



■ **Autor(es) / Author(s)**

Salle CTP, Cé MC, Wald VB, Santos CHC,
Nascimento VP, Canal CW, Moraes HLS, Oliveira

Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Porto Alegre - RS

■ **Correspondência / Mail Address**

Carlos Tadeu P. Salle
Av. Bento Gonçalves, 8824
91540-000 Agronomia - Porto Alegre - RS
Brasil

E-mail: tadsalle@pro.via-rs.com.br

■ **Unitermos / Keywords**

modelos matemáticos, critérios de interpretação,
monitoria sorológica, análise de regressão,
matrizes de corte /

*mathematical models, interpretation criteria,
serological monitoring, regression analysis,
broiler breeders*

■ **Observações/ Notes**

*Copies in English are available.

Financiado pela CNPq

Estabelecimento de Critérios de Interpretação de Resultados Sorológicos de Matrizes de Corte Através de Modelos Matemáticos

Establishment of Interpretation Criteria for Serological Results of Broiler Breeders Through Mathematical Models

RESUMO

O objetivo principal desse estudo foi a criação de um critério que permitisse a interpretação dos resultados dos exames sorológicos de rotina. Os dados analisados são resultados de testes sorológicos realizados como rotina por uma empresa avícola brasileira para a monitorização sorológica do programa de vacinação para as doenças de Newcastle, Gumboro e bronquite infecciosa. Foi colhido sangue de matrizes de frangos de corte pertencentes à mesma linhagem e submetidas ao mesmo programa de vacinação, da 5ª à 65ª semana de idade, nos anos de 1993, 1994 e 1995. Os resultados fornecidos pela empresa são referentes à média de 20 lotes de matrizes por ano. Os testes sorológicos foram realizados pelo laboratório da empresa, utilizando as técnicas de inibição da hemaglutinação (HI) e de soroneutralização. Para a análise dos dados, foram utilizadas as técnicas estatísticas de análise de variância e covariância e de regressão linear e não-linear. Com base nesses dados, foi proposto o ajuste de equações de regressão que refletem a relação entre as variáveis idade das aves e título de anticorpos. Os intervalos de confiança calculados a partir dessas equações foram, então, utilizados como critério na interpretação dos resultados obtidos no ano seguinte.

Concluiu-se que é possível o ajuste de equações de regressão que descrevam a relação entre as variáveis título de anticorpos e idade das aves, e a criação de critérios de interpretação que permitam analisar de forma objetiva os resultados sorológicos obtidos a partir da rotina de monitorização do programa vacinal das empresas avícolas.

ABSTRACT

The creation of a criteria that allowed the interpretation of serological exams results was the main objective of this work. The data resulting from routine serological tests was analysed for the Newcastle disease, Infectious Bronchitis and Gumboro diseases vaccination program control done by a Brazilian poultry company. The samples were collected from 5 to 65 weeks old broiler breeders belonging to the same line and submitted to the same vaccination program, from 1993 to 1995. The results are related to the average of 20 breeder flocks by year. Serological tests were realised by the company laboratory through Hemagglutination Inhibition and Serum - neutralisation tests. Analysis of Variance and Covariance and Linear and Non-linear Regression statistical tests were used for the data analysis. It was proposed to fit regression equations between birds' age and antibody titres. Confidence intervals calculated from these equations were the criteria used for the next year data interpretation.

It was concluded that it is possible to fit regression equations that describe the relationship between birds' age and antibody titres, and to create an interpretation criteria that allowed the objective analysis of serological results obtained from a poultry company's vaccination program control.



INTRODUÇÃO

Segundo Besterfield (1979), o controle de qualidade é um processo regulador para aquelas atividades que medem o desempenho de um produto através da comparação com o desempenho de padrões estabelecidos, permitindo ações corretivas. O controle de qualidade estatístico é um ramo do controle de qualidade, envolvendo a colheita, a análise e a interpretação dos dados para a solução de um problema.

O controle de qualidade total prega a utilização de um critério de decisão e de um quadro operacional específicos para a qualidade do produto que sejam suficientemente efetivos para gerarem os melhores resultados com os menores custos. A estrutura de qualidade total possibilita a revisão de planejamentos de forma regular, a análise dos resultados durante o processamento, o controle de ações na fabricação e no abastecimento, e até a interrupção da produção quando necessário. Além disso, é proporcionada a estrutura na qual metodologias estatísticas de controle de qualidade podem ser utilizadas em um primeiro momento e mais tarde associadas a técnicas adicionais de metrologia, confiabilidade, motivação para qualidade e diversas outras ligadas ao controle de qualidade (Feigenbaum, 1983).

