucariótico (pCR3.1), que foi utilizado como vacina. Pintos foram vacinados intramuscularmente no primeiro dia de vida e mais três vezes com intervalos de uma semana. Aos 21 dias foram desafiados com um VDIB (STC) e as lesões observadas 10 dias depois. Pintos que receberam os plasmídeos contendo genes VP2, incluindo VP243, VP24 ou fragmentos de VP2, não apresentaram sinais clínicos, mortalidade e nem atrofia bursal e foram efetivamente protegidos contra a DIB. Ao contrário de pintos que receberam plasmídeos sem os genes VP2. Chegaram à conclusão que a inclusão dos genes VP2 é essencial para a efetiva proteção contra a doença. Martinez-Torrecuadrada et al. (2003) utilizaram baculovirus para expressar o gene VP2, túbulos VPX e uma poli proteína (PP). Aves com quatro semanas de idade foram imunizadas, subcutaneamente com uma dose de cada um dos antígenos. Todos

os animais vacinados foram protegidos contra a doença quando desafiados com uma amostra muito virulenta do vírus da DIB, entretanto, o grau de proteção foi diretamente correlacionado com os níveis de anticorpos neutralizantes. Os genes VP2 protegeram mais que os outros dois. Os autores concluíram que estes antígenos recombinantes do VDIB são eficientes como componentes da vacina.

Na mesma linha de trabalho, Rogel et al. (2003) usaram o segmento do genoma A de uma amostra muito virulenta do vírus da DIB, que foi amplificado por RT-PCR. A sequência inteira da região dos genes VP2, VP4 e VP3 foi clonada e sequenciada. Os genes foram expressos em uma *Escherichia coli*. A indução de anticorpos contra o VDIB foi detectado em galinhas imunizadas com o purificado recombinante de VDIB intramuscularmente. Posteriormente as aves foram desafiadas com um isolado do vírus da DIB (Gep 5) e não mostraram sinais da doença e nem lesões.

Butter et al. (2003) trabalharam com um vacina recombinante de pox vírus de galinha, contendo a proteína VP2 do vírus da DIB. Esta vacina foi testada em aves e a imunodepressão causada pelo desafio de uma amostra virulenta do vírus foi testada. Os autores inocularam uma vacina contra salmonela e por uma amostra inativada do vírus da DIB. Concluíram que não houve imunodepressão nestas aves, quando comparadas com o controle não vacinado com a vacina recombinante.

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 de 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 DG.

Outro fator a ser levado em conta no planejamento de um programa de vacinação, é o de que quando o nível de anticorpos maternos é alto, resultará em proteção contra o vírus virulento da DIB. Porém, nos casos em que os anticorpos maternos apresentem títulos baixos, não haverá proteção contra a doença e sim uma interferência na multiplicação dos vírus vacinais utilizados (Wood et al., 1981).

Honegger et al. (1987) avaliaram a habilidade de cinco vacinas, produzidas com vírus vivo da DIB, de proteger aves suscetíveis contra uma amostra variante do vírus, Delaware - A. Esta proteção ficou entre 10 a 80%. As vacinas induziram diferentes títulos de vírus neutralização (VN) e diferentes graus de lesões na bolsa de Fabrício. A vacina que causou extensas lesões na bolsa protegeu menos e deu títulos de VN mais altos.

Giambrone & Closser (1990) desafiaram aves vacinadas com três diferentes vacinas comerciais contra a DIB, com uma cepa padrão do sorotipo 1 e uma cepa variante isolada no campo, demonstrando que nenhuma das três vacinas induziu boa proteção para as cepas de desafio, alcançando um máximo de 80%.

Chettle & Wyeth (1989) demonstraram que altos níveis de anticorpos maternos não foram suficientes para proteger pintos, agredidos no primeiro dia com uma amostra de vírus da DIB diferente daquela que induziu a formação dos anticorpos maternos.

Kouwenhoven et al. (1994), demonstraram que os anticorpos maternos não opuseram resistência quando as aves foram desafiadas com uma amostra muito virulenta do vírus da DIB, na Holanda, desenvolvendo a doença a partir dos 14 dias de idade. Quando os frangos foram vacinados com vacinas vivas mais virulentas, o resultado de proteção foi satisfatório, quando duas vacinações foram feitas, aos 14 e 21 dias.

Avellaneda e Villegas (1995), concluíram que a medida do nível de anticorpos contra a DIB pode ser utilizada para detectar a exposição das aves a amostras muito virulentas do vírus da DIB, ajudar a determinar a melhor idade para a vacinação e prever o nível de anticorpos da progênie. No mesmo trabalho os



autores também disseram que a prova de ELISA é sensível, específica e prática para o uso em larga escala e para medir a transferência passiva de anticorpos maternos entre 1 e 3 dias de idade.

Salle et al. (1999) e Salle & Silva (2000) discutiram a interpretação de resultados sorológicos e apresentaram metodologias que possibilitam a transformação de resposta imunológica em equações matemáticas. Essas equações, quando resolvidas, fornecem o critério objetivo para embasar as decisões pertinentes.

Giambrone et al. (1999), desafiando a progênie de reprodutoras vacinadas com duas vacinas vivas e duas vacinas inativadas oleosas, com vírus padrão e amostras variantes da DIB, conseguiram comparar através de provas de ELISA, em soro das reprodutoras e através da agressão da progênie que, o produtor pode ter um indicador de proteção com os dados sorológicos das provas de ELISA.

Por outro lado, Van Der Berg & Meulemans (1991) concluíram que os anticorpos maternos foram insuficientes para proteger frangos de corte, durante o período de crescimento, frente a cepas altamente patogênicas de vírus da DIB, independente dos programas de vacinação utilizados nas matrizes. Demonstraram ainda que os anticorpos maternos interferiam com as vacinas vivas e que a cepa de

baixa patogenicidade do vírus da DIB, foi mais eficaz na produção de anticorpos do que as cepas intermediárias utilizadas no experimento.

Mesmo com o uso intensivo de vacinas contra a DIB em todos os países de avicultura industrial, o problema persiste. A substituição dos programas de limpeza e desinfecção pelos programas de vacinações sem critério, parece que não é o melhor caminho, porque Hiraga et al. (1994) trabalhando com diferentes títulos de vírus muito patogênicos da DIB,  $10^{0,7}$  e  $10^{4,7}$ <sub>DIE/50</sub> mL, demonstraram que as aves inoculadas com a dose menor, não mostraram sinais clínicos nem lesões nos quatro dias de observações, ao contrário das aves que foram inoculadas com a dose maior, que adoeceram e tinham lesões macroscópicas e microscópicas na bolsa de Fabrício (BF). Com estes resultados chegaram à conclusão que esta amostra muito virulenta (90-11) era dose-dependente para desenvolver a doença e as lesões na BF.

Nakamura et al. (1992) estudaram o efeito imunodepressor de uma amostra muito virulenta do vírus da DIB (90-11) isolada no Japão, quando comparada a uma amostra clássica do vírus (GBF-1). As aves foram inoculadas na 2<sup>a</sup>, 3<sup>a</sup> e 4<sup>a</sup> semanas e vacinadas contra a doença de Newcastle. Os animais desafiados com a amostra 90-11 tiveram a imunidade para Newcastle deprimida em comparação aos que foram desafiados com a amostra GBF-1. Concluíram que havia uma depleção maior do timo nas aves desafiadas com a amostra muito virulenta da DIB.

Ture et al. (1998) caracterizaram amostras muito virulentas do vírus da DIB isoladas na Holanda, Turquia e Taiwan, por RT-PCR-RFLP, e compararam com amostras dos Estados Unidos da América, amostra clássica (STC), variante (MD,IN) e ma do sorotipo 2 (OH). Os autores concluíram que as amostras da Holanda e da Turquia foram similares à amostra clássica (STC), mas foi diferente da amostra variante americana. Nenhuma das amostras foram similares ao padrão do sorotipo 2 do vírus.

Etteradossi et al. (1999) demonstraram, através de estudos comparativos, que as amostras classificadas como variantes têm alta similaridade antigênica com as amostras clássicas do vírus da DIB. Verificaram também que estes isolados eram mais patogênicos que as cepas clássicas conhecidas e sugeriram tratem-se de novos patótipos. Alguns destes isolados causavam 3 a 4 vezes mais mortalidade quando comparados à cepa de desafio Faragher 57/90. Estas cepas atualmente são conhecidas como amostras muito virulentas do vírus da DIB ou amostras altamente virulentas do vírus da DIB.

Herdt et al. (2000) fizeram um levantamento epidemiológico entre os anos de 1993 e 1997, na Europa, sobre a DIB, examinando os títulos de anticorpos e a informação sobre o rendimento dos lotes, empresas com produção vertical, desde as reprodutoras de um dia de idade, até os frangos de corte no abate. Os resultados indicaram que os títulos de anticorpos altos e uniformes contra o vírus da DIB, nas

reprodutoras de corte, são importantes para o bom rendimento da progênie de frangos de corte, nas condições estudadas, que incluíam a presença de amostras muito virulentas do vírus da DIB, no campo, e o uso de apenas vacinas com amostra intermediária do vírus, nas reprodutoras e nos frangos de corte.

Majo et al. (2002) trabalharam com nove isolados do vírus da DIB da Espanha e caracterizaram as amostras por RT-PCR e RFLP. Foram encontradas amostras clássicas e muito virulentas do vírus. Nenhuma das nove amostras tinham similaridade com as variantes dos Estados Unidos da América. Quatro delas foram relacionadas com amostras muito virulentas encontradas na Europa e Japão, as outras foram classificadas como amostras clássicas do vírus da DIB.

No Brasil, Ikuta et al. (1997 e 2001) descreveram amostras muito virulentas do vírus da DIB em frangos de corte e poedeiras comerciais. Também examinaram 55 lotes comerciais brasileiros, e destes, conseguiram caracterizar 48 amostras como positivas para DIB por RT-PCR. Em 12 foram encontrados padrões vacinais, um compatível com a amostra clássica do vírus, 4 novos padrões em 31 lotes e um padrão caracterizado como uma amostra muito virulenta do vírus da DIB, descrita na Europa e na Ásia, sugerindo uma alta prevalência de diferentes amostras de vírus da DIB em lotes comerciais no País. Di Fabio et al. (1999) trabalhando com a prova de ELISA por captura de antígeno, diante de sete anticorpos monoclonais neutralizantes, caracterizaram amostras do vírus da DIB, isoladas no Brasil, como semelhantes às muito virulentas européias.

Nos relatórios do Centro de Diagnóstico e Pesquisa em Patologia Aviária (CDPA), laboratório que centraliza os diagnósticos de doenças das aves, principalmente da região sul do Brasil, verifica-se que nos últimos cinco anos a DIB continua como uma das principais doenças diagnosticadas nessa região, alcançando percentuais em torno de 30% em relação ao total de diagnósticos efetuados.

O conhecimento do nível dos anticorpos maternos, o título e a cepa dos vírus vacinais, das características dos vírus de campo, e da patogenicidade das amostras vacinais utilizadas nas vacinas comerciais do Brasil, é de fundamental importância para o êxito de um programa de vacinação, tanto nas reprodutoras quanto nos frangos de corte. Em função destas premissas foi delineado o presente trabalho que resultou em três experimentos distintos, relatados em trabalhos específicos. O primeiro foi publicado em 1998, sobre amostras vacinais e de campo do vírus da doença infecciosa bursal. O segundo com 8 vacinas comerciais utilizadas no Brasil, para se ter um melhor conhecimento das características das diferentes amostras de vírus utilizadas e a sua patogenicidade em aves livres de patógenos específicos (LPE). O terceiro experimento foi executado com pintos comerciais de 1 dia de idade, provenientes de 2 lotes distintos de reprodutoras, para avaliar o nível dos anticorpos maternos e a sua capacidade de proteção, quando foram desafiados com uma amostra muito virulenta do vírus (G11).

## ARTIGO 1

AVALIAÇÃO DA RELAÇÃO ANTIGÊNICA ENTRE AMOSTRAS DE CAMPO E AMOSTRAS VACINAIS DO VÍRUS DA DOENÇA INFECCIOSA BURSAL, ATRAVÉS DO “WESTERN BLOTTING”.

