

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO DE UMA VACINA
INATIVADA CONTRA ESTIRPE VARIANTE BRASILEIRA DO
VÍRUS DA BRONQUITE INFECCIOSA AVIÁRIA**

Romeu Moreira dos Santos

Médico Veterinário

2014

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO DE UMA VACINA
INATIVADA CONTRA ESTIRPE VARIANTE BRASILEIRA DO
VÍRUS DA BRONQUITE INFECCIOSA AVIÁRIA**

Romeu Moreira dos Santos

Orientador: Prof. Dr. Hélio José Montassier

**Dissertação apresentada à Faculdade de
Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp,
Câmpus de Jaboticabal, como parte das
exigências para a obtenção do título de
Mestre em Medicina Veterinária (Patologia
Animal)**

2014



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

CAMPUS DE JABOTICABAL

FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS DE JABOTICABAL

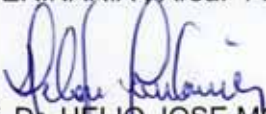
CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

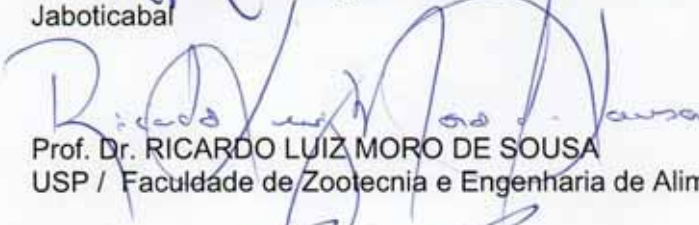
TÍTULO: DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO DE UMA VACINA INATIVADA CONTRA ESTIRPE VARIANTE BRASILEIRA DO VÍRUS DA BRONQUITE INFECCIOSA AVIÁRIA


AUTOR: ROMEU MOREIRA DOS SANTOS

ORIENTADOR: Prof. Dr. HELIO JOSE MONTASSIER

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de MESTRE EM MEDICINA VETERINÁRIA, Área: PATOLOGIA ANIMAL, pela Comissão Examinadora:


Prof. Dr. HELIO JOSE MONTASSIER
Departamento de Patologia Veterinária / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal


Prof. Dr. RICARDO LUIZ MORO DE SOUSA
USP / Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos / Pirassununga/SP


Prof. Dr. SAMIR ISSA SAMARA
Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal

Data da realização: 01 de dezembro de 2014.

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

ROMEU MOREIRA DOS SANTOS – Nascido em Maio de 1989 em Lagoa da Prata – MG. Graduado em Medicina Veterinária pela Faculdade Dr. Francisco Maeda (FAFRAM), Ituverava – SP, em dezembro de 2011. Realizou estágio no setor de Patologia Animal da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista - FCAV-UNESP Câmpus Jaboticabal-SP, entre agosto e outubro de 2011, sob orientação do Prof. Dr. Antônio Carlos Alessi. Entre outubro e dezembro de 2011 realizou estágio no Hospital Veterinário da FCAV-UNESP, sob orientação do Prof. Dr. Bruno Watanabe Minto. E entre maio e julho de 2012 participou de um treinamento teórico e prático no laboratório de Imunologia e Virologia Veterinária na FCAV-UNESP, sob supervisão do Professor Dr. Hélio José Montassier, nas áreas de imunologia, virologia e patologia aviária, onde também em agosto de 2012 ingressou no Mestrado pelo Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária (Patologia Animal), sob orientação do Professor Dr. Hélio José Montassier.

“Tudo o que você for fazer, faça com todo amor e dedicação, assim o sucesso surgirá como consequência, e não como obrigação.”

Sílvia Azevedo Terra

Dedico este trabalho ao meu querido amigo Duck (*in memoriam*) o melhor cão do mundo, que fez com que me despertaste para esta maravilhosa profissão.

E é claro as aves utilizadas neste estudo, sem elas nada disso seria possível.

AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar a Deus por me ajudar a realizar mais esta etapa de minha vida, e por ter me dado pessoas maravilhosas como meus pais Sebastião Romeu Moreira dos Santos e Marlete Aparecida dos Santos, que sempre me ajudaram nesta caminhada, sem eles não teria chegado a nenhum lugar.

Aos meus excepcionais amigos Duck (*in memorian*) e Spike, por terem me ensinado o verdadeiro valor da amizade e admiração por essa profissão.

Ao meu orientador Prof. Dr. Hélio José Montassier pela paciência, dedicação, esforço e ensinamentos que me passou para que eu pudesse realizar este trabalho.

Aos amigos do laboratório de Imunologia e Virologia e do Departamento de Patologia Veterinária: Filipe, Ketherson, Lurdinha, Mariana Borzi, Priscila Diniz e Maria de Fátima, pela colaboração, parceria e amizade.

A todos os meus queridos professores e amigos desta faculdade em especial: Elisa Schirato, Carla Rezende, Denise Granato e Prof^a. Dr^a Rosemeire, obrigado pelo incentivo e apoio, foi uma honra conhecer todos vocês.

A Neuza Maria Frazatti Gallina pesquisadora do Instituto Butantan, pela simpatia e gentileza em doar o inativante viral.

A Cintia Okino, pelo fornecimento dos primers e colaboração com a pesquisa.

A Igor Leonardo dos Santos, pela amizade, carisma e gentileza em doar a vacina comercial fornecida pela empresa Zoetis®, meus sinceros agradecimentos.

A Sérgio Cabral, pelo envio do adjuvante gentilmente doado pela empresa Seppic.

A todos os funcionários dessa instituição que sempre me ajudaram diretamente ou indiretamente na realização desse trabalho, em especial os funcionários da patologia e microbiologia.

As aves que foram utilizadas no experimento, já que através delas consegui desenvolver meu trabalho e dessa forma, ajudar outros animais que apresentam a mesma patologia.

A todos minha infinita gratidão.

SUMÁRIO

	Página
CERTIFICADO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS	iii
RESUMO	iv
ABSTRACT.....	v
LISTA DE ABREVIATURAS	vi
LISTA DE FIGURAS	viii
LISTA DE TABELAS.....	xi
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1 Bronquite infecciosa das galinhas.....	3
2.1.1 Histórico da BIG	3
2.2 Etiologia da BIG	4
2.2.1 Variantes do VBI no Brasil e no mundo	6
2.2.2 Característica físico-químicas do VBI.....	9
2.2.3 Transmissão do VBI.....	9
2.2.4 Período de incubação da infecção pelo VBI	9
2.3 Patogenia e sinais clínicos da BIG	9
2.4 Imunidade contra o VBI.....	11
2.5 Diagnóstico da BIG	12
2.6 Controle e prevenção da BIG	14
2.7 Vacinação (conceitos gerais)	14
2.7.1 Tipos de vacinas utilizadas para o controle e prevenção da infecção pelo VBI ..	15
2.7.1.1 Vacinas vivas atenuadas contra o VBI	16
2.7.1.2 Vacinas com vírus inativado contra o VBI	17
2.7.1.3 Adjuvantes em vacinas inativadas	19
2.8 Vacinação versus variantes do VBI.....	20
3 OBJETIVOS.....	22
3.1 Objetivo geral	22
3.2 Objetivos específicos.....	22
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	23
4.1 Vírus	23
4.2 Propagação da estirpe variante de campo do VBI	23
4.3 Determinação da infectividade viral.....	23
4.4 Preparação da vacina experimental	24