Salle *et al.* (1998) propuseram a criação de um critério de interpretação para os resultados sorológicos gerados pelas empresas avícolas através de modelos matemáticos. Foram ajustadas equações de regressão que descrevem a relação entre a idade das aves e os títulos de anticorpos apresentados pelas aves para as doenças de Newcastle, Gumboro e bronquite infecciosa nos anos de 1993 a 1995, através das análises de regressão linear e não-linear. Cabe ressaltar que foi proposto o ajuste de uma equação única para cada doença, englobando os resultados obtidos nos três anos.

Na continuidade desse trabalho, foram utilizados conceitos de controle de qualidade com o objetivo de criar um critério de interpretação para os mesmos resultados sorológicos analisados anteriormente. O presente estudo apresenta essa nova proposta, através da qual os títulos obtidos a cada ano foram utilizados como controle para os títulos encontrados no ano seguinte, através do ajuste de equações de regressão entre as variáveis idade das aves e título de anticorpos. Os intervalos de confiança calculados a partir dessas equações foram utilizados como critério na interpretação dos resultados obtidos no ano seguinte. Dessa forma, estabeleceu-se um controle baseado em critérios objetivos, de onde pode vir a originar-se um padrão de qualidade característico da empresa.

MATERIAL E MÉTODOS

Dados analisados

Os dados analisados são resultados de testes sorológicos realizados como rotina por uma empresa avícola brasileira para

a monitorização sorológica do programa de vacinação para as doenças de Newcastle, Gumboro e bronquite infecciosa. Foi colhido o sangue de matrizes de corte pertencentes à mesma linhagem e submetidas ao mesmo programa de vacinação. As amostras de sangue foram obtidas através de punção venosa, colhidas da 5ª. a 65ª. semana de idade das aves, em intervalos regulares de 5 semanas, nos anos de 1993, 1994 e 1995. Os dados fornecidos pela empresa são referentes à média dos resultados sorológicos de 20 lotes de matrizes examinados por ano, nas idades anteriormente especificadas.

Exames sorológicos

Os testes sorológicos foram realizados pelo laboratório da empresa segundo as técnicas de rotina próprias. Os resultados da monitorização para a doença de Newcastle foram obtidos através da técnica de inibição da hemaglutinação (HI), e para as doenças de Gumboro e bronquite infecciosa através da técnica de soroneutralização. Os resultados obtidos foram expressos sob a forma de títulos geométricos médios (GMT), conforme procedimento usual.

Análise estatística

Com base nos dados descritos anteriormente, foi proposto o ajuste de equações de regressão entre as variáveis idade das aves e título de anticorpos. Foi considerada como variável independente (x) a idade das aves por ocasião da colheita, e como variável dependente (y) o título de anticorpos apresentado por essas aves em resposta ao programa de vacinação para as doenças de Newcastle, Gumboro e bronquite infecciosa nos anos de 1993, 1994 e 1995. As equações ajustadas são específicas para cada ano e doença.

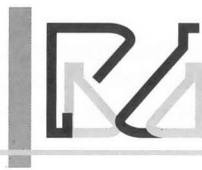
Para determinar a existência de diferença significativa entre as médias observadas dos diferentes anos, para cada uma das doenças, foram utilizadas as análises de variância e covariância.

Foram utilizadas a análise de regressão linear, para o ajuste dos modelos linear simples, quadrático e polinomial, e a análise de regressão não-linear, a partir da qual foi selecionado o modelo logístico. Pelas análises de variância e de resíduos, e pelos coeficientes de determinação, foi selecionado o modelo que aliasse simplicidade e capacidade de descrever adequadamente os dados analisados.

Após o ajuste do modelo, foram realizadas as análises de resíduos e de normalidade, através de gráficos de resíduos, gráficos de probabilidade normal e do teste de Anderson-Darling.

A partir do modelo selecionado, foram calculados os intervalos de confiança e de predição de 95%. O intervalo de predição foi utilizado como critério para a interpretação dos resultados obtidos no ano seguinte.