HAMILTON LUIZ DE SOUZA MORAES<sup>1</sup>  
CARLOS TADEU PIPPI SALLE<sup>1</sup>  
ARI BERNARDES DA SILVA<sup>1</sup>  
VLADIMIR PINHEIRO DO NASCIMENTO<sup>1</sup>

Correspondence to:

Centro de Diagnóstico e Pesquisa em Patologia Aviária-CDPA  
Av. Bento Gonçalves, 8824  
Porto Alegre RS

1- Centro de Diagnóstico e Pesquisa em Patologia Aviária – CDPA.  
Convênio Faculdade de Veterinária da UFRGS/CPVDF-FEPAGRO

## 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 a suas características antigênicas e imunogênicas. Inoculou-se  $10^2$  DIE/50ml de uma suspensão de cada um dos vírus, replicados na membrana cório-alantóide, em cobaias. As amostras foram submetidas ao SDS-PAGE, avaliado o perfil protéico de cada uma 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 à doenças intercorrentes, programas de vacinação, título e tipo de vacinas utilizados, do que à cepas variantes do sorotipo 1 do vírus.

## 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  $10^2$  IDE/ 50ml 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 antisera 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 48 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: 1. AVIAN PATHOLOGY: POULTRY. 2. POULTRY HEALTH ,  
MEDICINE. 3. INFECTIOUS DISEASES: BIRDS. INFECTIOUS BURSAL  
DISEASE: ANTIGENIC AND IMMUNOGENIC RELATIONSHIP. WESTERN  
BLOTTING. I. TITLE.

## INTRODUÇÃO

Estudando as propriedades biofísicas e bioquímicas, Dobos (1979), caracterizaram o vírus da DIB como um membro da família Birnaviridae, que inclui também alguns vírus de peixe, moluscos e de drosófila. Conforme Müller (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 DG.

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 explicar 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 et al. (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 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



amino ácidos 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 VIBF, utilizando-se anticorpos policlonais induzidos por estas amostras, através da prova de “Western blotting”.

### MATERIAIS E MÉTODOS

**AMOSTRAS DE CAMPO-** Foram selecionadas 05 (cinco) bolsas de Fabricio (BF), oriundas de frangos de corte vacinados e não vacinados contra a doença de Gumboro (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 4 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 SPF, (Villegas, 1981; Lukert & Saif, 1991) e tituladas conforme Rosenberger (1989), antes de 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 (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 & Saif (1982).

**SOROS HIPERIMUNES-** Foram administrados 4 ml de inóculo (2ml de Ag + 2ml de ACF), intramuscular, em cada cobaio, e 4 ml intraperitoneal 4 semanas depois. Os inóculos continham  $10^2$  Dose Infecciosa para o Embrião/50 ml (DIE/50ml) de vírus em cada amostra, sendo utilizados 5 cobaios por antígeno. Uma semana após a última inoculação os animais foram sangrados e os soros guardados de acordo com Jackwood & 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 por “Western blotting”, procedimento descrito por Burnette (1981). Após a transferência das amostras para as membranas de nitrocelulose, estas foram cortadas em tiras e incubadas com os anti-soros, provenientes de animais inoculados com as amostras de campo e vacina, diluídos a 1/100. A ligação dos anticorpos foi identificada com um soro anti-imunoglobulina de cobaio 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

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.

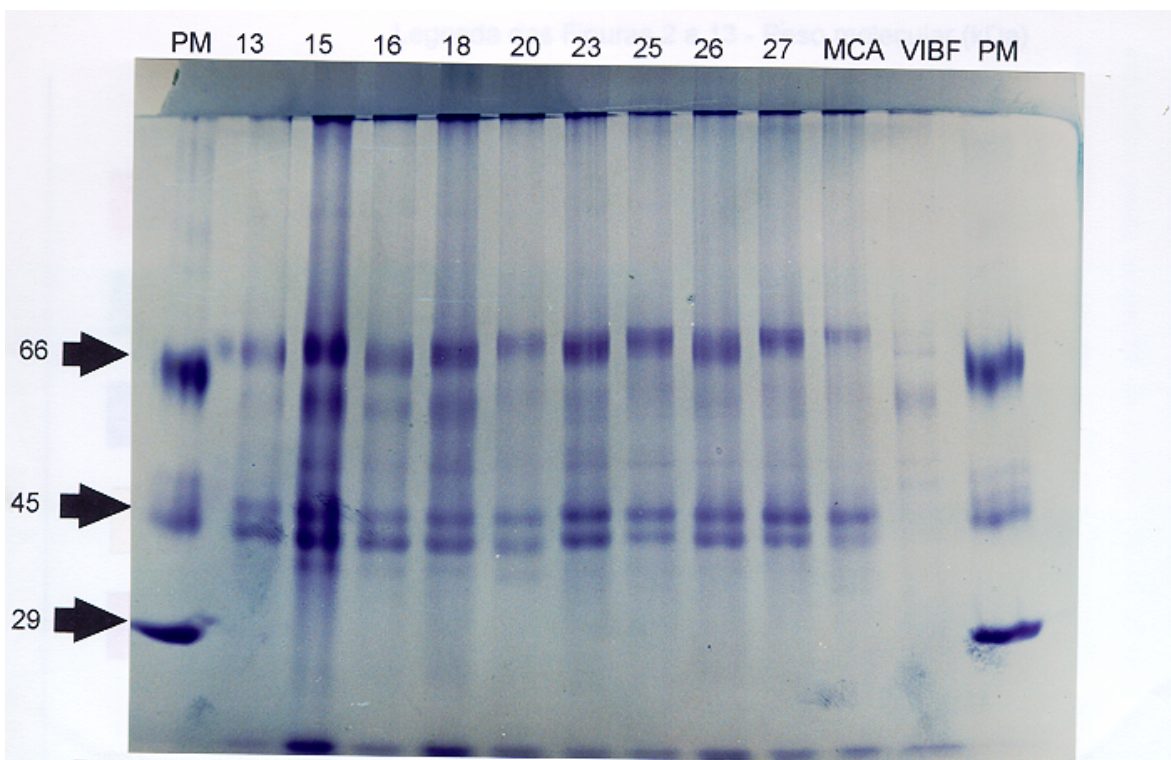


Figura 1 - SDS-PAGE das amostras de virus de campo e de vacina, da MCA e do VIBF

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 anti-soros induzidos pelas amostras de campo e vacina. Foram caracterizados os antígenos com pesos moleculares de 100kDa, 73kDa, 69kDa, 63kDa, 57kDa, 48Kda, 30kDa e 24kDa.

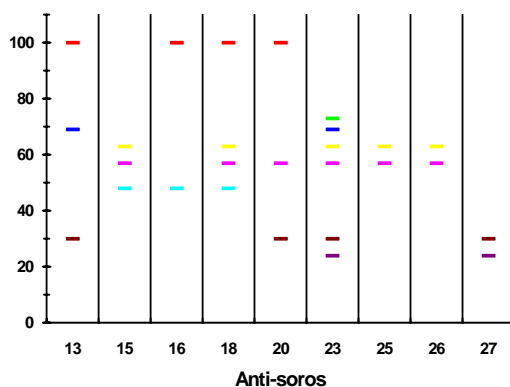


Figura 2 – Western blot: padrão de reconhecimento das proteínas do VDIB

Na análise das amostras de campo e vacina do presente trabalho, com os anti-soros produzidos contra eles, mostrado nas Figuras 3 a 11, várias bandas foram reveladas por cada soro, com um alto grau de reatividade cruzada entre todas as amostras.

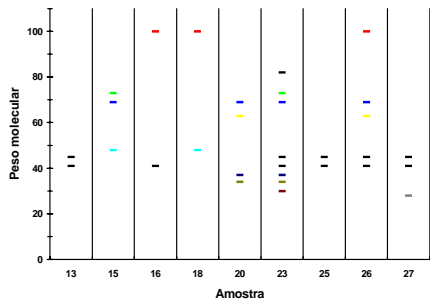


Figura 3 - Western blot: padrão de reconhecimento do soro anti-13

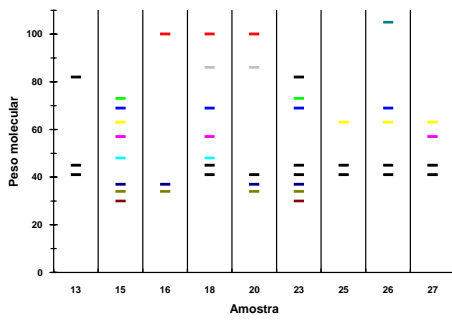


Figura 4 - Western blot: padrão de reconhecimento do soro anti-15.

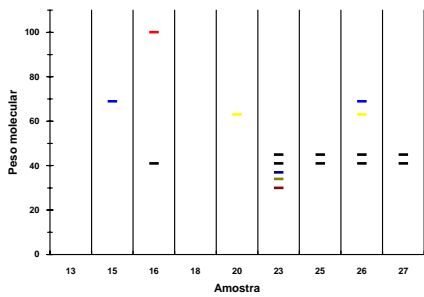


Figura 5 - Western blot: padrão de reconhecimento do soro anti-16

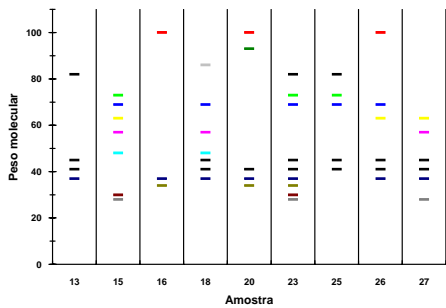


Figura 6 - Western blot: padrão de reconhecimento do soro anti-18.

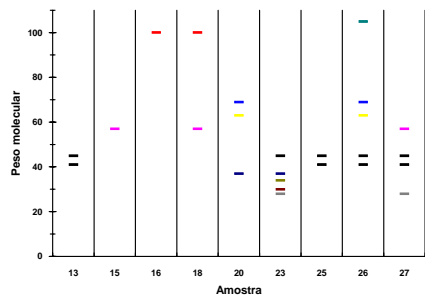


Figura 7 - Western blot: padrão de reconhecimento do soro anti-20.

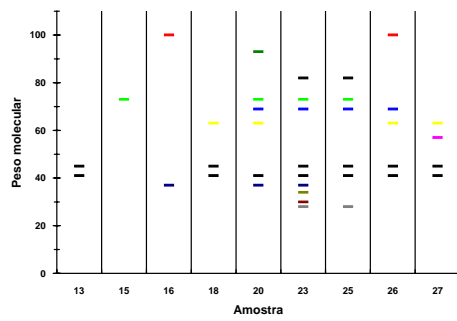


Figura 8 - Western blot: padrão de reconhecimento do soro anti-23.

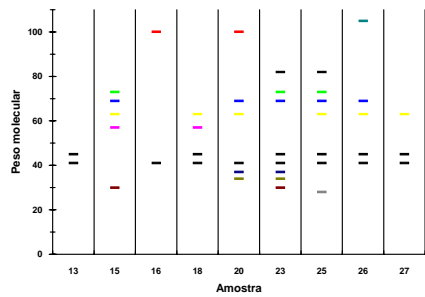


Figura 9 - Western blot: padrão de reconhecimento do soro anti-25.

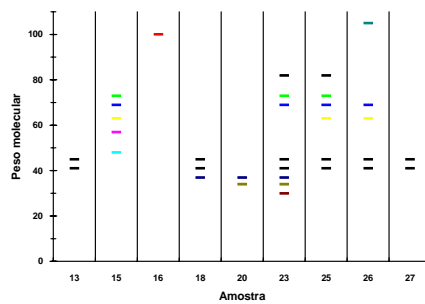


Figura 10 - Western blot: padrão de reconhecimento do soro anti-26.

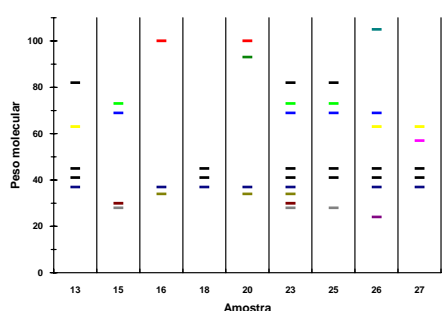


Figura 11 - Western blot: padrão de reconhecimento do soro anti-27.