4.5 Infecção experimental	25
4.5.1 Delineamento Experimental: avaliação da vacina inativada com adjuvante a base de água em óleo	25
4.6 Mensuração de anticorpos locais e sistêmicos contra o VBI	26
4.7 Quantificação da expressão de genes relacionados às respostas imunes e da replicação viral.....	27
4.7.1 Extração de RNA total.....	27
4.7.2 Transcrição reversa (RT)	28
4.7.3 PCR em tempo real	28
4.7.4 Construção da curva padrão para quantificação da carga viral pela técnica de PCR em tempo real	30
4.8 Avaliação do estado de proteção após a infecção experimental	31
4.8.1 Avaliação Histopatológica	31
4.9 Análise estatística dos resultados	32
5 RESULTADOS	33
5.1 Determinação da infectividade viral.....	33
5.2 Preparação da vacina experimental	33
5.3 Alterações macroscópicas em aves vacinadas ou não e desafiadas com a estirpe IBVPR-05	33
5.4 Histopatologia	34
5.4.1 Traqueia	34
5.4.2 Rim	37
5.5 Mensuração de anticorpos locais e sistêmicos contra o VBI	40
5.6 Quantificação da carga viral nos órgãos colhidos de aves vacinadas ou não e desafiadas com o VBI	42
5.6.1 Construção da curva padrão para quantificação absoluta da replicação viral	42
5.6.2 Quantificação absoluta da replicação viral em diferentes órgãos	43
5.6.3 Quantificação relativa da expressão de genes relacionados às respostas imunes cito-mediadas	44
5.6.3.1 Determinação da expressão gênica do marcador CD8+ da célula T	44
5.6.3.2 Determinação da expressão gênica da Granzima A.....	46
5.7 Correlações	48
6 DISCUSSÃO.....	49
7 CONCLUSÕES.....	59
8 REFERÊNCIAS	60

CERTIFICADO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus de Jaboticabal

**CEUA – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS****CERTIFICADO**

Certificamos que o Protocolo nº 001193/13 do trabalho de pesquisa intitulado **“Desenvolvimento e avaliação de uma vacina inativada contra estirpe variante brasileira do vírus da bronquite infecciosa aviária”**, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Hélio José Montassier de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal, adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação (COBEA) e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA), em reunião ordinária de 05 de fevereiro de 2013.

Jaboticabal, 05 de fevereiro de 2013.

Prof. Dr. Andrigo Barboza De Nardi
Coordenador - CEUA

DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO DE UMA VACINA INATIVADA CONTRA ESTIRPE VARIANTE BRASILEIRA DO VÍRUS DA BRONQUITE INFECCIOSA AVIÁRIA

RESUMO - A bronquite infecciosa das galinhas (BIG) é uma doença infecciosa causada pelo coronavírus aviário (vírus da bronquite infecciosa – VBI) que está amplamente disseminada entre as criações avícolas comerciais na maior parte do mundo. Há atualmente no Brasil, uma predominância de infecções causadas por estirpes do VBI classificadas no genótipo variante (BR-I), que revelam diferenças marcantes de antigenicidade com relação à estirpe vacinal Massachusetts, rotineiramente usada em nosso país. Isso resulta em uma baixa imunidade-cruzada e conseqüentemente em um menor nível de proteção contra isolados de campo do genótipo BR-I. Dessa forma, os objetivos principais do presente estudo foram formular uma vacina experimental inativada com, uma estirpe IBVPR-05 variante do genótipo BR-1 do VBI acrescida de um novo adjuvante oleoso; testá-la após a administração, com 1 dia de idade, da vacina comercial atenuada com estirpe Massachusetts, avaliando-se as respostas imunes humorais e cito-mediadas, bem como o estado de proteção ao desafio com essa estirpe variante do VBI através da avaliação histopatológica e quantificação absoluta da carga viral presente na traqueia e rins de aves vacinadas e desafiadas com a variante. Os resultados deste estudo demonstraram que esse esquema imunoprolático (vacinação das aves com 1 dia de idade com vacina atenuada comercial e revacinação com 14 dias de idade com vacina inativada experimental homóloga) induziu aumentos significativos nos níveis de anticorpos lacrimais e séricos do isótipo IgG anti-VBI e também na expressão dos genes relacionados às respostas imunes cito-mediadas, sobretudo o da cadeia β do CD8 e da Granzima A, nas aves vacinadas, que se mostraram associados com a diminuição de lesões histológicas e uma menor carga viral na traqueia e rins nas aves vacinadas e desafiadas. Concluiu-se que as respostas imunes humoral e celular de memória conferidas pelo reforço vacinal contra a estirpe variante brasileira do VBI combinada com uma prévia vacinação com vacina atenuada (estirpe Massachusetts), induziu um efetivo estado de proteção contra a infecção por estirpe variante homóloga do VBI, tendo o potencial de proporcionar proteção contra outras estirpes do genótipo variante BR-I do VBI.

PALAVRAS-CHAVES: ornitopatologia, patotipo, protectotipo, vacina experimental homóloga.

DEVELOPMENT AND EVALUATION OF A INACTIVATED VACCINE AGAINST BRAZILIAN VARIANT STRAIN OF AVIAN INFECTIOUS BRONCHITIS VIRUS

ABSTRACT - The infectious bronchitis (IBV) is an infectious disease caused by avian coronavirus (infectious bronchitis virus - IBV) that is widespread among commercial poultry flocks in the world. There are currently in Brazil, a predominance of infections caused by strains of IBV classified in variant genotype (BR-I), which reveal striking differences in antigenicity with regard to the vaccine strain Massachusetts, routinely used in this country. The consequence is a low cross-immunity and lower level of protection against Brazilian field isolates of genotype BR-I. Thus, the main objectives of this study were to formulate an experimental inactivated vaccine with a variant strain of IBV previously characterized as genotype BR-I and added of a new oil adjuvant and test it after an administration, at 1 day old, of a commercial attenuated Massachusetts vaccine, followed by the evaluation of humoral and cellular immune (CMI) responses, as well as the state of protection upon challenge with this variant strain of IBV by histopathological examination and absolute quantification of viral load present in the trachea, and kidneys of these birds vaccinated and challenged with this variant strain. The results of this study demonstrated that this immunoprophylactic approach (vaccination of birds with 1 day old with attenuated commercial vaccine and revaccination at 14 days of age with annual experimental inactivated vaccine) was able to elicit significant increases in the serum and tear levels of anti-IBV antibodies of IgG isotype, and also in the expression of CMI genes, especially of CD8 β chain and Granzyme A in the vaccinated birds, which were associated with decreased histological lesions and reduced viral load in the trachea and kidney of vaccinated and challenged birds. It was concluded that humoral and cellular memory immune responses conferred by vaccination with this Brazilian variant strain of IBV combined to a previous Massachusetts vaccination, induced a state of effective protection against infection with a homologous strain of IBV, and has the potential to provide protection against other strains from the variant genotype BR-I of IBV.

Keywords: ornitopathology, pathotype, protectotipo, experimental homologous vaccine virus.