O teste de Bartlett foi utilizado para verificar a homogeneidade das variâncias, indicando a necessidade de transformar os dados originais. Foi escolhida a transformação logarítmica,



por ser normalmente relacionada a títulos de anticorpos, como no cálculo dos títulos geométricos médios, ou a títulos de antígeno, como na titulação de vacinas. Além disso, Kleinbaum e Kupper (1978) relataram que a transformação logarítmica é utilizada na estabilização da variância, e que essa mesma transformação geralmente resolve de modo simultâneo os problemas de heterocedasticidade e de não-normalidade, e em alguns casos até mesmo de não-linearidade.

Nas diferentes análises, foram utilizados os programas estatísticos Minitab, Statview e Curvexpert.

RESULTADOS

As equações ajustadas para as doenças de Newcastle (DNC), Gumboro (DG) e bronquite infecciosa (BI) em função da idade, com os respectivos coeficientes de determinação (R^2), podem ser observadas na Tabela 1. Todos os modelos ajustados foram significativos ($\alpha=0.01$), e apresentaram análises de resíduos adequadas. A única exceção observada foram os títulos obtidos no ano de 1995 para a doença de Newcastle, para os quais não foi possível o ajuste de uma equação de regressão adequada.

A partir de cada equação ajustada, foram calculados os intervalos de confiança e de predição de 95%. O intervalo de predição representa a faixa onde se espera, em 95% dos casos, que estejam localizados os valores dos títulos, e foi utilizado como critério de interpretação dos resultados obtidos no ano seguinte. Um exemplo das análises comparativas realizadas pode ser observado na Figura 1.

Na análise comparativa para a doença de Newcastle nos anos de 1993 e 1994, foram encontrados diversos títulos que apresentaram valores estatisticamente inferiores no ano de 1994, quando comparados aos de 1993. Esses títulos com valores significativamente menores correspondem às 5^a, 15^a,

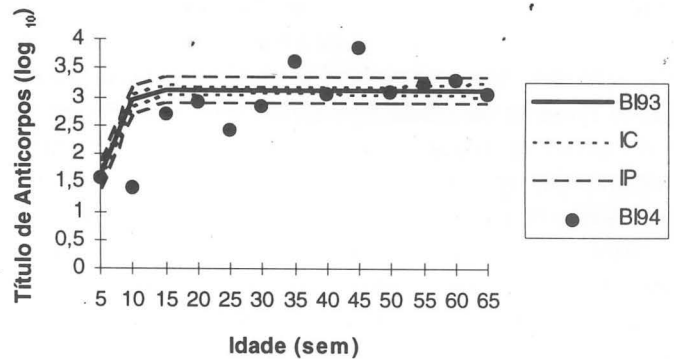


Figura 1 - Intervalos de confiança (IC) e de predição (IP) de 95% para bronquite infecciosa no ano de 1993 (B193) e títulos obtidos no ano de 1994 (B194).

30^a, 35^a e 40^a semanas de idade. Para a análise comparativa dos anos de 1994 e 1995 da mesma doença, foram observados três pontos com valores significativamente maiores no ano de 1995, correspondentes às 10^a, 15^a e 25^a semanas de idade. No período final, os títulos de anticorpos relativos ao ano de 1995 apresentaram valores mais baixos, estatisticamente significativos, às 55^a e 65^a semanas de idade. Observou-se que, após a 35^a semana, todos os títulos em 1995 apresentaram valores mais baixos em relação a 1994, mas somente os relativos às 55^a e 65^a semanas foram estatisticamente significativos.

Para bronquite infecciosa, na análise comparativa dos anos de 1993 e 1994, observou-se no período inicial três títulos com valores significativamente menores no ano de 1994, correspondentes às 10^a, 15^a e 25^a semanas de idade das aves. Já nas 35^a e 45^a semanas, ocorreram aumentos significativos nos títulos de anticorpos em 1994. Na análise dos anos de 1994 e 1995, observou-se que apenas um título no ano de 1995, cor-

Tabela 1- Equações de regressão ajustadas para os títulos de anticorpos das doenças de Newcastle, Gumboro e bronquite infecciosa em função da idade, com os respectivos coeficientes de determinação.