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 100kDa, 93kDa, 86kDa, 73kDa e 69kDa. Já nas proteínas VPX, VP2, VP3 e VP4 houve uma constância, aparecendo valores de 48kDa, 37kDa, 34kDa e 28kDa. 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 uma perfil semelhante ao das amostras de campo, com diferenças apenas na VP1 onde os pesos moleculares encontrados são de 73kDa, 69kDa e 63kDa e na VP4 da amostra 26 onde aparece um peso de 24kDa. As demais proteínas são identificadas com os mesmos pesos moleculares dos encontrados nas amostras de campo. Nas Figuras de 3 a 11 aparecem, ainda, bandas caracterizadas com peso molecular de 57kDa 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 vacinados com vacinas produzidas com a amostra clássica do sorotipo 1 do VIBF. Vários estudos tem sido realizados com este objetivo, empregando diferentes técnicas. Assim, Jackwood & Saif (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 (1991), trabalhando com amostras purificadas do vírus da IBF encontrou as seguintes proteínas virais com seus respectivos pesos moleculares: VP1 (90kDa), VP2 (41kDa), VP3 (35kDa), VP4 (28kDa) e VPX (47kDa). Becht (1980), trabalhando com amostras de vírus altamente purificadas, encontrou pesos moleculares de 86kDa (VP1), 48kDa (VPX), 40kDa (VP2), 32kDa (VP3) e 28kDa (VP4). A proteína viral 1 não foi plenamente identificada no “western” do sorotipo 1, com o peso molecular referido no trabalho de Todd & McNulty (1979), que encontraram valores de 97, 56 e 53kDa, diferindo dos aqui encontrados, que foram 100, 73, 69, 63 e 57kDa. Entretanto, nas provas com as amostras de campo e de vacina do presente experimento, aparece uma banda, com peso molecular de 86kDa, que é referida no trabalho de Becht (1980) como sendo a proteína viral VP1.

No experimento ora discutido, foi encontrada uma proteína com peso molecular de 48kDa, o que está de acordo com os resultados de Todd & McNulty (1979) e de Becht (1980), e muito próximo do relatado por Dobos(1991), que designou de VPX a proteína viral precursora da VP2, com peso molecular de 47kDa. 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 42kDa. Fahey et al. (1985) relacionaram o peso molecular de 37kDa com a VP2. Já Müller & Becht (1982) encontraram para a mesma proteína um peso de 40kDa. Dobos (1979), comparando as proteínas do vírus da Infecção da Bolsa de Fabrício, relatou que a VP2 tinha um peso molecular de 41kDa. Jackwood et al. (1985) diferiram dos outros autores, encontrando um peso molecular de 42kDa para a proteína VP2. Nenhum dos pesos moleculares relatados acima apareceu no “western” da amostra padrão do presente experimento. Mas, quando se analisam os “western” das Figuras 4 a 12, aparece uma banda com 37kDa, concordando com o trabalho de Fahey et al. (1985). O registro de um peso molecular de 30kDa indicou a presença da proteína viral VP3, que é o mesmo encontrado por Todd & 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 et al. (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 37kDa, o mesmo valor referido por Fahey et al. (1985). A VPX foi caracterizada apenas nas amostras 15 e 18 com um peso de 48kDa, o mesmo que é relatado por Müller & 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 100kDa, 93kDa, 86kDa, 73kDa e 69kDa, 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 51kDa e 95kDa. Apenas na amostra 18 aparece o peso de 86kDa, 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 et al. (1979) e Jackwood et al. (1985). Na amostra 18 foi encontrada uma

banda com peso de 28kDa, o que caracteriza a VP4, de acordo com o trabalho de Müller & 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 37kDa 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 (48kDa). Nestas amostras a VP1 aparece com peso molecular de 73kDa e 69kDa, diferindo dos encontrados nas amostras de campo. A VP3 foi determinada apenas na amostra 23, com peso de 34kDa. Já a VP4 aparece nas amostras 23, 25 e 27 com peso de 28kDa e foi encontrada na amostra 26 com peso molecular de 24kDa que é referido por Todd & McNulty (1979) também como sendo da VP4.

Ao analisarem-se as Figuras de 4 a 12, observa-se uma banda de 57kDa 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 & Becht (1982), relatam diferenças quando o vírus da DIB é replicado em cultura de tecidos ou diretamente na bolsa de Fabrício.

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 & Hamilton 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 & Wendelstein (1982) 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 (1997) et al. 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

- 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*. Great Britain, v. 69, p. 631-640, 1988.
- BURNETTE, W. N. "Western Blotting": Electroforetic 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*, Iowa, 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*, Great Britain, v. 66, p. 1479 - 1488, 1985.
- HEINE, H. G.; HARITOU, M.; FAILLA, P.; FAHEY, K.; AZAD, A. Sequence Analysis and Expression of the Host-Protective Immunogen VP2 of a Variant Strain of Infectious Bursal Disease Virus which Can Circumvent Vaccination with Standard Type Strains. *Journal of General Virology*, v. 72, p. 1835-1843, 1991.
- 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, Iowa*, v. 26, n. 4, p. 871-872, 1982.
- JACKWOOD, D. J. & SAIF, Y. M. Diversity of Infectious Bursal Disease Viruses. *Avian Diseases, Iowa*, 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, Iowa*, 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, Great Britain*, 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.; John Barnes, H.; Beard, C. W.; Reid, W. M.; Yoder Jr. H. W. (Eds.) *Diseases of Poultry*, Iowa State University Press, Ames, Iowa, p. 648-663, 1991.
- 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. *Conferência APINCO'97 de Ciência e Tecnologia Avícolas*. 1997, São Paulo, Brasil.
- 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.
- MÜLLER, H.; LANGE, H.; BECHT, H. Formation, Characterization and Interfering Capacity of a Small Plaque Mutant and of Incomplete Virus Particle of Infectious Bursal Disease Virus. *Virus Research*, v. 4, p. 297-309, 1986.
- 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.

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*, Iowa, v.33, p. 753-759, 1989.

SALLE, C.T.P. Importância dos Anticorpos Maternais 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. Associação dos Médicos Veterinários Especialistas em Avicultura, 1992.

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*, Great Britain, 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.; SAYF, Y.M. Structural Proteins of Classic and Variant Strains of Infectious Bursal Disease Viruses, *Avian Diseases*, Iowa, 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.

## ARTIGO 2

### DOENÇA INFECCIOSA BURSAL: AVALIAÇÃO DA PATOGENICIDADE DE VACINAS COMERCIAIS NO BRASIL EM AVES LIVRES DE PATÓGENOS ESPECÍFICOS

### INFECTIOUS BURSAL DISEASE: EVALUATION OF PATHOGENICITY OF COMMERCIAL VACCINES FROM BRAZIL IN SPECIFIC PATHOGENS FREE CHICKENS

HAMILTON LUIZ DE SOUZA MORAES<sup>1,2</sup>

CARLOS TADEU PIPPI SALLE<sup>1</sup>

ADRIANA PADILHA DE PADILHA<sup>1</sup>

CLAUDIO WAGECK CANAL<sup>1</sup>

JACQUELINE OURIQUES ARTENCIO<sup>1</sup>

ROSECLER ALVES PEREIRA<sup>3</sup>

LUCAS BRUNELLI MORAES<sup>1</sup>

ANA CRISTINA GONÇALVES PINTO DA ROCHA<sup>1</sup>

1- CENTRO DE DIAGNÓSTICO E PESQUISA EM PATOLOGIA AVIÁRIA-  
CDPA/UFRGS

Av. Bento Gonçalves, 8824, Bairro Agronomia, CEP 91540 000, Porto Alegre, RS, Brasil

hamilton.souza.moraes@ufrgs.br

2- Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Luterana do Brasil-  
ULBRA

3- Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Passo Fundo-UPF

## INTRODUÇÃO

A doença infecciosa bursal (DIB) é uma enfermidade viral das galinhas que acomete, principalmente, aves jovens sendo, dessa forma, economicamente, importante para a avicultura industrial (Van Den Berg, 2000). Em consequência do seu reconhecimento como uma doença capaz de causar perdas econômicas significativas para a avicultura industrial, em várias partes do mundo, foram desenvolvidos inúmeros tipos de vacinas, assim como programas de vacinação, com o objetivo de prevenir essa enfermidade. Os diferentes programas de vacinação, recomendados para pintos nos primeiros dias de vida, esbarram no paradoxo que se estabelece que é o de hiperimunizar reprodutoras com o objetivo de proteger a progênie e vacinar essa mesma progênie o mais cedo possível. Solano et. al. (1986) avaliaram o efeito dos anticorpos maternos sobre a vacinação inicial de pintos contra o vírus da doença de Gumboro e observaram que a melhor resposta imune foi obtida quando a vacina foi aplicada aos 28 dias de idade. Kumar et al. (2000) concluíram que a idade ideal para a vacinação deveria ser aos 21 dias de idade, momento em que os anticorpos maternos não são mais detectáveis e, portanto, não poderiam interferir na atuação do vírus vacinal. Pejkovski et. al. (1979) ao avaliarem o efeito imunossupressor da doença infecciosa da bolsa sobre a vacinação contra a bronquite infecciosa observou que, geralmente, animais mais jovens inoculados com o vírus da DIB (VDIB) eram mais susceptíveis à



bronquite infecciosa que animais, igualmente, inoculados para VDIB em idades mais avançadas. Embora o tempo de persistência dos anticorpos maternos na progênie seja variável, pois depende do “status” imunológico das reprodutoras, no momento em que sabemos o nível de anticorpos no primeiro dia de vida, podemos estimar o tempo de persistência dos mesmos e, dessa forma, estabelecer o melhor momento para a vacinação (Alam et. al, 2002).

A imunossupressão está diretamente relacionada com o nível de integridade histológica da bolsa de Fabrício (Iván et. al., 2001). Por isso, as observações feitas anteriormente, estão intimamente relacionadas ao fato de algumas vacinas apresentarem a capacidade de induzir lesões bursais iguais ou superiores às provocadas pelo vírus de campo. Luengo et. al. (2001), avaliaram a severidade de lesões, macroscópicas e microscópicas, causadas pela infecção do VDIB em 3 grupos de animais vacinados, às quatro semanas de idade, com uma vacina comercial intermediária contendo vírus vivo. Observaram, sete semanas após a vacinação, atrofia e diminuição da relação peso da bolsa/peso corporal, o que poderia sugerir que foi produzida uma redução da imunidade dos frangos após a vacinação. Em um segundo experimento, os animais foram desafiados com uma amostra clássica da DIB e as lesões se constituíram em necrose folicular, depleção linfocitária, além de inflamação aguda, edema, hemorragia e infiltração de heterófilos. Kim et. al. (1999) estudaram o efeito, a longo prazo, da infecção pelo vírus da DIB avaliando a restauração das lesões da bolsa de Fabrício após a inoculação de pintos, no primeiro dia de vida, com

uma vacina que continha uma cepa intermediária e outra com uma cepa virulenta. Inicialmente, o vírus causou uma extensa necrose dos linfócitos B da bolsa. Essa lesão esteve acompanhada por uma infiltração de linfócitos T. Com o passar do tempo, a necrose da bolsa desapareceu e a população de linfócitos B, nos folículos, foi restabelecida parcialmente. Porém essa repopulação ocorreu, mais rapidamente, nos pintos expostos à vacina que continha cepa intermediária, sendo que, às sete semanas após a inoculação, essa repopulação foi de 80% nos folículos da bolsa dos animais expostos à vacina que continha a cepa intermediária e 40% naqueles que receberam àquela com cepa virulenta.

O presente trabalho tem por objetivo contribuir na escolha das vacinas para programas de vacinação de acordo com a virulência de cada amostra e as necessidades do setor avícola.

## MATERIAIS E MÉTODOS

### Vacinas

Foram utilizadas 03 amostras de vacinas com vírus de patogenicidade intermediária (I1, I2, I3), 02 vacinas com vírus intermediário mais patogênico (IP4, IP5) e 03 vacinas com vírus “forte” (F6, F7, F8) preparadas conforme especificação dos fabricantes.