LISTA DE ABREVIATURAS

Acs - Anticorpos

AIF – adjuvante incompleto de Freund

BIG – Bronquite Infecciosa das galinhas

BLP – beta-propiolactona

BR-1 – genótipo de variantes brasileiras do vírus da bronquite infecciosa

CD4- - Marcador de linfócito T auxiliar

CD8+ - Marcador de linfócito T citotóxico CD8+

CMI - cellular immune

CT – “Threshold Cycle”

D - difuso

DEPC – Dietil-pirocarbonato

DIE – Dose Infectante Embrionária

DNA – Ácido desoxirribonucléico

Dnase – desoxirribonuclease

dNTP - Desoxirribonucleotídeos Fosfatados

DO – densidade óptica

dpi – dia pós-infecção

DTT – Dithiothreitol

ELISA – “Enzymed Linked Immunosorbent Assay”

F - focal

GAPDH - gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase

H120 – Holland 120

HE – Hematoxilina-Eosina

HI – Inibição da Hemaglutinação

IBV - infectious bronchitis virus

IBVPR-05 – estirpe variante do vírus da bronquite infecciosa pertencente ao genótipo BR-1

IgA – Imunoglobulina A

IgG – Imunoglobulina G
IgM – Imunoglobulina M
IL – Interleucina
Kb – Quilobases ou 1000 unidades de bases
kDa - Kilodalton
LCA – Líquido Cório Alantóide
LPD- Leite em pó desnatado
M41 – Massachussets 41
MF – multi-focal
ng – Nanograma
OIE – Organização Mundial de Saúde Animal
pb – Pares de bases
PCR – “Polimerase Chain Reaction” - Reação em Cadeia da Polimerase
pg - Picograma
pi – Pós Infecção
q PCR – Reação em cadeia da polimerase quantitativa
RNA – Ácido ribonucléico
Rnase – Ribonuclease
RT- “Reverse transcription” - Transcrição Reversa
S – “Spike” - Glicoproteína de Superfície
S-ELISA-Con A - Sandwich-ELISA-Concanavalina A
SPF – “Specific Pathogen Free” – Livre de patógenos específicos
TA – Temperatura Ambiente
Tc – linfócitos T citotóxicos
Th – linfócitos T auxiliares
Tm – “Melting temperature” – Temperatura de dissociação
TNF – Fator de Necrose Tumoral
TR – trato respiratório
VBI – vírus da Bronquite Infecciosa
VN – Vírus-neutralização

LISTA DE FIGURAS

		Página
Figura 1.	Diferentes genótipos do VBI encontrados no Brasil e no mundo (Fonte: MONTASSIER et al., 2012)	8
Figura 2.	Fotografia do isolador utilizado para alojamento das aves durante todo experimento (Fonte: FCAV-UNESP, Jaboticabal-SP)	26
Figura 3.	Imagem fotográfica das alterações macroscópicas pertencentes a ave 5 do grupo B (não vacinado e desafiado com a estirpe variante IBVPR-05). Nota-se acentuada nefromegalia e congestão dos rins (seta vermelha)	34
Figura 4.	Fotomicrografia do tecido traqueal de ave do grupo B (não vacinado e desafiado com estirpe variante IBVPR-05) aos 7 dpi. Nota-se moderado infiltrado inflamatório por heterofilos, perda de epitélio ciliar, hiperemia discreta e pequenos focos hemorrágicos na mucosa. HE, obj. 400x.	36
Figura 5.	Fotomicrografia do tecido traqueal de ave do grupo A (vacinado e desafiado com estirpe variante IBVPR-05) aos 11 dpi. Nota-se acentuada hipertrofia das células caliciformes (seta preta). HE, obj. 400x	36
Figura 6.	Fotomicrografia do tecido renal de ave pertencente ao grupo B (não vacinado e desafiado com estirpe variante IBVPR-05) aos 3 dpi. Nota-se moderado infiltrado inflamatório (heterofílico) e discreta degeneração das células tubulares (seta preta) indicando um quadro de nefrite aguda. Destaca-se no canto inferior direito tecido renal sem alteração patológica pertencente a uma ave do grupo C (controle). HE, obj. 400x.	38
Figura 7.	Fotomicrografia do tecido renal de ave pertencente ao grupo não vacinado B (não vacinado e desafiado com estirpe variante IBVPR-05) aos 3 dpi. Nota-se acentuada hiperemia vascular, células tubulares com núcleo em picnose (seta preta) demonstrando um quadro típico de necrose tubular. Destaca-se no canto inferior direito tecido renal sem alteração patológica pertencente a uma ave do grupo C (controle). HE, obj. 400x.....	39
Figura 8.	Fotomicrografia do tecido renal de ave pertencente ao grupo B (não vacinado e desafiado com estirpe variante IBVPR-05) aos 7 dpi. Nota-se acentuada hiperemia vascular em todo o órgão. HE, obj. 100x.	39

- Figura 9.** Perfil cinético da produção de anticorpos do isótipo IgG anti-VBI detectados pelo S-ELISAConA nas amostras de soro das aves, nos diferentes intervalos pós-infecção (pi). Legenda: dpi- dias pós infecção; A- grupo vacinado e desafiado com estirpe variante IBVPR-05; B- grupo não vacinado e desafiado com estirpe variante IBVPR-05; C- grupo controle; AP: amostras/positivas. Estão indicadas na figura as diferenças significativas (a,b,c) pelo teste de Mann-Whitney entre os grupos vacinados e não vacinados para cada intervalo avaliado; $p < 0.05$, médias seguidas de letras minúsculas diferentes diferem-se estatisticamente. 41
- Figura 10.** Perfil cinético da produção de anticorpos do isótipo IgG anti-VBI detectados pelo S-ELISAConA nas amostras de lágrimas das aves, nos diferentes intervalos pós-infecção (pi). Legenda: dpi- dias pós infecção; A- grupo vacinado e desafiado com estirpe variante IBVPR-05; B- grupo não vacinado e desafiado com estirpe variante IBVPR-05; C- grupo controle; AP: amostras/positivas. Estão indicadas na figura as diferenças significativas (a,b,c) pelo teste de Mann-Whitney entre os grupos vacinados e não vacinados para cada intervalo avaliado; $p < 0.05$, médias seguidas de letras minúsculas diferentes diferem-se estatisticamente. 41
- Figura 11.** Curva padrão gerada com uso dos valores de C(T) vs. Log das diluições seriadas de razão 10 (10^{-3} a 10^{-10}) do DNA plasmidial correspondente ao gene S1 do VBI. A eficiência da reação foi de 110,37%, estimada com base no coeficiente angular da reta como indicado pela fórmula 42
- Figura 12.** Número de cópias do gene S1 do VBI (Log_{10}) detectados nos rins das aves dos grupos A (vacinado e desafiado com estirpe variante IBVPR-05), B (não vacinado e desafiado com estirpe variante IBVPR-05) e no grupo C (controle). Estão indicadas na figura as diferenças significativas (a,b,c) pelo teste de Mann-Whitney entre os grupos vacinados e não vacinados para cada intervalo avaliado; $p < 0.05$, médias seguidas de letras minúsculas diferentes nas colunas diferem estatisticamente entre si. 43
- Figura 13.** Número de cópias do gene S1 do VBI (Log_{10}) detectados nos rins das aves dos grupos A (vacinado e desafiado com estirpe variante IBVPR-05), B (não vacinado e desafiado com estirpe variante IBVPR-05) e C (controle). Estão indicadas na figura as diferenças significativas (a,b,c) pelo teste de Mann-Whitney entre os grupos vacinados e não vacinados para cada intervalo avaliado; $p < 0.05$, médias seguidas de letras minúsculas diferentes nas colunas diferem estatisticamente entre si. 44

- Figura 14.** Comparação entre as intensidades da expressão do gene codificador do marcador de linfócito T citotóxico CD8+ no tecido renal, das aves do grupo A (vacinado e desafiado com estirpe variante IBVPR-05), grupo B (não vacinado e desafiado com estirpe variante IBVPR-05) e C (controle), nos diferentes intervalos pós-desafio. Não houve diferenças significativas pelo teste de Mann-Whitney entre os grupos vacinado e não vacinado, para cada intervalo avaliado ($p > 0,05$). 45
- Figura 15.** Comparação entre as intensidades da expressão do gene codificador do marcador de linfócito T citotóxico CD8+ na traqueia, das aves do grupo A (vacinado e desafiado com estirpe variante IBVPR-05), grupo B (não vacinado e desafiado com estirpe variante IBVPR-05) e C (controle), nos diferentes intervalos pós-desafio. Não houve diferenças significativas pelo teste de Mann-Whitney entre os grupos vacinado e não vacinado, para cada intervalo avaliado ($p > 0,05$). 46
- Figura 16.** Comparação entre as intensidades da expressão do gene codificador da Granzima homóloga A no rim, das aves do grupo A (vacinado e desafiado com estirpe variante IBVPR-05), grupo B (não vacinado e desafiado com estirpe variante IBVPR-05) e C (controle), nos diferentes intervalos pós-desafio. Médias seguidas de letras minúsculas diferentes nas colunas diferem estatisticamente entre si ($p > 0,05$). 47
- Figura 17.** Comparação entre as intensidades da expressão do gene codificador da Granzima homóloga A na traqueia, das aves do grupo A (vacinado e desafiado com estirpe variante IBVPR-05), grupo B (não vacinado e desafiado com estirpe variante IBVPR-05) e C (controle), nos diferentes intervalos pós-desafio. Médias seguidas de letras minúsculas diferentes nas colunas diferem-se estatisticamente ($p < 0,05$). 48