Doença	Ano	Modelo	Equação	R^2
DNC	1993	Polinomial	$y=2.02 -0.17x +0.014x^2 -0.0003x^3 + 0.000024x^4$	0.957
DNC	1994	Quadrático	$y = 0.641 + 0.082 x - 0.001x^2$	0.896
DG	1993	Logístico	$y = 4.33 / (1 + 5.32 \exp^{-0.24x})$	0.880
DG	1994	Quadrático	$y = 1.547 + 0.127 - 0.001x^2$	0.937
DG	1995	Quadrático	$y = 2.695 + 0.074 - 0.001x^2$	0.875
BI	1993	Logístico	$y = 3.14 / (1 + 4.02 \exp^{-0.54x})$	0.920
BI	1994	Quadrático	$y = 0.973 + 0.103 - 0.001x^2$	0.773
BI	1995	Logístico	$y = 3.01 / (1 + 12.23 \exp^{-0.52x})$	0.850



respondente a 10 semanas de idade, localizou-se fora dos limites do intervalo de predição. Esse título foi estatisticamente diferente daquele observado para a mesma idade no ano anterior, e provavelmente sofreu a influência de uma causa que não esteve presente de modo significativo em 1994. Podem ser investigadas as causas que geraram esse comportamento diferenciado, mas, de um modo geral, o ano de 1995 não apresentou mudanças significativas em relação a 1994.

Para a doença de Gumboro, a análise comparativa dos anos de 1993 e 1994 mostrou que o ano de 1994 não apresentou mudanças significativas em relação a 1993. Entre os anos de 1994 e 1995, foram observados dois títulos, em relação às 5ª e 10ª semanas de idade, que apresentaram valores significativamente maiores no ano de 1995.

DISCUSSÃO

Vários autores relataram que a simples detecção de anticorpos séricos não se relaciona diretamente com a proteção das aves, afirmação justificada pela complexidade apresentada pelo sistema imune, envolvendo diversos mecanismos além da imunidade humoral, como a imunidade celular e a ação do complemento, macrófagos e interferons (Benjamini & Leskowitz, 1991). Considerando-se somente a imunidade humoral, o fato das provas sorológicas detectarem somente um tipo de imunoglobulina subestima o papel das demais, principalmente a ação da imunoglobulina A na imunidade local no caso dos vírus com penetração pelas vias respiratória e intestinal (Abbas *et al.*, 1994). Outro aspecto a ser considerado é o alto grau de variabilidade apresentado pela resposta imune por influência de inúmeros fatores ambientais, tais como frio e calor excessivo, além de fatores genéticos e nutricionais, como a falta de água e jejum (Zander *et al.*, 1997). A ocorrência de doenças imunodepressoras concomitantes e a presença de anticorpos maternos também influenciam as flutuações observadas na resposta imune (Benjamini & Leskowitz, 1991).

Um aspecto favorável no uso da imunidade humoral como critério de interpretação para resultados sorológicos é a especificidade da resposta de anticorpos induzida por vacinação ou por infecção com o tipo sorológico do vírus (Abbas *et al.*, 1994), além da praticidade das técnicas usadas na detecção de anticorpos séricos. Além disso, os dados disponíveis obtidos como rotina nas monitorizações dos programas de vacinações são resultados da medida de anticorpos séricos.

O uso de títulos de anticorpos nesse trabalho não teve como objetivo medir o grau de proteção proporcionado às aves, mas utilizá-los como um parâmetro de comparação, estabelecendo um critério que permita uma interpretação objetiva dos títulos obtidos através da monitorização sorológica dos programas de vacinação.

A vacinação das aves está sujeita a muitas falhas. A admi-

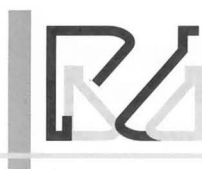
nistração inapropriada e a inativação por conservação inadequada das vacinas, as más condições de manejo e higiene, o nível de anticorpos maternos e a presença de outros agentes infecciosos imunodpressores são alguns dos fatores que afetam a qualidade da vacinação (Zander *et al.*, 1997). Essas falhas refletem-se nos resultados dos exames sorológicos e devem ser consideradas na sua interpretação. Para tanto, é fundamental a análise do coeficiente de variação dos títulos individuais do lote. Numa vacinação bem-feita, são esperados títulos uniformes, ou seja, um baixo coeficiente de variação, indicando que as aves foram bem imunizadas. Títulos não-uniformes indicam algum problema no manejo da vacinação ou na resposta imune apresentada pelas aves, e devem ser investigados. Títulos muito abaixo do esperado podem ser consequência de problemas no manejo da vacina, como a inativação do vírus no caso de vacinas vivas, uso de água clorada para diluição da vacina viva e mesmo más condições de higiene das instalações e equipamentos. A falha na resposta vacinal pode ainda estar ligada diretamente a uma deficiência na resposta imune das aves.