### Aves

Foram utilizadas 120 aves livres de patógenos específicos (LPE) divididas em 9 grupos, sendo 8 para as diferentes vacinas e 1 grupo controle, criadas em baterias, mantidas em unidades de isolamento e alimentadas ad libitum.

### Desafio

As aves foram desafiadas, com uma dose, através da via ocular, com 08 amostras de vacinas aos 21 dias de idade e sacrificadas aos 28 dias.

### Bursometria

As aves foram pesadas e o diâmetro das bolsas de Fabrício (BF) foi medido através de uma régua Bursômetro<sup>®</sup> (Fort Dodge<sup>®</sup> Saúde Animal) na qual os orifícios apresentam uma variação em uma escala de 1 a 8.

### Peso relativo da bolsa de Fabrício

As aves foram pesadas e logo após a retirada da BF a mesma foi, também, pesada para a obtenção do peso relativo através da razão entre o PB e o PC multiplicada por 1000.

## Histopatologia

As bolsas de Fabrício coletadas, foram fixadas em formol a 10% tamponado e clivadas, transversalmente, na região mediana. Após o corte, as porções obtidas foram desidratadas, clarificadas e impregnadas em parafina, seccionadas, coradas com hematoxilina e eosina e classificadas pelo nível de lesões encontradas conforme Muskett et al. (1979), sendo que cada score, numerados de 0 a 5, representa o grau de depleção linfocitária correspondente a normal, < de 24%, 25 – 49%, 50-69%, 70-89% e >de 90% respectivamente.

## ELISA

As aves foram sacrificadas, aos 28 dias, e o soro foi coletado para a realização da medida de anticorpos para VDIB através da técnica de ELISA com o “kit” comercial Civites<sup>TM</sup> AVI IBD, Laboratórios Hipra S.A.

## Análise Estatística

Os dados foram analisados através da utilização do programa de computador Sigmastat Statistical<sup>TM</sup>, Software Version 2.0 SPSS Inc. e Minitab<sup>TM</sup> Statistical Version 13.2, Minitab Inc.

## RESULTADOS

Diferenças entre os diâmetros da bolsa de Fabrício de acordo com as distintas vacinas

Foi realizada a comparação entre os diâmetros das bolsas de Fabrício para cada uma das vacinas utilizadas. Observou-se que as vacinas I1, I2, I3 não induziram diferenças, quanto ao tamanho da bolsa, nos animais inoculados em relação ao grupo controle. Já os animais que receberam as vacinas IP1, IP2, F1, F2 e F3 apresentaram tamanho de bolsa, significativamente, menor quando comparadas com o grupo controle. Os tamanhos de bolsa foram maiores para os animais que receberam a vacina I1, I2, I3 quando comparados aos que receberam as vacinas IP1, IP2, F1, F2 e F3. A Tabela 1 mostra as médias e desvios padrões obtidos a partir dos diâmetros das bolsas de acordo com as diferentes vacinas.

TABELA 1 - Médias e desvios padrões dos diâmetros de bolsas de Fabrício de acordo com as distintas vacinas

vacinas	n	$\bar{y}$	s
Controle	10	4.8 <sup>a</sup>	0.63
I1	10	4.4 <sup>a</sup>	0.51
I2	10	4.3 <sup>a</sup>	0.48
I3	10	4.8 <sup>a</sup>	0.63
IP1	10	3.5 <sup>b</sup>	0.52
IP2	10	3.2 <sup>b</sup>	0.42
F1	10	2.9 <sup>b</sup>	0.31
F2	10	3.0 <sup>b</sup>	0.00
F3	10	2.9 <sup>b</sup>	0.31

Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa ( $p < 0,05$ )  
 $y$ - médias;  $s$  – desvios padrões;  $p$  – valor de probabilidade do teste de análise de variância

Diferenças entre os pesos relativos da bolsa de Fabrício de acordo com as distintas vacinas

Através da obtenção do peso relativo das bolsas de Fabrício observamos que as vacinas intermediárias (I1, I2 e I3) não foram capazes de induzir redução no tamanho da bolsa a ponto de diferenciá-las do grupo controle. Já as vacinas intermediárias mais patogênicas (IP1 e IP2) e fortes (F1, F2 e F3) revelaram a capacidade de causar redução suficiente, no tamanho da bolsa, que as diferenciou tanto do grupo controle, quanto do grupo de aves que recebeu as vacinas intermediárias (I1, I2 e I3). A Tabela 2 apresenta as médias e desvios padrões obtidos a partir dos pesos relativos das bolsas de Fabrício de acordo com as diferentes vacinas empregadas.

TABELA 2 - Médias e desvios padrões dos pesos relativos correspondentes às diferentes vacinas

Vacina	n	y	s
Controle	10	5.88 <sup>a</sup>	0.90
I1	10	5.88 <sup>a</sup>	1.38
I2	10	6.06 <sup>a</sup>	1.64
I3	10	7.22 <sup>a</sup>	1.20
IP1	10	3.05 <sup>b</sup>	1.15
IP2	10	2.62 <sup>b</sup>	0.81
F1	10	1.74 <sup>b</sup>	0.41
F2	10	2.00 <sup>b</sup>	0.40
F3	10	1.75 <sup>b</sup>	0.46

Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa (  $p < 0,05$ )  
y - médias; s – desvios padrões; p – valor de probabilidade do teste de análise de variância

Diferenças entre os títulos de anticorpos promovidos pelas diferentes vacinas

Os títulos de anticorpos contra IBDV foram mensurados, através da técnica ELISA, para as distintas vacinas. Foi possível observar que I3 não apresentou diferença do grupo controle diferindo de todas as demais vacinas. I1 e IP1 desenvolveram comportamento semelhante em relação ao título de anticorpos produzido, demonstrando diferença em relação ao grupo controle e semelhança com IP2 e as vacinas fortes. Não obstante, I2 promoveu a formação de um título de anticorpos semelhante às vacinas I1 e IP1, porém, diferiu de IP2 e das vacinas fortes. A vacina intermediária mais patogênica (IP2) e as vacinas fortes (F1, F2 e F3) não diferiram entre si.

A Tabela 3 apresenta as medianas obtidas a partir dos títulos de anticorpos promovidos pelas diferentes vacinas.

TABELA 3 – Medianas dos títulos de anticorpos produzidos pelas diferentes vacinas

Vacinas	n	medianas
Controle	9	2.40 <sup>a</sup>
I1	10	3.28 <sup>bc</sup>
I2	9	3.00 <sup>b</sup>
I3	10	2.23 <sup>a</sup>
IP1	10	3.36 <sup>bc</sup>
IP2	10	3.69 <sup>c</sup>
F1	10	3.77 <sup>c</sup>
F2	10	3.67 <sup>c</sup>
F3	10	3.77 <sup>c</sup>

Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa ( $p < 0,05$ )  
Teste Kruskal-Wallis

Diferenças entre os escores de lesões histológicas da bolsa de Fabrício de acordo com as diferentes vacinas

As lesões histológicas, provocadas por cada uma das vacinas, nas bolsas de Fabrício foram avaliadas. Foi possível observar que as vacinas intermediárias I1, I2 e I3 não demonstraram diferenças significativas entre si. Entretanto, enquanto I2 e I3 mostraram semelhança com o grupo controle, I1 mostrou-se diferente.

As vacinas intermediárias mais patogênicas (IP1 e IP2) e as vacinas fortes (F1, F2 e F3) foram, significativamente, semelhantes entre si, diferindo tanto do grupo controle quanto das intermediárias I1, I2 e I3. A Tabela 4 apresenta as



medias obtidas a partir dos escores de lesões histológicas das diferentes vacinas.

TABELA 4 – Medias dos escores de lesões histológicas das diferentes vacinas

Vacinas	n	medias
Controle	10	1.00 <sup>a</sup>
I1	10	2.00 <sup>b</sup>
I2	10	1.50 <sup>ab</sup>
I3	10	1.00 <sup>ab</sup>
IP1	10	4.00 <sup>c</sup>
IP2	10	4.00 <sup>c</sup>
F1	10	4.00 <sup>c</sup>
F2	10	3.00 <sup>c</sup>
F3	10	4.00 <sup>c</sup>

Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa ( $p < 0,05$ )  
Teste Kruskal-Wallis

## DISCUSSÃO e CONCLUSÃO

A partir da análise dos escores histopatológicos de lesão bursal e de diâmetro de bolsa, observou-se que não existe nenhuma correlação entre os dois parâmetros. Esse fato reforça a hipótese de que a bursometria é um exame menos sensível para a avaliação vacinal do que o exame histopatológico. Moraes et. al. (submetido) trabalhando com aves vacinadas no 1º dia de vida e desafiadas com amostras muito virulentas do vírus da DIB, não encontraram correlação entre diâmetro da BF e doença ou vacinação. Em outro trabalho realizado nesta instituição, no qual foi realizada uma monitoria da doença de Gumboro comparando-se o exame histopatológico aos resultados obtidos na bursometria, observou-se que de 155 indivíduos que apresentaram escore histopatológico compatível com doença, 137 foram considerados bem imunizados através da bursometria. Esse fato pode ocorrer em função da bursometria não levar em consideração o peso das aves, pois aves doentes com peso corporal maior do que aves leves vacinadas podem apresentar bolsas de um mesmo diâmetro, embora as primeiras estejam atrofiadas (Pereira et. al, submetido)

Através da avaliação sorológica, foi possível observar que algumas vacinas intermediárias possuem a capacidade de promover a formação de um título de anticorpos semelhante ao das vacinas fortes. Rautenschlein et. al., (2002) detectaram, em seu experimento, que a cepa intermediária testada induziu a formação de um título de anticorpos, significativamente, semelhante ao da cepa

muito virulenta no decorrer de 29 dias de observação. Não obstante, no presente trabalho, as cepas intermediárias (IP1 e IP2) estimularam o desenvolvimento de um título de anticorpos, contra VDIB, semelhante ao das vacinas fortes. Porém, cabe salientar que não é sabido se as vacinas utilizadas neste experimento e pelos autores citados possuem a mesma amostra do vírus da DIB.

Observou-se que a amostra I1 promoveu o desenvolvimento de um título de anticorpos semelhante ao das vacinas fortes, sendo que a lesão histológica correspondente, foi, significativamente, menor do que àquele provocado por F1, F2 e F3. É possível que algumas vacinas intermediárias confirmem proteção adequada aos animais, no que se refere ao título de anticorpos, causando mínimas lesões bursais. Entretanto, devemos considerar a relação antigênica entre os vírus vacinais empregados e o vírus utilizado no “kit” ELISA. Esse poderia conter uma amostra viral semelhante a da vacina I1 e, dessa forma, detectar mais anticorpos, apresentando um resultado diferente do esperado.

Ezeokoli et. al. (1990) avaliaram alterações histológicas das bursas de Fabrício associadas com a vacinação contra a DIB em galinhas. Apesar de relatarem severas lesões bursais entre 3 e 7 dias pós- vacinação os autores sugerem um programa de vacinação que contemple os primeiros dias de vida baseando-se na observação que até os 15 dias pós-vacinação as aves alcançaram uma recuperação total do tecido bursal não havendo diferença distinguível entre as mesmas e o grupo controle. Essas afirmações devem ser consideradas com cautela, pois os autores não informaram quais as amostras

vacinais utilizadas. Por outro lado, esse achado discorda da observação feita por Kim et al. (1999) no qual, observando o efeito, a longo prazo, da infecção pelo vírus da DIB com vacinas contendo cepas intermediárias e virulentas, concluiu que o desaparecimento da necrose da bolsa e o restabelecimento da população de linfócitos B, nos folículos, foi parcial. Sendo que, às sete semanas após a inoculação, essa repopulação foi de 80% nos folículos da bolsa dos animais expostos à vacina que continha a cepa intermediária e 40% naqueles que receberam àquela com cepa virulenta. Dessa forma, a utilização de vacinas que são, comprovadamente, capazes de promover acentuado grau de lesão no sistema linfóide merece especial atenção, uma vez que o grau de recuperação dos folículos da bolsa pode não ser total. Além disso, o tempo necessário para a repopulação folicular pode ser suficiente para tornar o animal suscetível a diversas patologias.