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1. Primers desenhados (Okino et al., 2013) para regiões de Exons específicos para a quantificação dos genes de cadeia beta do CD8, granzima A e gene constitutivo GAPDH.	29
Tabela 2. Parâmetros de avaliação da intensidade de lesões observadas nos tecidos frente ao desafio e vacinação com o VBI.	31
Tabela 3. Critérios de interpretação do coeficiente de correlação de Spearman.	32
Tabela 4. Alterações microscópicas observadas na traqueia dos grupos A (vacinado e desafiado com variante IBVPR-05), B (não vacinado e desafiado com variante IBVPR-05) e C (controle), FCAV/UNESP – Jaboticabal – SP, (2014).....	35
Tabela 5. Alterações microscópicas observadas no tecido renal pertencente aos animais dos grupos A (vacinado e desafiado com variante IBVPR-05), B (não vacinado e desafiado com variante IBVPR-05) e C (controle), FCAV/UNESP – Jaboticabal – SP, (2014).....	38

1 INTRODUÇÃO

A avicultura brasileira tem ganhado destaque no cenário mundial, e em vista de sua alta produtividade, transformou o Brasil em um dos maiores exportadores de carne de frango do mundo. A propósito, a produção de carne de frango chegou a 13,058 milhões de toneladas em 2011, em um crescimento de 6,8% em relação a 2010. Com este desempenho, o Brasil se aproximou da China, hoje o segundo maior produtor mundial, cuja produção de 2011 teria somado 13,2 milhões de toneladas, abaixo apenas dos Estados Unidos, com 16,757 milhões de toneladas, conforme projeções do Departamento de Agricultura dos EUA (USDA).

Estes dados dimensionam a importância da avicultura brasileira no cenário econômico do país. Deve-se enfatizar que ela pode ser ainda mais rentável dependendo da sanidade das aves, especialmente controlando as enfermidades que geram perdas por ineficiência na produção, bem como perdas por mortalidade. Dentre tais enfermidades, que se destaca por sua ampla disseminação e enormes prejuízos que acarreta, está a Bronquite Infecciosa das Galinhas (BIG), doença infecciosa aguda que acomete frangos, matrizes e poedeiras, sendo seu agente etiológico o vírus da bronquite infecciosa aviária (VBI).

O VBI apresenta alta capacidade de variabilidade genética, o que se traduz pelo aparecimento de alterações marcantes na composição, estrutura e propriedades antigênicas de suas proteínas. Como consequência de sua alta variabilidade, há o aparecimento de variantes antigênicas e biológicas entre as estirpes do VBI, acarretando o aparecimento de diferentes genótipos, sorotipos, protectotipos e patotipos do VBI (MONTASSIER et al., 2008, MONTASSIER, 2010).

Uma das medidas profiláticas que poderia contribuir para o controle mais efetivo da infecção com estirpes variantes do VBI no país é a adoção de programas de vacinação que associem vacinas formuladas com vírus vivo atenuado e vacinas inativadas com adjuvante oleoso. A existência de numerosas estirpes de vírus torna o problema ainda mais complexo face à conhecida falta de imunidade cruzada entre várias dessas estirpes virais (COOK et al., 2012; MONTASSIER et al., 2008, MONTASSIER, 2010).

No Brasil, pouco se tem investigado sobre as alterações imunes e de patogenicidade mais relevantes que as variantes isoladas de campo do VBI têm sofrido, bem como quais os seus reflexos nas relações com os seus hospedeiros naturais, assim como no estado de proteção induzido pelas vacinas contra a BIG.

Por isso, há necessidade de desenvolver estratégias mais apropriadas e eficientes para fazer a caracterização mais completa dos novos isolados variantes do VBI no Brasil, em especial quanto aos seus perfis de imunogenicidade. Assim, esta pesquisa propôs caracterizar os patótipos desses vírus de campo, a fim de criar uma nova vacina ou estirpe vacinal para proporcionar uma melhor condição de controle imunoprolático da BIG nos plantéis avícolas.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Bronquite infecciosa das galinhas (BIG)

A bronquite infecciosa das galinhas pode ser definida como uma doença altamente infecciosa, de origem viral, de caráter agudo que acomete aves, em ambos os sexos, com alta prevalência em regiões com maior densidade populacional (CAVANAGH; NAQI, 2003; MONTASSIER et al, 2008). É encontrada em praticamente todas as regiões produtoras avícolas do mundo, causando problemas em aves jovens e adultas. Acomete frangos de corte, poedeiras, matrizes leves e pesadas (CARDOSO et al., 1999; COOK, 2001; DI FABIO; ROSSINI, 2000), manifestando nestes animais alterações respiratórias, renais, reprodutivas e entéricas, causadas por uma grande diversidade de tipos de vírus da BIG, com ampla disseminação mundial (CAVANAGH; NAQI, 2003; MONTASSIER et al., 2008).

Tais situações comprometem de diferentes maneiras o estado sanitário das aves acometidas e facilita o desenvolvimento de infecções bacterianas secundárias, resultando, conseqüentemente, em perdas consideráveis da produtividade de criações comerciais de frangos de corte, galinhas de postura ou de aves reprodutoras (MONTASSIER et al., 2008).

2.1.1 Histórico da BIG

A BIG foi descrita pela primeira vez por Shalk em 1931 na Cidade Dakota do Norte, EUA, espalhando-se rapidamente por todo o país. Nos anos 40 foi descrito o impacto da BIG na produção e qualidade dos ovos e na década de 60 a síndrome nefrite-nefrose foi relatada na Austrália (KING; CAVANAGH, 1991).

No Brasil, a BIG foi diagnosticada pela primeira vez no ano de 1957 no Estado de Minas Gerais (HIPÓLITO, 1979). As estirpes do sorotipo Massachusetts parecem ter predominado até meados da década de 80, quanto foi reportado o isolamento da primeira variante no Brasil (Arkansas) (BRANDEN; DA SILVA, 1986).

Em outro estudo realizado em meados de 1990 foram isolados pelo menos cinco tipos antigenicamente diferentes de VBI em todo Brasil, principalmente nos

grandes polos avícolas, com maior concentração de produtores, na região sul do país (DI FABIO et al., 2000). Recentemente, vários genótipos diferentes foram identificados no Brasil. Estas variantes genéticas foram identificadas tanto como variantes do gene S1 da glicoproteína da espícula (MONTASSIER et al., 2006, 2008; VILLARREAL et al., 2007a; VILLARREAL et al., 2007b), quanto do gene da nucleoproteína (N) (ABREU et al., 2006).

Ademais, estudos de proteção vacinal contra estirpes isoladas na década de 1990 no Brasil e com isolados do genótipo variante BR-I mostraram que o sorotipo Mass forneceu proteção parcial e inadequada contra a maior parte dessas novas variantes brasileiras do VBI (COOK et al., 1999; FERNANDO et al., 2013).

2.2 Etiologia da BIG

O agente etiológico da BIG é o VBI, um membro do grupo 3, classificado na ordem *Nidovirales*, família *Coronaviridae*, subfamília *Coronavirinae* e pertencente ao gênero *Gammacoronavirus* (ICVA, 2014).