Os títulos de anticorpos com valores menores encontrados nas diversas situações relatadas podem ser consequência de mudanças no programa de vacinação, pelo uso de uma nova vacina que pode ter proporcionado resultados piores do que os anteriores, por alterações nos intervalos entre as vacinações ou por modificações no manejo da vacinação, criando situações de estresse que prejudicaram a resposta de anticorpos esperada. Devem ser investigados os critérios de amostragem, o protocolo utilizado na determinação laboratorial dos títulos e a ocorrência de doenças imunodepressoras concomitantes.

As mesmas razões que levaram a uma diminuição da resposta de anticorpos, discutidas acima, de modo inverso podem ter ocasionado o aumento nos títulos observado em algumas situações. Não deve ser descartada a possibilidade da infecção por uma cepa de campo ser a responsável pelos títulos mais elevados, o que pode ser confirmado através do diagnóstico laboratorial. Como o resultado obtido refletiu um maior título de anticorpos, as causas dessa alteração devem ser investigadas e mantidas ou implementadas na rotina do programa de vacinação e de monitorização da empresa, se for conveniente.

A determinação das principais causas que alteram a resposta de anticorpos das aves é a situação ideal a ser atingida através desse controle. Assim, através de uma análise de regressão múltipla, pode não somente ser realizado o controle ano a ano como também podem ser estabelecidas as possíveis causas de variação do processo, e o grau de influência exercido por elas. A correlação dos títulos de anticorpos com os parâmetros de produção é a próxima etapa a ser alcançada, proporcionando um controle mais efetivo e servindo como base para a tomada de decisões econômicas e sanitárias.

Neste trabalho, foram somente considerados o título de anti-



corpos em relação à idade das aves. Assim, o modelo ajustado, além de específico para a empresa, é específico para a linhagem, localização geográfica, programa de vacinação, teste sorológico e manejo geral do lote. Qualquer alteração significativa detectada pela comparação dos títulos do ano analisado com os limites dos intervalos de predição determinados a partir do modelo ajustado para a ano anterior, apenas indica a provável influência que alguma dessas variáveis não incluídas no modelo esteja exercendo sobre os títulos analisados. A inclusão no modelo das principais variáveis que influenciam a resposta imune humoral das aves, através da análise de regressão múltipla, e a correlação com os parâmetros de produção, como já citado acima, é o caminho indicado para a obtenção de um critério objetivo e prático para a tomada de decisões.

Desse modo, conclui-se que é possível o ajuste de equações de regressão que descrevam a relação entre as variáveis título de anticorpos e idade das aves, estabelecendo critérios de interpretação que permitem analisar de forma objetiva os resultados sorológicos obtidos a partir da rotina de monitorização do programa vacinal das empresas avícolas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abbas KA, Lichtman AH, Pober JS. Cellular and Molecular Immunology. 2nd ed. Philadelphia: W.B. Saunders Company; 1994.

Benjamim E, Leskowitz S. Immunology: a short course. 2nd ed. New York: Wiley-Liss; 1991.

Besterfield DH. Quality control. USA: Prentice-Hall Inc.; 1979.

Kleinbaum DG, Kupper LL. Applied Regression Analysis and Other Multivariable Methods. Belmont: Duxberry Press; 1978.

Feigenbaum AV. Total quality control. 3rd ed. USA: MacGraw-Hill; 1983.

Salle CTP, Cé MC, Santos CHC, Guahyba AS, Nascimento VP, Moraes HLS. Use of statistical technique on the interpretation of routine serologic data produced by poultry industry. In: Proceedings of Fourth Asia-Pacific Poultry Health Conference; 1998; Melbourne, Austrália. p. 148 (71).

Zander DV, Bermudez AJ, Mallinson ET. In: Calnek, BW, Barnes HJ, Beard CW, Mcdougald LR, Saif YM. Diseases of Poultry. 10th ed. Ames: Iowa State University Press; 1997. p. 3-46.