O presente trabalho revela que as vacinas intermediárias mais patogênicas e as vacinas fortes são capazes de promover severos danos na bolsa dos animais inoculados, promovendo depleção linfocitária correspondente à, aproximadamente, 90%. Ressalte-se que lesões histológicas similares a estas são consideradas como produzidas pelos vírus patogênicos no campo sendo, portanto, compatíveis com doença. Sendo assim, antes de determinarmos quais amostras vacinas a serem utilizadas em um programa de vacinação, o grau de patogenicidade das mesmas deveria ser levado em consideração.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alam, J., Rahman, M.M., Sil, B.K., Khan, M.S.R., Giasuddin Sarker, M.S.K. Effect of maternally derived antibody on vaccination against infectious bursal disease ( Gumboro ) with live vaccine in broiler. *International Journal of Poultry Science* 2002 ;1 ( 4 ): 98-101.

Ezeokoli, C. D., Jtyondo, E. A ., Nwannenna, A . I., Umoh, J.U. Immunossupression and histopathological changes in the bursa of Fabricius associated with infectious bursal disease vaccination in chicken. *Comparative Immunology Microbiology Infectious Diseases* 1990; 13(4):181-8.

Iván, J., Nagy, N., Magyar, A ., Kacskovics, I., Mészáros. Functional restoration of the bursa of Fabricius following in ovo infectious bursal disease vaccination. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 2001; 79, 235-248.

Kim, J., Gagic, M., Sharma, J. M. Recovery of antibody-producing ability and lymphocyte repopulation of bursal follicles in chickens exposed to infectious bursal disease virus. *Avian Diseases* 1999; 43:401-413.

Kumar, K., Singh, K.C.P., Prasad, C.B. Immune responses to intermediate strain IBD vaccine at different levels of maternal antibody in broiler chickens. *Tropical Animal Health and Production* 2000; 32 ( 6 ), 357-360.

Luengo, A., Butcher, G., Kozuka, Y., Miles R. Histopathology and transmission electron microscopy of the bursa of Fabricius following IBD vaccination and IBD virus challenge in chickens. *Revista científica, FCV-LUZ* 2001;vol. XI, nº6, 533-544.

Moraes, H.L.S.; Salle, C.T.P.; Nascimento, V.P.; Salle, F.O.; Souza, G.F.; Dalmagro, M.R.; Furian, T.Q.; Barbosa, E.F. Doença de Gumboro: avaliação da imunidade materna e da proteção conferida pela vacinação no primeiro dia de vida, frente ao desafio com uma amostra muito virulenta do vírus. *Brazilian Journal of Poultry Science* (enviado para publicação).

Muskett, J.C., Hopkins, I. G., Edwards, K.R., Thornton, D.H. Comparison of two infectious bursal disease vaccine strains and potential hazards in susceptible and maternally immune birds. *Veterinary Record* 1979; v.104, 332 – 334.

Pejkovski, C., Davellar, F.G., Kouwenhoven, B. Immunosuppressive effect of infectious disease virus on vaccination against infectious bronchitis. *Avian Pathology* 1979; 8:95-106.

Pereira, R. A.; Fallavena, L.C.B.; Moraes, H.L.S.; Rodrigues, O.; Moraes, L.B.; Garcia, D.M.; Nascimento, V.P.; Reali, E.H., Salle, C.T.P. Monitoria da doença de Gumboro: Histopatologia versus Bursometria. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science* 2004 ( submetido ).

Solano, W., Giambone, J.J., Williams, J.C., Lauerman, L.H., Panangala, V.S., Garces, C. Effect of maternal antibody on timing of initial vaccination of young White Leghorn chickens against infectious bursal disease virus. *Avian Diseases* 1986; vol. 30, n°4, 648-652.

Van den Berg, T.P. Acute infectious bursal disease in poultry: a review. *A Pathology* 2000; 29, 175-194.

Artigo 3

**DOENÇA INFECCIOSA BURSAL: AVALIAÇÃO DA IMUNIDADE MATERNA E DA PROTEÇÃO CONFERIDA PELA VACINAÇÃO NO PRIMEIRO DIA DE VIDA, FRENTE AO DESAFIO COM UMA AMOSTRA MUITO VIRULENTE DO VÍRUS.**

**INFECTIOUS BURSAL DISEASE: EVALUATION OF MATERNAL IMMUNITY AND THE PROTECTION CONFERRED BY VACCINATION IN THE FIRST DAY OF LIFE, AGAINST THE CHALLENGE WITH A ISOLATE VERY VIRULENT OF THE VIRUS.**

HAMILTON LUIZ DE SOUZA MORAES <sup>1,2</sup>

CARLOS TADEU PIPPI SALLE<sup>1</sup>

VLADIMIR PINHEIRO DO NASCIMENTO<sup>1</sup>

FELIPE DE OLIVEIRA SALLE<sup>1</sup>

GUILHERME FONSECA DE SOUZA<sup>1</sup>

MARCELO RODRIGO DALMAGRO<sup>1</sup>

THALES QUEDI FURIAN<sup>1</sup>

EDUARDO FRAINER BARBOSA<sup>1</sup>

- 1- CENTRO DE DIAGNÓSTICO E PESQUISA EM PATOLOGIA AVIÁRIA – CDPA/UFRGS  
Av. Bento Gonçalves, 8824, Bairro Agronomia, CEP 91540 000, Porto Alegre, RS  
hamilton.souza.moraes@ufgrs.br
- 2- Faculdade de Veterinária- Universidade Luterana do Brasil -ULBRA

## INTRODUÇÃO

A doença infecciosa bursal (DIB) é uma doença viral aguda e altamente contagiosa de aves jovens, descrita pela primeira vez por Cosgrove (1962) e denominada de doença de Gumboro(DG). Winterfield et al. (1972) descreveram a infectividade, as lesões e a persistência do vírus da DIB nas galinhas. A imunossupressão causada pelo vírus foi demonstrada por diversos pesquisadores, entre eles Sharma et al. (2000), que descreveram o efeito imunossupressor do vírus usando a toxina do tétano e a *Brucella abortus*, para mostrar que havia o comprometimento da imunidade humoral, celular e inata. Os sinais clínicos ocorrem em 10 a 20 % dos lotes afetados e a mortalidade está entre 10 e 20 % (Ley et al 1983). A DIB é endêmica nas galinhas da avicultura industrial e é considerada uma das doenças infecciosas economicamente mais importantes (Shane, 1994). A estabilidade do vírus no meio ambiente dificulta a sua inativação e a vacinação é considerada a melhor maneira de se controlar a doença (Van den Berg & Meulemans, 1991). Desde 1997, amostras altamente virulentas do VDIB foram detectadas no Brasil (Di Fabio et al. 1999), causando alta mortalidade e grandes prejuízos econômicos. Ikuta et al. (2001) examinaram 48 lotes comerciais de galinhas, encontrando amostras positivas para DIB por RT-PCR, amostras vacinais em 12 lotes, uma amostra clássica em um lote, quatro novos padrões em 31 lotes e uma amostra compatível com as amostras muito virulentas descritas na Europa e na Ásia, em quatro lotes. As reprodutoras são hiperimunizadas com várias vacinas vivas



e inativadas em adjuvante oleoso, permitindo uma boa proteção a estas aves e, ao mesmo tempo passando altos níveis de anticorpos para a progênie (Sharma et al., 1989). Naqi et al. (1983), trabalhando com pintos vacinados e não vacinados contra a DIB com altos títulos de anticorpos, observaram que nos pintos vacinados aos três dias de idade não havia resposta para a vacinação com amostra de virulência intermediária e que as aves eram refratárias ao desafio com uma amostra clássica do vírus da DIB. Tsukamoto et al. (1995) utilizando três vacinas comerciais do Japão conseguiram, com uma delas, elaborada com amostra intermediária do vírus, até 100% de proteção quando as aves eram vacinadas aos 20 dias e desafiadas 10 dias após com uma amostra muito virulenta do VDIB. Sugeriram também, que cada lote tem seu tempo certo para a vacinação. Na prática, diferentes esquemas de vacinação são recomendados e utilizados mas, apesar disso, surtos da doença têm acontecido em todo o Brasil. O presente estudo foi realizado para investigar o papel que os anticorpos maternos desempenham, em aves vacinadas e não vacinadas no primeiro dia de vida, na proteção contra o desafio por uma amostra muito virulenta do vírus, isolada no Brasil.

## MATERIAL E MÉTODOS

**Aves:** foram utilizados 960 pintos de uma linhagem comercial com um dia de idade, provenientes de reprodutoras vacinadas contra a DIB, de duas empresas avícolas. As aves foram divididas em quatro grupos: um grupo de aves vacinadas e não vacinadas da empresa A e grupos semelhantes da empresa B. As aves foram alimentadas ad

libitum com ração comercial, fornecida pelas empresas participantes do experimento, e criadas em baterias mantidas em unidades de isolamento.

Vacinação das reprodutoras contra a DIB: empresa A: 1<sup>o</sup> dia subcutânea intermediária; 7<sup>o</sup> dia intermediária ocular; 42<sup>o</sup> dia intermediária ocular; 77<sup>o</sup> dia intermediária na água; e no 140<sup>o</sup> dia inativada em adjuvante oleoso, intra-muscular. Empresa B: 8<sup>o</sup> dia intermediária ocular; 21<sup>o</sup> dia intermediária ocular; 35<sup>o</sup> dia intermediária na água; 105<sup>o</sup> dia intermediária na água; e no 140<sup>o</sup> dia inativada em adjuvante oleoso, intra-muscular.

Vacina: a vacina utilizada para imunizar os pintos de ambas as empresas, foi uma amostra intermediária do vírus, de uma vacina comercial utilizada no Brasil, com título de  $10^{3,2}$  DIE<sub>50</sub>/mL. Cada ave recebeu uma dose da vacina, recomendada pelo fabricante, meia dose por via ocular e meia dose por nasal, no 1<sup>o</sup> dia de vida.

Inóculo para desafio: os VDIB de uma amostra de bolsa de Fabrício de um caso clínico de DIB foram caracterizados através da prova de PCR/RFLP, correspondendo ao tipo genômico 11 (G11, Ikuta et al. 2001) uma amostra muito virulenta do vírus, e denominada de GAR-1. A PCR também foi utilizada para a pesquisa do vírus da anemia infecciosa e de reovirus, dando resultados negativos. A amostra foi titulada em ovos embrionados livres de patógenos específicos (LPE) e o inóculo foi diluído e preparado conforme Nunoya et al. (1992) a  $10^4$  DIE<sub>50</sub>/mL e 100 µL foram utilizados para desafiar cada ave.

Desafio: 20 aves de cada grupo foram desafiadas a cada 03 dias, a partir do 1<sup>o</sup> dia de vida. Assim sendo, além deste desafio inicial, foram desafiadas aos 4, 7, 10, 13, 16,

19 e 22 dias de idade, com 100µL, via ocular, da amostra GAR-1, divididos em partes iguais nos dois olhos. Os materiais foram coletados 120 h após o desafio. Antes de cada desafio, 10 aves de cada grupo foram coletadas para servirem de controle.

Sorologia: as 20 aves desafiadas e os 10 controles de cada grupo foram sangradas e o soro coletado para titular os anticorpos contra a DIB, através de ELISA, com um “kit” comercial, CIVTEST™ AVI IBD, Laboratórios Hipra, S.A..

Diâmetro: as 30 bolsas de Fabrício de cada grupo foram retiradas, passadas nos orifícios do Bursômetro (Fort Dodge Saúde Animal Ltda.) e seu tamanho anotado.

.Peso relativo da bolsa de Fabrício: as aves, 30 de cada grupo, foram pesadas, sacrificadas e necropsiadas. As bolsas foram retiradas íntegras, e pesadas. O peso relativo foi calculado pela fórmula  $\text{peso da bolsa} \div \text{peso corporal} \times 1000$  (PB/PCx1000).

Histologia: as bolsas de Fabrício das 30 aves de cada grupo foram coletadas íntegras e fixadas em formol tamponado a 10%. Posteriormente, eram clivadas medialmente e coradas com H&E, para posterior exame. Após observação microscópica, as lesões foram agrupadas em escores de 1 a 5, conforme Muskett et al. (1979).

Avaliação da DIB: as aves foram consideradas doentes quando na necropsia apresentavam lesões de edema gelatinoso na bolsa de Fabrício e lesões histológicas com índices superiores a 3.