Os coronavírus são vírus envelopados, pleomórficos, aproximadamente arredondados, com aproximadamente 100nm a 150nm de diâmetro e com quatro ou seis proteínas estruturais, dependendo da espécie viral. O genoma do VBI é constituído de RNA de 27,6kDa de fita simples positiva que codifica quatro proteínas estruturais. A nucleoproteína (N) está associada ao genoma viral para formar o nucleocapsídeo (NC), enquanto as outras proteínas estruturais - projeções superficiais - *spikes* (S), proteína da membrana (M) e do envelope (E) - estão inseridas no envelope que circunda o nucleocapsídeo. As proteínas M e E são necessárias à formação da partícula viral (MCKINLEY et al., 2008). A glicoproteína S contém epítomos heterólogos entre os diferentes sorotipos do vírus que desempenham importante papel na adsorção ao receptor celular e entrada do vírus na célula hospedeira, além de induzirem anticorpos neutralizantes (CAVANAGH, 2007).

Essa glicoproteína é pós translacionalmente clivada em duas subunidades, a subunidade amino-terminal S1 de 92kDa e a subunidade S2 de 84 kDa, compreendendo cerca de 500 e 600 aminoácidos, respectivamente (CAVANAGH, 2007). A glicoproteína S pode ser dividida em três domínios estruturais, sendo um

domínio externo (dividido em dois subdomínios S1 e S2), um domínio transmembrana e um domínio curto carboxi-terminal (CAVANAGH, 1983; LAI; HOLMES, 2001). O gene S1 é o mais variável e pode apresentar mutações em sua sequência de aminoácidos, que acarretam alterações na antigenicidade e no tropismo tecidual das estirpes mutantes do VBI (CAVANAGH; NAQI, 2003). Estas variações podem ocorrer em torno de 2% a 25% na sequência de aminoácidos. Por outro lado, a subunidade S2 é mais conservada (CAVANAGH et al., 1997; KANT et al., 1992; KOCH et al., 1990).

Ainda, conforme descrito acima, deve-se salientar que o glicopolipeptídeo S1 é responsável pela infectividade viral, por possuir sítios que se combinam com os receptores de células alvo da infecção pelo VBI. Dessa forma, em regiões próximas a esses sítios estão presentes os principais determinantes antigênicos que induzem a formação de anticorpos neutralizantes. Um aspecto interessante é que a variação gênica de algumas regiões codificadoras da glicoproteína S, especialmente aquelas correspondentes aos sítios de vírus-neutralização, passa a se constituir na principal estratégia do VBI para escapar dos mecanismos de defesa do hospedeiro (CAVANAGH et al., 1997; COOK et al., 1999).

Por isso, pode-se afirmar que essa glicoproteína possui um papel biológico de elevada relevância para esse patógeno viral e para o organismo hospedeiro das aves. Nesse contexto, sabe-se que a glicoproteína S é a principal indutora da resposta imune protetora contra a infecção pelo VBI. A mesma é de fundamental importância na definição de quais estirpes desse vírus, que sofreram variação gênica, também alteraram sua antigenicidade e patogenicidade, a fim de estabelecer uma relação homóloga ou heteróloga com a estirpe vacinal de referência, que é usada no Brasil. Ainda neste enfoque, poderiam ser investigadas quais estirpes apresentam características essenciais para desenvolver uma potencial resposta imune nas aves e serem candidatas a entrarem na formulação de vacinas e dos esquemas imunoprolifáticos mais efetivos a serem adotados contra a BIG (CAVANAGH et al., 1997; COOK et al., 1999; FERNANDO, 2013).

As mudanças ativas e constantes da população viral permitem a seleção da subpopulação de VBI melhor adaptado ao hospedeiro, garantindo sobrevivência longa do vírus na célula, no organismo e na população hospedeira, levando às

mudanças na patogenicidade e à emergência de novos patógenos virais (CAVANAGH, 2007).

2.2.1 Variantes do VBI no Brasil e no mundo

De maneira semelhante à maioria dos vírus RNA, os *Coronavírus* têm uma alta frequência de mutação a qual decorre principalmente dos mecanismos de falhas de correção (“proof-reading”) da enzima RNA-polimerase, bem como pelo fato de a transcrição do RNA genômico ser descontínua nos coronavírus e se processar em “saltos”. A evolução do VBI é um fenômeno relativamente freqüente, em virtude da alta capacidade de variabilidade genética desse vírus, o que se traduz pelo aparecimento de alterações genéticas marcantes especialmente nos genes codificadores das proteínas estruturais S e N e, em menor escala, das proteínas não estruturais ou até mesmo em regiões não codificadoras. Essas alterações genéticas acarretam mudanças relevantes nas características fenotípicas, como por exemplo, nas propriedades antigênicas e naquelas associadas à virulência e/ou à patogenicidade desse mesmo agente infeccioso. Para ilustrar melhor as consequências da grande variabilidade que ocorre entre as estirpes do VBI, já foram descritos, em diversas partes do mundo, mais do que 20 sorotipos desse vírus (CAVANAGH; NAQI, 2003; CAVANAGH et al., 1992; GELB et al., 1991; KUSTERS et al., 1989).

Devido a sua alta taxa de variabilidade genética durante a transcrição gênica, o *Coronavírus* aviário pode ser considerado como uma “quasiespecies”, que se tratam de agrupamentos contendo um conjunto de variantes genotípicas e fenotípicas de um vírus, que tem como fundamentação a divisão genômica interespecífica causada por influencias internas e/ou externas, tais como o ambiente, os mecanismos de escape desencadeados pelo vírus, variabilidade e suscetibilidade ao hospedeiro (DOMINGO, 2002). Na verdade, o fenômeno das quasispecies tem sido relatado entre os coronavírus, e considera-se importante para a evolução e persistência destes vírus, porque pode favorecer o surgimento de novas variantes na natureza, e pode contribuir na previsão dos mecanismos de escape do vírus às respostas imunes do hospedeiro (ROWE et al., 1998; KISS et al., 2000).

Durante décadas acreditava-se que as primeiras variantes do VBI foram isoladas no início dos anos 1950 nos Estados Unidos por Jungherr et al. (1956). Estes autores demonstraram a estirpe Connecticut (Conn), a qual não apresentava reação de neutralização e nem proteção vacinal quando utilizada a vacina da estirpe Massachusetts, isolada no início dos anos 1940. Desde então muitos relatos de outras variantes do VBI foram descritos em todo o mundo. Este fato levou a uma maior atenção para a busca e a identificação e estirpes variantes e o conhecimento de que muitos países possuem suas próprias estirpes, denominadas indígenas (MONTASSIER et al., 2012).

Ao se considerar a ocorrência do VBI na América Latina, verifica-se que a presença desse vírus foi relatada pela primeira vez na década de 1950 após o isolamento de uma estirpe do sorotipo Mass no Brasil (HIPÓLITO, 1979). As estirpes desse sorotipo parecem ter predominado até meados da década de 80, quanto foi reportado o isolamento da primeira variante no Brasil (Arkansas) (BRANDEN; DA SILVA, 1986).

Em outro estudo realizado em meados de 1990, foram isolados pelo menos cinco tipos antigenicamente diferentes de VBI em todo Brasil, principalmente nos grandes polos avícolas, com maior concentração de produtores, na região sul do país (DI FABIO et al., 2000). Recentemente, com base na análise das sequências de nucleotídeos do gene S1 foram identificados, no Brasil, genótipos diferentes aqueles em que são classificadas as estirpes americanas, europeias, asiáticas e australianas do VBI (Figura 1) (MONTASSIER et al., 2006, 2008, 2012; VILLARREAL et al., 2007a; VILLARREAL et al., 2007b), tendo sido também identificadas estirpes variantes com relação à sequência de nucleotídeos do gene da nucleoproteína (N) (ABREU et al., 2006).