Análise estatística: os resultados foram examinados através do programa Sigmastat  
Statistical Software Version 2.0 SPSS Inc. e Minitab™ Statistical Software Version  
13.2, Minitab Inc.

## RESULTADOS

Anticorpos maternos: antes de cada desafio, foi coletado sangue para medir o título de anticorpos maternos e a sua queda natural até os 22 dias de idade, dos frangos vacinados e não vacinados. Como mostra a Tabela 1, não houve diferença significativa entre as médias das aves vacinadas e não vacinadas, havendo diferença somente entre as empresas.

Tabela 1 – Média dos títulos de anticorpos maternos ( $\log_{10}$ ), medidos por Elisa, antes dos desafios<sup>1</sup>, das aves vacinadas e não vacinadas e por empresa.

		y	s	n
Tratamento	Vacinadas	3,00* <sup>a</sup>	0,78	149
	Não vacinadas	3,03 <sup>a</sup>	0,73	149
Empresa	A	2,87 <sup>a</sup>	0,78	152
	B	3,17 <sup>b</sup>	0,69	146

y = média, s= desvio padrão, n= número de amostras

\*Letras diferentes significam diferenças significativas entre os dados na vertical  $P < 0,05$

Equação de regressão: com base nos resultados da queda dos anticorpos maternos foram elaboradas quatro equações de regressões, duas para cada empresa. Foram tomados os títulos médios de ELISA do primeiro ao oitavo desafio das aves vacinadas e das não vacinadas, e construídas quatro equações de regressão. Na Figura 1, são observadas uma equação e um gráfico da empresa A, onde a idade é a variável

dependente, e a Figura 2 expressa as mesmas observações da figura anterior, agora referentes à empresa B.

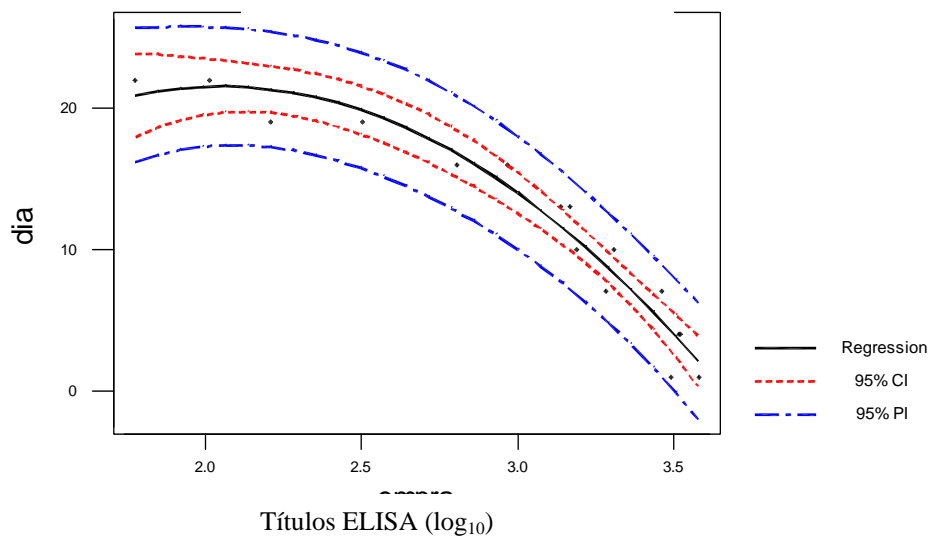


Figura 1- Queda dos anticorpos maternos entre o 1º. e o 22º. dias medidos por ELISA (log<sub>10</sub>), da empresa A, e sua respectiva equação de regressão

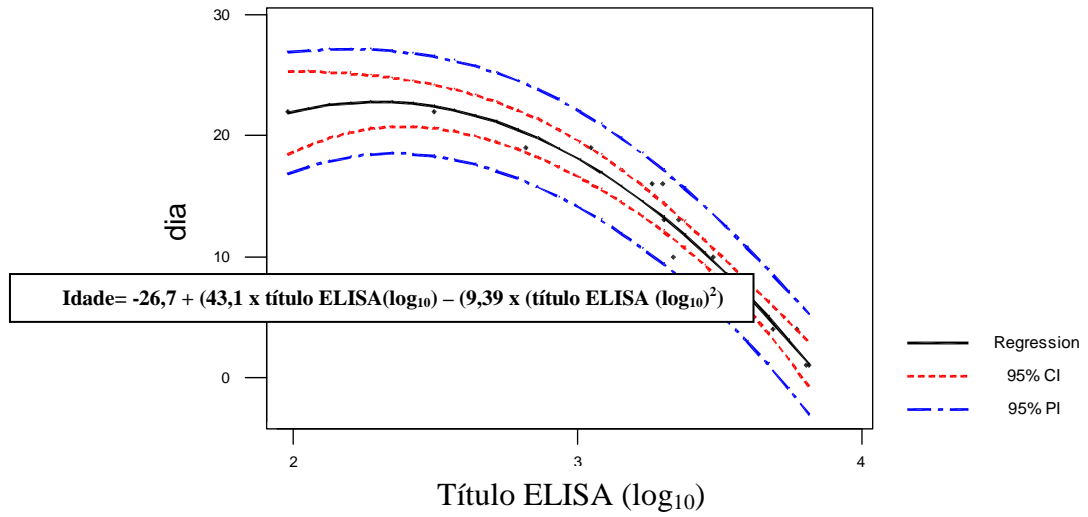


Figura 2- Queda dos anticorpos maternos entre o 1º. e o 22º. dias, medidos por ELISA ( $\log_{10}$ ) da Empresa B, e sua respectiva equação de regressão.



Empresa A: Título Elisa( $\log_{10}$ )=  $3,47 + (0,0303 \times \text{idade}) - (0,00457 \times \text{idade}^2)$

$R^2=96,0\%$   $R=96,5\%$   $n= 8$

Idade=  $-13,4 + (34,1 \times \text{título Elisa}(\log_{10}) - 9,39 \times (\text{título Elisa}(\log_{10})^2)$

$R^2=84,8\%$   $R=85,7\%$   $n=8$

Empresa B: Título Elisa( $\log_{10}$ )=  $3,71 + (0,0144 \times \text{idade}) - (0,00335 \times \text{idade}^2)$

$R^2=86,1\%$   $R=88,0\%$   $n=8$

Idade=  $-26,7 + (43,1 \times \text{título Elisa}(\log_{10}) - 9,39 \times (\text{título Elisa}(\log_{10})^2)$

$R^2=94,1\%$   $R=94,9\%$   $n=8$

Variáveis antes e depois do desafio: nas Tabelas de 2, 3, 4 e 5, são apresentados os títulos médios geométricos (GMT) de ELISA, o diâmetro, o peso relativo da bolsa de Fabrício, o índice histológico e a avaliação de doença, das aves vacinadas e não vacinadas, das empresas A e B.

Tabela – 2 Diâmetro, peso relativo da BF, lesões histológicas, títulos de anticorpos (ELISA) e avaliação clínica da DG, antes (AD) e depois (DD) dos desafios, com a amostra GAR-1 do vírus da DIB, das aves vacinadas no 1º dia de vida, da empresa A.

idade	I	T	D	PRBF	Lesões Hist	Elisa (log <sub>10</sub> )	DG
	rata		âmetro				
	men						
	to						
1	AD		2,0 <sup>a*</sup>	1,43 <sup>a**</sup> ±0,3	1,0 <sup>a*</sup>	3,46 <sup>a**</sup> ±0,20	NÃO
				2			
	DD		3,0 <sup>b</sup>	1,73 <sup>a</sup> ±0,37	3,0 <sup>b</sup>	3,47 <sup>a</sup> ±0,34	NÃO
4	AD		2,2 <sup>a</sup>	2,00 <sup>a</sup> ±0,36	2,0 <sup>a</sup>	3,49 <sup>a</sup> ±0,16	NÃO
	DD		3,7 <sup>b</sup>	1,86 <sup>a</sup> ±0,70	3,0 <sup>b</sup>	2,97 <sup>b</sup> ±0,37	NÃO
7	AD		3,0 <sup>a</sup>	2,00 <sup>a</sup> ±0,40	2,0 <sup>a</sup>	3,21 <sup>a</sup> ±0,28	NÃO
	DD		4,0 <sup>b</sup>	2,53 <sup>b</sup> ±0,47	2,0 <sup>a</sup>	2,78 <sup>b</sup> ±0,39	NÃO
10	AD		4,0 <sup>a</sup>	2,62 <sup>a</sup> ±0,37	2,0 <sup>a</sup>	3,17 <sup>a</sup> ±0,12	NÃO
	DD		4,0 <sup>a</sup>	3,21 <sup>b</sup> ±0,38	3,5 <sup>b</sup>	3,17 <sup>a</sup> ±0,36	SIM
13	AD		4,0 <sup>a</sup>	3,03 <sup>a</sup> ±0,81	2,5 <sup>a</sup>	3,06 <sup>a</sup> ±0,33	NÃO
	DD		4,0 <sup>a</sup>	2,05 <sup>b</sup> ±0,79	5,0 <sup>b</sup>	2,72 <sup>b</sup> ±0,64	SIM
16	AD		4,0 <sup>a</sup>	2,84 <sup>a</sup> ±0,32	3,0 <sup>a</sup>	2,83 <sup>a</sup> ±0,34	NÃO
	DD		5,0 <sup>a</sup>	2,18 <sup>b</sup> ±0,57	5,0 <sup>b</sup>	2,62 <sup>b</sup> ±0,41	SIM
19	AD		5,0 <sup>a</sup>	3,50 <sup>a</sup> ±0,59	3,0 <sup>a</sup>	2,34 <sup>a</sup> ±0,59	NÃO
	DD		4,0 <sup>b</sup>	1,77 <sup>b</sup> ±0,56	4,0 <sup>b</sup>	2,15 <sup>b</sup> ±1,20	SIM
22	AD		5,0 <sup>a</sup>	2,81 <sup>a</sup> ±0,65	2,5 <sup>a</sup>	1,62 <sup>a</sup> ±1,01	NÃO
	DD		6,0 <sup>a</sup>	3,65 <sup>a</sup> ±1,01	4,0 <sup>b</sup>	2,52 <sup>b</sup> ±0,02	SIM

\*Mediana – Mann Whitney Rank Sun Test

\*\* Média – t test

Letras distintas entre AD e DD dentro de cada dia de desafio, indicam diferença significativa (P<0,05)

Tabela – 3 Diâmetro, peso relativo da BF, lesões histológicas, títulos de anticorpos (ELISA) e avaliação clínica da DG, antes (AD) e depois (DD) dos desafios, com a amostra GAR-1 do vírus da DIB, das aves não vacinadas no 1º dia de vida, da empresa A.

dia	T	D	PRBF	Lesões Hist	Elisa (log <sub>10</sub> )	DG
1	AD	2,0 <sup>a</sup> *	1,57 <sup>a**</sup> ±0,3	1,0 <sup>a*</sup>	3,52 <sup>a**</sup> ±0,2	NÃO
			0		2	
	DD	3,0 <sup>b</sup>	1,86 <sup>a</sup> ±0,70	2,0 <sup>b</sup>	3,47 <sup>a</sup> ±0,01	NÃO
4	AD	3,0 <sup>a</sup>	2,05 <sup>a</sup> ±0,41	1,0 <sup>a</sup>	3,50 <sup>a</sup> ±0,14	NÃO
	DD	3,0 <sup>a</sup>	2,25 <sup>a</sup> ±0,61	2,0 <sup>b</sup>	2,97 <sup>b</sup> ±0,37	NÃO
7	AD	3,0 <sup>a</sup>	1,82 <sup>a</sup> ±0,49	1,0 <sup>a</sup>	3,30 <sup>a</sup> ±0,42	NÃO
	DD	3,0 <sup>a</sup>	2,22 <sup>a</sup> ±0,37	2,0 <sup>b</sup>	2,23 <sup>b</sup> ±1,39	NÃO
10	AD	3,0 <sup>a</sup>	2,08 <sup>a</sup> ±0,47	1,0 <sup>a</sup>	3,11 <sup>a</sup> ±0,62	NÃO
	DD	4,0 <sup>b</sup>	3,07 <sup>b</sup> ±1,12	3,5 <sup>b</sup>	3,17 <sup>a</sup> ±0,30	SIM
13	AD	4,0 <sup>a</sup>	2,35 <sup>a</sup> ±0,51	1,0 <sup>a</sup>	3,05 <sup>a</sup> ±0,46	NÃO
	DD	4,0 <sup>a</sup>	2,29 <sup>a</sup> ±0,65	4,0 <sup>b</sup>	2,09 <sup>b</sup> ±0,98	SIM
16	AD	4,0 <sup>a</sup>	2,86 <sup>a</sup> ±0,88	1,0 <sup>a</sup>	2,72 <sup>a</sup> ±0,25	NÃO
	DD	4,0 <sup>a</sup>	2,13 <sup>a</sup> ±1,21	4,0 <sup>b</sup>	2,62 <sup>a</sup> ±1,17	SIM
19	AD	4,4 <sup>a</sup>	2,84 <sup>a</sup> ±0,43	1,0 <sup>a</sup>	1,98 <sup>a</sup> ±0,57	NÃO
	DD	3,8 <sup>a</sup>	1,58 <sup>b</sup> ±0,92	5,0 <sup>b</sup>	2,96 <sup>b</sup> ±0,47	SIM
22	AD	5,0 <sup>a</sup>	2,79 <sup>a</sup> ±0,69	1,0 <sup>a</sup>	1,23 <sup>a</sup> ±1,02	NÃO
	DD	5,0 <sup>a</sup>	2,49 <sup>a</sup> ±0,90	4,0 <sup>b</sup>	3,03 <sup>b</sup> ±0,25	SIM

\*Mediana – Mann Whitney Rank Sun Test

\*\* Média – t test

Letras distintas entre AD e DD dentro de cada dia de desafio, indicam diferença significativa (P<0,05)

Tabela – 4 Diâmetro, peso relativo da BF, lesões histológicas, títulos de anticorpos (ELISA) e avaliação clínica da DG, antes (AD) e depois (DD) dos desafios, com a amostra GAR-1 do vírus da DIB, das aves vacinadas no 1º dia de vida, da empresa B.

dia	T	D	PRBF	Lesões Hist	Elisa (log <sub>10</sub> )	DG
1	AD	2,0 <sup>a</sup> *	1,68 <sup>a**</sup> ±0,4	1,0 <sup>a</sup> *	3,70 <sup>a**</sup> ±0,4	NÃO
	DD	3,0 <sup>b</sup>	2,06 <sup>ab</sup> ±0,21	2,0 <sup>b</sup>	3,29 <sup>a</sup> ±1,36	NÃO
4	AD	2,0 <sup>a</sup>	2,19 <sup>a</sup> ±0,69	2,0 <sup>a</sup>	3,76 <sup>a</sup> ±0,13	NÃO
	DD	3,0 <sup>a</sup>	2,17 <sup>a</sup> ±0,74	2,7 <sup>b</sup>	3,07 <sup>b</sup> ±0,31	NÃO
7	AD	3,0 <sup>a</sup>	2,47 <sup>a</sup> ±0,52	2,0 <sup>a</sup>	3,54 <sup>a</sup> ±0,20	NÃO
	DD	4,0 <sup>a</sup>	2,72 <sup>a</sup> ±0,73	3,0 <sup>b</sup>	3,28 <sup>b</sup> ±0,34	NÃO
10	AD	3,5 <sup>a</sup>	2,70 <sup>a</sup> ±0,60	2,0 <sup>a</sup>	3,43 <sup>a</sup> ±0,21	NÃO
	DD	4,0 <sup>b</sup>	2,68 <sup>a</sup> ±0,71	2,5 <sup>b</sup>	3,47 <sup>a</sup> ±0,16	NÃO
13	AD	4,0 <sup>a</sup>	3,07 <sup>a</sup> ±0,53	2,5 <sup>a</sup>	3,27 <sup>a</sup> ±0,33	NÃO
	DD	4,0 <sup>a</sup>	2,23 <sup>b</sup> ±0,52	4,0 <sup>b</sup>	2,89 <sup>b</sup> ±0,32	SIM
16	AD	4,3 <sup>a</sup>	3,09 <sup>a</sup> ±0,37	3,0 <sup>a</sup>	3,23 <sup>a</sup> ±0,17	NÃO
	DD	5,0 <sup>b</sup>	2,97 <sup>a</sup> ±0,99	5,0 <sup>b</sup>	0,566 <sup>a</sup> ±1,19	SIM
19	AD	5,0 <sup>a</sup>	3,26 <sup>a</sup> ±0,58	2,5 <sup>a</sup>	2,80 <sup>a</sup> ±0,59	NÃO
	DD	5,0 <sup>a</sup>	2,87 <sup>a</sup> ±1,20	4,5 <sup>b</sup>	2,29 <sup>b</sup> ±0,85	SIM
22	AD	4,9 <sup>a</sup>	3,23 <sup>a</sup> ±0,39	2,8 <sup>a</sup>	1,12 <sup>a</sup> ±0,12	NÃO
	DD	6,1 <sup>b</sup>	3,22 <sup>a</sup> ±1,06	4,2 <sup>b</sup>	2,39 <sup>b</sup> ±0,42	SIM

\*Mediana – Mann Whitney Rank Sun Test

\*\* Média – t test

Letras distintas entre AD e DD dentro de cada dia de desafio, indicam diferença significativa (P<0,05)

Tabela – 5 Diâmetro, peso relativo da BF, lesões histológicas, títulos de anticorpos (ELISA) e avaliação clínica da DG, antes (AD) e depois (DD) dos desafios, com a amostra GAR-1 do vírus da DIB, das aves não vacinadas no 1º dia de vida, da empresa B.

dia	T	D	PRBF	Lesões Hist	Elisa (log <sub>10</sub> )	DG
1	AD	2,0 <sup>a*</sup>	1,64 <sup>a***±0,3</sup>	1,0 <sup>a*</sup>	3,76 <sup>a***±0,2</sup>	NÃO
			5		5	
	DD	3,0 <sup>b</sup>	1,18 <sup>a±0,30</sup>	2,0 <sup>b</sup>	3,50 <sup>b±1,15</sup>	NÃO
4	AD	3,0 <sup>a</sup>	2,12 <sup>a±0,33</sup>	1,0 <sup>a</sup>	3,68 <sup>a±0,10</sup>	NÃO
	DD	3,0 <sup>a</sup>	2,50 <sup>b±0,47</sup>	2,0 <sup>b</sup>	3,31 <sup>b±0,13</sup>	NÃO
7	AD	3,0 <sup>a</sup>	2,09 <sup>a±0,57</sup>	1,0 <sup>a</sup>	3,39 <sup>a±0,24</sup>	NÃO
	DD	4,0 <sup>b</sup>	2,42 <sup>a±0,57</sup>	2,0 <sup>b</sup>	3,36 <sup>a±0,32</sup>	NÃO
10	AD	3,0 <sup>a</sup>	2,02 <sup>a±0,51</sup>	1,0 <sup>a</sup>	3,31 <sup>a±0,17</sup>	NÃO
	DD	4,0 <sup>b</sup>	2,37 <sup>a±0,54</sup>	3,0 <sup>b</sup>	3,56 <sup>b±0,72</sup>	NÃO
13	AD	4,0 <sup>a</sup>	2,73 <sup>a±0,48</sup>	1,0 <sup>a</sup>	3,29 <sup>a±0,09</sup>	NÃO
	DD	4,0 <sup>a</sup>	2,45 <sup>b±0,75</sup>	4,0 <sup>b</sup>	3,16 <sup>a±0,24</sup>	SIM
16	AD	4,0 <sup>a</sup>	3,24 <sup>a±0,62</sup>	1,0 <sup>a</sup>	3,27 <sup>a±0,14</sup>	NÃO
	DD	5,0 <sup>b</sup>	2,72 <sup>a±0,69</sup>	4,0 <sup>b</sup>	2,51 <sup>b±0,29</sup>	SIM
19	AD	4,6 <sup>a</sup>	3,32 <sup>a±0,66</sup>	1,0 <sup>a</sup>	2,71 <sup>a±0,33</sup>	NÃO
	DD	4,9 <sup>a</sup>	2,90 <sup>a±1,30</sup>	4,0 <sup>b</sup>	2,47 <sup>a±0,34</sup>	SIM
22	AD	4,9 <sup>a</sup>	2,74 <sup>a±0,52</sup>	1,0 <sup>a</sup>	2,38 <sup>a±0,31</sup>	NÃO
	DD	5,8 <sup>b</sup>	3,00 <sup>a±1,55</sup>	4,0 <sup>b</sup>	2,90 <sup>b±0,27</sup>	SIM

\*Mediana – Mann Whitney Rank Sum Test

\*\* Média – t test

Letras distintas entre AD e DD dentro de cada dia de desafio, indicam diferença significativa (P<0,05)

Histologia: os resultados das lesões histológicas mostraram que as aves vacinadas antes dos desafios, apresentaram um escore de lesões até 3 e nas aves não vacinadas nunca foi superior a 1. Após o desafio, os índices foram superiores a 3, até o limite de 5, independente das aves serem vacinadas ou não. Baseados no exposto, foram consideradas protegidas as aves com escore até 3,0. As aves com escore superior a 3 foram consideradas doentes, o que pode ser observado nas Tabelas 2, 3, 4 e 5.

Diâmetro: também nos diâmetros não houve diferença significativa entre aves vacinadas e não vacinadas na maioria das idades antes do desafio (1, 4, 7, 13, 16 e 22 dias), apenas no 10º e 19º dia é que aconteceram diferenças significativas. Depois dos desafios, os resultados foram bem variáveis, comprometendo qualquer análise conclusiva (Tabelas 2, 3, 4 e 5)

Peso relativo da bolsa de Fabrício: os resultados antes dos desafios mostram que, apenas entre o 10º e 13º dia é que há diferença significativa entre as empresas. Depois do desafio, independentemente da empresa, os resultados são bem variáveis, não havendo diferenças significativas em alguns desafios e havendo em outros, com uma tendência a diminuir de tamanho a partir do 5º desafio, quando comparado com os controles (Tabelas 2, 3,4 e 5).

## DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

Os anticorpos maternos diminuem progressivamente, tanto nas aves vacinadas quanto nas não vacinadas, até os 22 dias de idade. A quantidade de vírus utilizada na vacina não foi suficiente para provocar uma redução dos anticorpos maternos, que pudesse ser medida pela prova de ELISA empregada neste experimento. Outros trabalhos encontrados na literatura já haviam documentado um fenômeno similar. Knoblich et al (2000), trabalhando com aves vacinadas e não vacinadas contra a DIB no primeiro dia de vida, concluíram que, a vacina não acelera a diminuição dos anticorpos maternos. Alam et al. (2002) mediram a queda dos anticorpos maternos de pintos provenientes de reprodutoras vacinadas contra a DIB e encontraram uma queda de anticorpos semelhante a este experimento. Knezevic et al.(1999) vacinaram pintos de um dia com vacina intermediária e não houve alteração nos títulos de anticorpos. Eles só puderam caracterizar aumento nos títulos, quando a vacinação foi realizada aos 14 dias de idade. Da mesma forma, Kumar et al. (2000) chegaram a conclusões semelhantes utilizando a prova de agar-gel-precipitação quantitativa. Ahmed & Akhter (2003) descreveram a queda de anticorpos maternos e sugeriram uma equação para medir o nível destes anticorpos e estabelecer até quando as aves estariam protegidas contra a agressão das amostras de campo do vírus da DIB. No mesmo experimento, observaram que as aves desafiadas até os 14 dias de idade não morreram, sugerindo uma proteção conferida pelos anticorpos maternos. Entretanto, esta conclusão não relata o grau de lesão histológica na bolsa de Fabrício.