Os estudos de proteção vacinal contra estirpes isoladas na década de 1990 no Brasil mostraram que o sorotipo Mass, forneceu proteção inadequada contra a maior parte dessas novas variantes brasileiras do VBI (COOK et al., 1999; DI FABIO et al., 2000). Consta na literatura que essas estirpes foram isoladas de surtos de BIG, apresentando diversas manifestações clínicas e patológicas, tais como traqueobronquites e aerossaculites, lesões renais e problemas reprodutivos em fêmeas e em machos. Esses achados caracterizaram, assim, o potencial de um

amplo espectro de patótipos dentre esses isolados do VBI no Brasil (DI FABIO et al., 2000; ITO et al., 2006; MONTASSIER et al., 2006, 2012; VILLARREAL et al., 2007a;b). Ademais, foi demonstrado que uma das estirpes variantes brasileiras do VBI (IBVPR05) apresentava, em ensaios de infecção experimental, maior patogenicidade para os rins (nefropatogênica) e menor para o trato respiratório e, ainda, a infecção por esta estirpe era parcialmente controlada pela vacina formulada com a estirpe Massachusetts (H120), quanto à proteção contra alterações patológicas traqueais e renais induzidas por esse vírus. Portanto, as vacinas formuladas com estirpes Massachusetts não induzem proteção efetiva contra essa variante do VBI (Fernando et al., 2013).

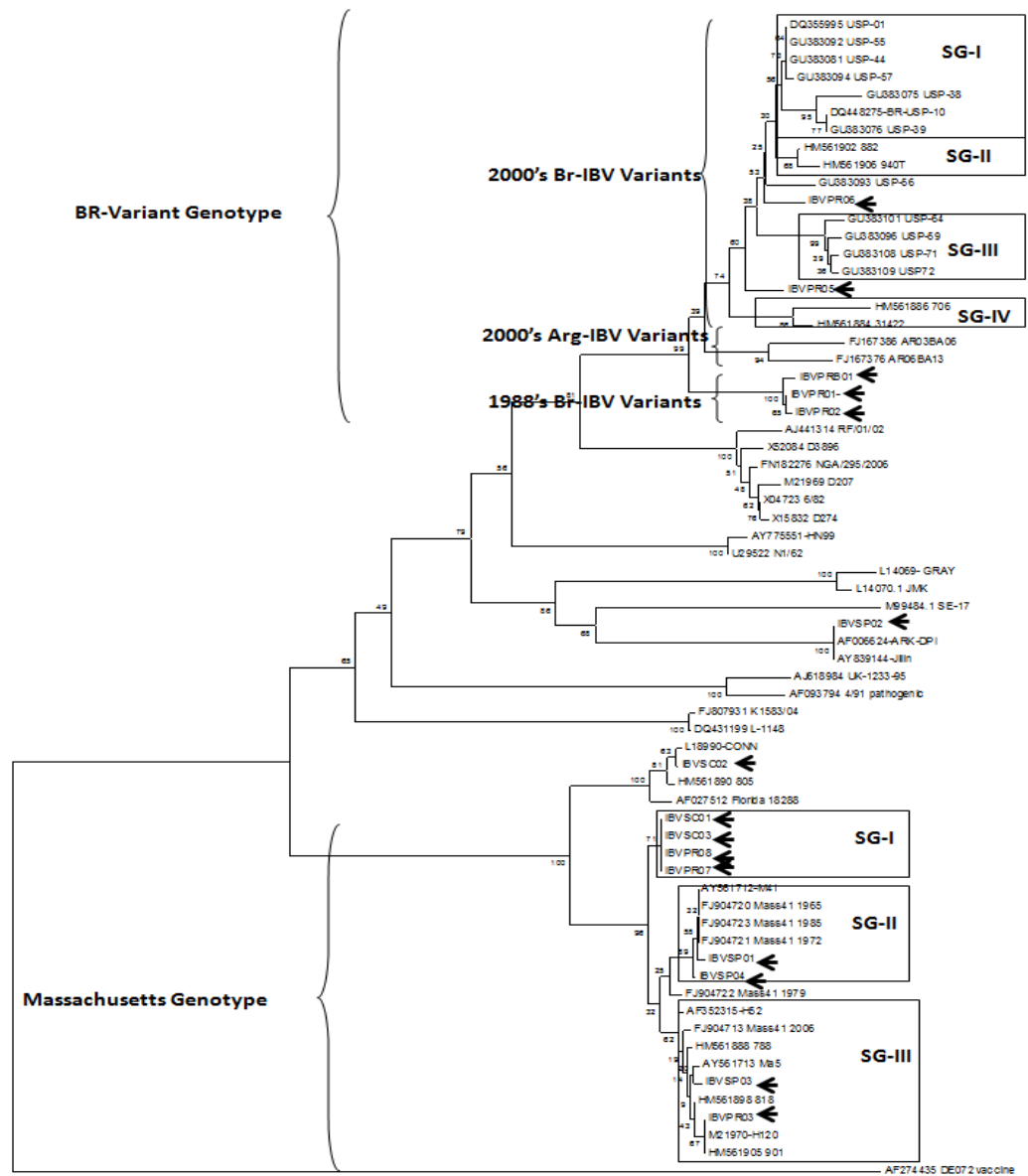


Figura 1. Diferentes genótipos do VBI encontrados no Brasil e no mundo (Fonte: MONTASSIER et al., 2012)

2.2.2 Características físico-químicas do VBI

A maioria das estirpes do VBI são inativadas após 15 minutos a 56°C e após 90 minutos a 45°C. Líquido alantoide infeccioso conservado a -30°C mantêm a viabilidade por muitos anos. Tecidos infectados, se conservados em refrigeração por 80 dias, conservam a viabilidade viral. Exsudato traqueal seco, se conservado a 4°C, permanece infectante por até 180 dias. O VBI é considerado como sensível à maioria dos desinfetantes comuns. Tripsina não tem efeito sobre ele. É sensível ainda à radiação UV. O vírus é resistente ao tratamento com pH ácido (2,0) por 1 hora/37°C, o que o diferencia de outras amostras virais (CAVANAGH; NAQI, 2003).

2.2.3 Transmissão do VBI

O VBI se dissemina pela via horizontal rapidamente por contato direto ou indireto. Tem sido sugerida a transmissão vertical do vírus, mas ainda não existem fatos comprovados sobre isto. O local primário de replicação é o trato respiratório superior, independentemente da estirpe ou característica patogênica do vírus (CAVANAGH, 2003).

2.2.4 Período de incubação da Infecção pelo VBI

O período de incubação da BIG pode ser de até 50 dias, e as infecções podem ocorrer associadas a infecções respiratórias bacterianas e virais, o que constitui fator importante na patogenia da BIG (CAVANAGH, 2007). Vários patógenos respiratórios como *Mycoplasma gallisepticum*, *Escherichia coli*, *Haemophilus paragallinarum*, vírus da doença de Newcastle e vírus da doença de Gumboro podem interagir sinergicamente com estirpes vacinais ou de campo do VBI, aumentando a severidade e duração da doença (MATTHIJS et al., 2009).

2.3 Patogenia e sinais clínicos da BIG

O VBI afeta primariamente o trato respiratório (TR) das aves, sendo esse o principal sítio de replicação viral. O vírus causa lesões nos trato respiratório, reprodutivo, urinário e digestivo, tanto em poedeiras, como em reprodutoras e aves de corte (CAVANAGH, 2003). É primariamente epiteliotrópico, replicando-se nas células epiteliais, nas células secretoras de muco e nas células epiteliais dos

pulmões e dos sacos aéreos. Durante a replicação, o VBI causa estase dos cílios traqueais, tanto *in vivo*, quanto *in vitro*, e esse parâmetro tem sido usado para inferir sobre a severidade da infecção no TR (DHINAKAR; JONES, 1997). A replicação do vírus nos tecidos do TR causa sinais característicos, mas não patognomônicos, como dificuldades para respirar, tosse e descarga nasal.

A morbidade é alta, podendo chegar a 100%, enquanto a mortalidade pode chegar a 20%, normalmente associada a infecções secundárias (MONTASSIER et al., 2008). Vírus nefropáticos também podem ser observados, acometendo o sistema urinário com lesões renais, diarréia moderada a severa e urolitíase (DI FÁBIO et al., 2000; GELB et al., 2001; IGNJATOVIC et al., 1997; WANG et al., 1997).

Segundo Cook (2001), o fato de não existir a observação clínica de infecção respiratória, não significa a ausência do vírus da BIG. Pode ocorrer uma manifestação clínica não tradicional, ou seja, sem os sinais característicos. Estas situações estão ligadas a um bom programa de vacinação, bom manejo e também boa biossegurança.

Em poedeiras, podem ser observados os mesmos sinais, mas também lesões no sistema reprodutivo, com alterações de casca (fina e porosa) e no formato dos ovos (COOK, 2001; DI FABIO; ROSSINI, 2000). Queda na produção de ovos e alterações na qualidade do albúmen (COOK, 2001; DI FÁBIO et al., 2000; MONTASSIER et al., 2008).

Não existem lesões patognomônicas para o VBI. Não se observam corpúsculos de inclusão. O exame histológico pode ser um recurso para se avaliar a virulência, a patogenicidade e avaliação de respostas imunes. Ao nível de trato respiratório, seja em situações de desafio de campo ou experimental, o que se nota é a ocorrência de diminuição dos cílios, descamação do epitélio, presença de células inflamatórias e presença de edema na porção da mucosa e submucosa. Observa-se ainda, congestão vascular. Na submucosa, vê-se vacuolização e hemorragia. O lúmen traqueal pode conter exsudato seromucoso, que pode ou não conter células inflamatórias (MONTASSIER et al., 2008).

A ausência de cílios e a descamação ocorrem nos primeiros dois dias de infecção, seja qual for a idade em que esteja ocorrendo a infecção. Em aves jovens o edema de submucosa é proeminente, com discreto infiltrado inflamatório. Em aves

mais velhas, esse infiltrado já se apresenta mais intenso, talvez pelo fato da resposta imune dessas aves ser mais eficiente. Esse infiltrado celular, bem como a presença de edema, também tem relação com a amostra de vírus, pelo fato de ser mais ou menos virulenta. Infecções secundárias também podem ter interferência na presença de infiltrado (CAVANAGH, 2003; DHINAKAR; JONES, 1997).

No trato reprodutivo, o que se pode observar é uma redução localizada ou generalizada de cílios, fibroplasia e edema, presença de focos de infiltrado celular mononuclear. No trato urinário observa-se, como lesão básica, nefrite intersticial (CHEN et al., 1996; DHINAKAR; JONES, 1997).

2.4 Imunidade contra o VBI

A infecção pelo VBI induz a produção de imunoglobulinas (Ig) IgM, IgG e IgA. Em reprodutoras imunizadas, o óvulo começa a adquirir IgG a partir da circulação sanguínea em torno de cinco dias antes da postura do ovo. Ao passar pelo oviduto, o óvulo, além do albúmen, adquire IgM e IgA, que são encontradas no líquido amniótico até metade do período embrionário. Durante o terço final da incubação, a IgG alcança a corrente sanguínea e pode inibir a replicação viral neste período. O pintinho recém eclodido possui níveis circulantes de IgG próximos aos encontrados nas progenitoras. Os anticorpos da classe IgG são metabolizados rapidamente com uma meia-vida média de aproximadamente três dias e podem persistir por 3-4 semanas, porém só conferem proteção na primeira semana (COOK et al., 1992; LANCELLOTTI et al. 2014; OKINO et al. 2013).

Segundo Di Fábio e Rossini (2000), em aves adultas, IgM é o primeiro anticorpo (Ac) a aparecer após uma infecção, atingindo uma alta concentração por volta do 7º dia pós-infecção. Podem persistir por 20 a 90 dias. É indicativo de infecção recente ou vacinação. IgG é o Ac com maior presença no soro após uma infecção, permanecendo por longo período. São os Ac quantificados na sorologia para diagnóstico da BIG e em monitoração de plantéis. As IgA são produzidas em secreções tais como secreção lacrimal ou salivar. Atuam como primeira linha de defesa do organismo à infecção, principalmente no trato respiratório superior.

Em galinhas, a resposta das células T citotóxicas (Tc) à infecção pelo VBI está correlacionada com um declínio inicial na infecção e nos sinais clínicos. A

atividade da Tc é principalmente restrita ao complexo de histocompatibilidade e à lise mediada por CD8+ e CD4-. O interferon tipo I em galinhas reduziu a replicação de VBI nas culturas de células renais de pintos, nas culturas de traqueia, e a aplicação oral ou intravenosa desse interferon retarda o aparecimento da doença e reduz sua severidade (MENDONÇA et al., 2009; OKINO et al., 2013)

Ao se falar em sistema imune não se pode deixar de mencionar o efeito imunossupressor que determinados agentes têm sobre ele. Aves infectadas por agentes imunossupressores apresentam uma diminuição da resposta imunológica, com diminuição da produção dessas imunoglobulinas, exacerbando os efeitos provocados pelo VBI, como por exemplo nos casos de interação com agentes como o vírus da Doença de Gumboro e *Cryptosporidium*, que atuam diretamente sobre a Bursa de Fabricius, ou ainda o vírus da Anemia Infecciosa das Galinhas, que atua sobre o timo, causam imunossupressão (MONTASSIER, 2010).

Tem-se relatado em frangos de corte o isolamento de estirpes patogênicas de Reovirus Aviário, que agiriam indiretamente como agentes imunossupressores. Isto pela interferência sobre a vacina de Marek aplicada ao primeiro dia, que por sua vez, tem efeito imunossupressor pela atrofia de órgãos linfóides primários (Bursa de Fabricius e timo). Substâncias antimicrobianas, tais como cloranfenicol, neomicina, estreptomicina, sulfonamidas podem ter o mesmo efeito, ou ainda agir diretamente sobre vacinas, diminuindo sua atividade imunogênica (MONTASSIER, 2010).

2.5 Diagnóstico da BIG

Embora o VBI seja um dos vírus que leva a grandes perdas econômicas na indústria avícola, os sinais clínicos desta doença não são específicos. Por isso, é necessário o emprego de ferramentas para identificar o VBI e relacioná-lo com o problema clínico evidenciado no campo. A confirmação do diagnóstico é baseada no isolamento viral, sempre em conjunto com a sorologia (DI FABIO; ROSSINI, 2000).

Para o diagnóstico virológico, devem ser coletadas amostras da mucosa traqueal e dos pulmões uma semana após a infecção, para a forma respiratória clássica. Para as outras formas de BIG, rins, ovidutos, tonsilas cecais do trato intestinal ou tecido do proventrículo são locais melhores para isolamento do vírus, dependendo da patogenia da doença (OIE, 2008).

Para o isolamento e a identificação de VBI, inocula-se macerado de órgãos em cavidade alantoide de ovos *Specific Pathogens Free* (SPF), com idade entre nove e 11 dias de incubação. Depois procede-se ao exame diário do embrião na procura de alterações morfológicas, como nanismo, enrolamento, depósito de urato nos mesonefrons e mortalidade embrionária. As técnicas de transcrição-reversa seguida de reação da cadeia de polimerase (RT-PCR) são comumente utilizadas para identificação genotípica dos isolados (DI FABIO; ROSSINI, 2000). Cultivos de anéis de traqueia foram usados para estudos de estirpes de VBI e da resposta imune em galinhas experimentalmente e naturalmente infectadas. O estudo em cultivos de anéis de embriões SPF é o método laboratorial que melhor se aproxima das condições *in vivo*, embora seja técnica trabalhosa e não utilizada pelos laboratórios em rotina. Testes complementares incluem microscopia eletrônica, uso de anticorpos monoclonais e testes imunohistoquímicos (DI FABIO et al., 2000).