Os resultados do presente experimento mostraram diâmetros que variaram de 2 até 6, entre o primeiro e o último desafio, com lesões histológicas semelhantes entre as aves controles e as desafiadas, vacinadas ou não, tanto na empresa A, quanto na empresa B, revelando não haver relação entre diâmetro e doença, ou lesão causada por vacina (Moraes et al. submetido). Em trabalho também realizado no CDPA, com frangos de corte de criações comerciais, quando foram utilizadas diferentes vacinas intermediárias contra a DIB, somente com os resultados das medidas dos diâmetros bursais, não foi possível concluir se as aves estavam com índices de lesão atribuídos à vacina, ou escores de lesões ocasionados pela doença, sem a utilização das provas histológicas. Também, no presente trabalho, não foi possível relacionar o diâmetro da bolsa de Fabrício com proteção (Pereira et al. submetido). Com estas observações concluímos que, a utilização da técnica da medida do diâmetro da bolsa de Fabrício, como único parâmetro, para a tomada de decisões de avaliação de programas de vacinação, ou para o diagnóstico da doença, deve ser vista, cautelosamente e apenas como um auxiliar e nunca como um método definitivo.

Quando o peso relativo da bolsa foi analisado, os dados mostraram que as bolsas de Fabrício tinham seu peso relativo maior depois do desafio, até o início das lesões histológicas consideradas como de doença. Após, ela passa a pesar menos que os controles, mesmo que em alguns casos exista apenas uma tendência, sem diferença estatística. Como o peso relativo foi calculado 120 horas após o desafio, poderíamos supor que até, aproximadamente o quarto desafio, o nível de anticorpos maternos protetores diminuiria a velocidade da infecção, aumentando o tempo do processo



inflamatório, fazendo com que as bolsas, aparentemente, fossem mais pesadas, pois estariam ainda na fase de edema. Após o quarto desafio, o vírus ultrapassaria a barreira de anticorpos e causaria as lesões em menor tempo, apresentando a fase de atrofia nas mesmas 120 horas após o desafio e, assim, diminuindo o peso da bolsa de Fabrício. Tsukamoto et al. (1995) observaram que aves desafiadas com uma amostra muito virulenta do vírus da DIB isolada no Japão, que a atrofia da bolsa de Fabrício pode ser mais rápida, baixando para 3 a 4 dias depois da inoculação. Estas observações foram semelhantes aos achados deste experimento. Entretanto, Mazariegos et al. (1990) afirmaram que o peso relativo não é um bom indicador de DIB. A mesma conclusão é aplicada para o diâmetro. Desta forma, a utilização isolada de um ou outro destes critérios não permite afirmar se a ave está com DIB, se foi vacinada ou se está saudável. Estudos específicos devem ser feitos para detalhar os achados do presente trabalho.

Neste experimento, foram levadas em consideração as lesões histológicas, após o desafio com a amostra GAR-1, com escore médio maior que 3, para determinar que as aves estavam com DIB, junto com a lesão macroscópica (edema gelatinoso na bolsa de Fabrício). Entre o terceiro e o quarto desafio, as aves vacinadas e as não vacinadas apresentavam, depois do desafio, escores semelhantes e superiores a três. Mazariegos et al. (1990) trabalhando com amostras de vacinas intermediárias, observaram após a vacinação, escores de lesões, que variavam entre 1,4 para os controles, e até 4, para uma das amostras vacinais. Portanto, no presente trabalho, foi considerado que os animais estavam protegidos até aquele momento, isto é, entre o

sétimo e o décimo dias de idade, ou ainda até o escore histológico 3,0. As lesões histológicas aconteceram mesmo com títulos de anticorpos estabelecidos como protetores. Nestas ocasiões, a intensidade das lesões existentes era menor do que aquelas visualizadas nas aves doentes, o que está de acordo com os resultados encontrados por Maas et al. (2001) que desafiaram pintos com altos títulos de anticorpos maternos ( $9 \log_2$ ), medidos por vírus neutralização, com uma amostra clássica do vírus (52/70) e com uma muito virulenta do vírus da DIB, conseguindo prevenir os sinais clínicos da doença até os 14 dias de idade, mas não os danos na bolsa de Fabrício.

Se as aves estavam protegidas entre o terceiro e o quarto desafio, medido pela histologia, pode-se usar o título médio de ELISA das aves com esta idade como indicador do título protetor. O título, nesta ocasião era de  $3,4 \log_{10}$  para vacinadas e não vacinadas. Desta forma, podem ser aplicadas as equações de regressões onde, em uma delas o título de ELISA é a variável independente e a idade a dependente. Na outra, o título é a variável dependente e a idade a independente, para estabelecer até que idade os animais estariam protegidos ou que título as aves teriam em uma determinada idade. Resolvendo-se as equações e estabelecendo  $3,4 \log_{10}$  como título protetor, as aves estariam protegidas contra o desafio do vírus até os 6-7 dias de idade na Empresa A e até os 11-12 dias, na Empresa B. Estes resultados, por si só, demonstram que não é necessária a vacinação no primeiro dia de vida e, além disto, evidencia que os animais estavam protegidos na primeira semana de idade. Demonstra, também, como era de se esperar, que os distintos programas de

vacinações empregados protegem os animais por mais ou menos tempo. Assim sendo, o programa de vacinação utilizado nas reprodutoras da Empresa B protege a progênie por mais tempo que o empregado na Empresa A. A diferença entre os modelos das duas empresas deixa claro que é muito arriscado o estabelecimento de datas de aplicação da primeira vacinação obtidas de modelos gerais.

Quando se comparam os resultados de Elisa entre as empresas, há uma diferença significativa, o que nos remete ao programa de vacinação das reprodutoras, que são diferentes. Resultados similares foram obtidos por Maas et al. (2001), que trabalharam com duas vacinas inativadas oleosas contra a DIB e obtiveram resultados diferentes quanto à resposta de anticorpos maternos e à proteção contra o desafio com amostras clássicas e muito virulentas do vírus da DIB.

Com os dados do presente trabalho, podemos concluir que as aves vacinadas e não vacinadas no primeiro dia de vida, com títulos de anticorpos elevados, acima de  $3,4 \log_{10}$ , são protegidas contra a doença, após o desafio com uma amostra muito virulenta da DIB, e que as lesões na bolsa de Fabrício são compatíveis com aquelas causadas pela vacina. Os pintos provenientes de reprodutoras hiperimunizadas, não precisam ser vacinados no primeiro dia de vida. A idade da vacinação deverá ser buscada utilizando-se uma equação de regressão para cada empresa, porque os esquemas de vacinação das reprodutoras são diferentes e as condições de criação também. Nos trabalhos realizados no CDPA, Salle (1989) utilizando pintos comerciais com anticorpos maternos e desafiados com uma amostra clássica do vírus (52/70), também observaram proteção até os 14 dias de idade das aves e Moraes et al.

(1998) evidenciaram que as amostras de vacina não diferiam antigenicamente das amostras de campo. Sendo assim, desde aquela época, os autores já recomendavam que os esquemas de vacinação deveriam seguir um planejamento adequado, desde a limpeza e desinfecção do ambiente, a escolha da melhor amostra vacinal (Moraes et al. submetido), a tipagem das amostras incidentes no campo (Sharma et al, 1989), as micotoxinas (Azzam & Gabal, 1998), outras doenças intercorrentes e o nível dos anticorpos maternos, que podem influenciar no desempenho das vacinações, tanto das reprodutoras como, principalmente, dos frangos de corte.

## BIBLIOGRAFIA

- Ahmed, Z. & Akhter, S. Role of maternal antibodies in protection against infectious bursal disease in Commercial Broilers. *International Journal of Poultry Science* 2003, 2(4), 251-255.
- Alam, J.; Rahman, M.M.; Sil, B.K.; Khan, M.S.R.; Sarker, M.S.K. Effect of maternally derived antibody on vaccination against infectious bursal disease (Gumboro) with live vaccine in broiler. *International Journal of Poultry Science* 2002, 1(4), 98-101.
- Azzam, A.H. & Gabal, M.A. Aflatoxin in layers hens. *Avian Pathology* 1998, 27(6), 570-577.
- Cosgrove, A.S. An apparently new disease of chickens: avian nefrosis. *Avian Diseases* 1962, 6, 385-389.
- Di Fabio, J.; Rossini, L.I.; Eterradossi, N. Toquin, M.D.; Gardin, Y. European-like pathogenic infectious bursal disease viruses in Brazil. *Veterinary Record* 1999 145(7), 203-204.
- 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* 2001, 45(2), 297-306.
- Knoblich, H.V.; Sommer, S.E.; Jackwood, D.J. Antibody titers to infectious bursal disease virus in broiler chicks after vaccination at one day of age with infectious bursal disease virus and Marek's disease virus. *Avian Diseases* 2000, 44, 874-884.
- Kumar, K.; Singh K.C.P.; Prasad, C.B. Immune response to intermediate strain IBD vaccine at different levels of maternal antibody in broiler chickens. *Tropical Animal Health and Production* 2000, 32, 357-360.
- Ley, D.H.; Yamamoto, R.; Bickford, A.A. The pathogenesis of infectious bursal disease: serologic, histopathologic, and clinical chemical observations. *Avian Diseases* 1983, 27, 1060-1085.
- Maas, R.A.; Venema, S.; Oei, H.L.; Pol, J.M.A.; Claassen, I.J.T.M.; Huurne, H.M. Efficacy of inactivated infectious bursal disease (IBD) vaccines: comparison of serology with protection of progeny chickens against IBD virus of varying virulence. *Avian Pathology* 2001, 30, 345-354.

Moraes, H.L.S; Salle, C.T.P; Nascimento, V.P. Avaliação da relação antigênica e imunogênica entre amostras de campo e amostras vacinais do vírus da doença infecciosa bursal através do “western blotting”. Pesquisa Agropecuária Gaúcha 1998, 4(1), 73-83.

Moraes, H.L.S; Salle, C.T.P.; Padilha, A.P.; Canal, C.W.; Artencio, J.O.; Pereira, R.A; Moraes, L.B.; Rocha, A.C.P. Doença Infecciosa Bursal: avaliação da patogenicidade de vacinas comercializadas no Brasil em aves livres de patógenos específicos. Brazilian Journal of Poultry Science (enviado para publicação).

Muskett, J.C.; Hopkins, I.G.; Edwards, K.R.; Thornton, D.H. Comparison of two infectious bursal disease vaccine strains: efficacy and potential hazards in susceptible and maternally immune birds. The Veterinary Records 1979, 14,332-334.

Naqi, S.A.; Marquez, B.; Sabin, N. Maternal antibody and its effect on infectious bursal disease immunization. Avian Diseases (1983), 27 (3), 623-631.

Nunoya, T.; Otaki, M.; Hiraga, M.; Saito, T. Occurrence of acute infectious bursal disease with high mortality in Japan and pathogenicity of field isolates in specific-pathogen-free chickens. Avian Diseases 1992, 36, 597-609.

Pereira, R.A; Fallavena, L.C.B.; Moraes, H.L.S.; Wald, V.B.; Rodrigues, O.; Moraes, L.B.; Garcia, D.M.; Nascimento, V.P.; Reali, E.H.; Salle, C.T.P. Monitoria da doença de Gumboro: histopatologia versus bursometria. Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science (enviado para publicação).

Salle, C.T.P. Importância dos anticorpos maternos na doença de Gumboro. Avicultura e Suinocultura Industrial 1989, 957, 112-114.

Sharma, J.M.; Dohms, J.E.; Metz, A.L. Comparative pathogenesis of serotype 1 and variant serotype 1 isolates of infectious bursal disease virus and their effect on humoral and cellular immune competence of specific-pathogen-free chickens. Avian Diseases 1989, 33, 112-124.

Sharma, J.M.; Kim, J.; Rautenschlein, S.; Yeh, H.Y. Infectious bursal disease virus of chickens: pathogenesis and immunosuppression. Developmental and Comparative Immunology, 2000, 24, 223-235.

Shane, S. Lasher, H.; Paxton, K.W. Economic impact of infectious bursal disease. In: Proceedings International Symposium of Infectious Bursal Disease and Chicken Anaemia 1994, 196-203.

Tsukamoto, K.; Tanimura, N. Kakita, S.; Ota, K.; Mase, M.; Imai, K.; Hihara, H. Efficacy of three live vaccines against highly virulent infectious bursal disease virus in chickens with or without maternal antibodies. Avian Diseases 1995, 39 (2), 218-229.

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 1991, 20, 409-421.

Winterfield, R.W.; Fadly, A.M; Bickford, A. Infectivity and distribution of infectious bursal disease virus in the chicken: persistence of the virus and lesions. Avian Diseases 1972, 16(3), 622-632.