No diagnóstico sorológico, a inibição da hemaglutinação (HI) é uma prova sorológica qualitativa utilizada tanto para identificação sorológica do vírus como no sorodiagnóstico do vírus. A identificação sorológica do vírus é feita por meio da HI utilizando-se um soropadrão.

O sorodiagnóstico é a detecção, no soro do animal, de anticorpo que inibe a hemaglutinação por um vírus específico (DI FABIO et al., 2000). Na forma respiratória clássica, anticorpos começam a aparecer no soro dos animais infectados uma semana após a infecção (OIE, 2008).

Para realizar o teste de HI, é necessário tratamento prévio do vírus com a enzima fosfolipase tipo C, para exposição das hemaglutininas (DI FABIO; ROSSINI, 2000), já que VBI não é naturalmente hemaglutinante. Entretanto, devido às múltiplas infecções e vacinações, o soro das aves contém anticorpos que apresentam reações cruzadas, e o resultado do teste de IH não pode ser utilizado com alto grau de confiança, além de ser laborioso e de difícil padronização (DI FABIO; ROSSINI, 2000; OIE, 2008).

O ELISA é utilizado para monitoramento sorológico da resposta vacinal e para o monitoramento dos desafios de campo. Soro-neutralização viral ou imunofluorescência, além de testes imunização-desafio, também podem ser utilizados (DI FABIO et al., 2000; OIE, 2008). O uso extensivo das vacinas pode

complicar o diagnóstico sorológico, já que anticorpos vacinais e contra desafios de campo não podem ser distinguidos daqueles produzidos durante a infecção (OIE, 2008).

2.6 Controle e prevenção da BIG

O controle da BIG deve ser baseado principalmente na aplicação de medidas de biossegurança e rigoroso controle sanitário dos plantéis. Vacinas vivas atenuadas e vacinas inativadas em emulsão oleosa são importantes (CAVANAGH, 2007), especialmente para a proteção de poedeiras e reprodutores. As vacinas vivas atenuadas conferem melhor imunidade local no trato respiratório. Entretanto, há o risco de patogenicidade residual, reversão de virulência e persistência (BIJLENGA et al., 2004; MCKINLEY et al., 2008). Dentre as vacinas atenuadas, citam-se a H52 e a H120, derivadas da amostra nefrotóxica Holland (H). A H120 é possivelmente a mais usada globalmente devido à sua capacidade de promover proteção cruzada contra diferentes sorotipos do VBI. O uso da H52 tem declinado devido ao surgimento de vacinas inativadas altamente eficazes e seguras (BIJLENGA et al., 2004).

No Brasil, a vacinação contra o VBI tem sido feita desde 1980 e o único sorotipo/genotipo liberado pelos órgãos oficiais é o *Massachusetts*. Tem-se demonstrado que as vacinas contra BIG preparadas com estirpes pertencentes ao sorotipo *Massachusetts* proporcionam um amplo espectro antigênico. Por essa razão, a maioria dos programas vacinais inclui esse sorotipo como base principal. Entretanto, apesar da vacinação cuidadosa, existem situações em que as vacinas licenciadas existentes não proporcionam proteção adequada contra desafios de novos sorotipos (FERNANDO, 2013).

2.7 Vacinação (conceitos gerais)

O termo vacinação cobre diversas técnicas executadas com a finalidade de proteger o animal, ativando seus sistemas de defesa imunológica específicos contra infecções virais e bacterianas, ou infestações parasíticas. Assim, as vacinas devem ser efetivas, induzirem proteção e seguras, para não produzirem doença no hospedeiro (ANDRE, 2003; BORNE, 2003).

A efetividade vacinal está relacionada com a capacidade de estimulação de células apresentadoras de antígenos, seguida da liberação das citocinas apropriadas. As vacinas devem estimular linfócitos T e B, gerando um número adequado de células de memória específicas para o antígeno inoculado. Devem ainda estimular a produção de linfócitos T auxiliares (Th) e T citotóxicos (Tc) específicos para diferentes epitopos do antígeno vacinal. O antígeno contido na vacina deverá persistir, preferivelmente, em locais específicos do tecido linfóide, permitindo que continue estimulando as células do sistema imunológico (CANAL; VAZ, 2007).

A indução de resposta imunológica mediada por linfócitos T (imunidade celular), que pode ser obtida de acordo com o tipo de vacina utilizada é uma das mais efetivas defesas do organismo contra os vírus. Igualmente importante é a capacidade de estimular a produção de anticorpos, capazes de neutralizar os vírions circulantes e, dessa forma, evitar a infecção de novas células (ANDRE, 2003; BORNE, 2003; TIMMS; BRACEWELL, 1983).

De modo ideal, espera-se que uma vacina seja capaz de conferir proteção prolongada do indivíduo frente a uma nova exposição ao agente, caracterizando a imunidade de longa duração. A estimulação de uma memória imunológica adequada irá permitir uma resposta imune mais intensa frente a uma nova exposição ao vírus (CANAL; VAZ, 2007).

Vacinas contra vírus de animais devem apresentar características específicas, tais como: facilidade de administração, custo de aquisição acessível, estabilidade do produto durante o armazenamento e após a inoculação no organismo, adequação para programas de vacinação em massa e capacidade de estimular imunidade forte e duradoura. Devem ainda causar o menor número possível de efeitos colaterais e não afetar o desempenho produtivo dos animais (ANDRE, 2003; CANAL; VAZ, 2007; TIMMS; BRACEWELL, 1983).

2.7.1 Tipos de vacinas utilizadas para controle e prevenção da infecção pelo VBI

A vacinação para controlar a BIG tem sido praticada há mais de meio século. Diferentes tipos de vacina contra VBI estão licenciados para uso veterinário, sendo a

maioria composta por vírus vivos atenuados ou por vírus inativados (BORNE, 2003; MAKELA, 2000).

2.7.1.1 Vacinas vivas atenuadas contra o VBI

As vacinas vivas atenuadas contêm vírus ou microrganismos vivos cuja patogenicidade é atenuada pela passagem em ovos embrionados de aves domésticas (BORNE, 2003; CAVANAGH, 2007; MAKELA, 2000).

As vacinas vivas atenuadas foram desenvolvidas para infectar a ave da mesma maneira que a estirpe patogênica, mas sem induzir os sintomas da doença. Esta infecção estimula a imunidade, que então oferece proteção contra ataques subsequentes. As vacinas são administradas ao lote inteiro como um todo, através da água de beber ou por nebulização, ou às aves individualmente, especialmente pelo método de colírio, injeção ou perfuração da membrana da asa (ANDRE, 2003; LAMBRECHTS et al., 1993; MUNEER et al. 1988)

As vacinas vivas contra VBI são geralmente aplicadas a frangos de corte com um dia de idade, no incubatório. Em situações experimentais isso, resulta em uma alta proteção imune quando desafiado pelo vírus virulento homólogo dentro de três semanas após a vacinação. No entanto, mesmo em situações experimentais bem controladas, 10% dos pintos vacinados não respondem adequadamente, com uma baixa resposta imunológica protetora frente ao desafio com a estirpe homóloga. Estes resultados mostram que galinhas não são uniformes em sua resposta à vacinação (CAVANAGH et al., 1997; HOFSTAD, 1981).

Neste contexto, outro aspecto importante da vacinação atenuada contra a BIG é sua proteção de curta duração, o início do declínio é aparentemente nove semanas após a vacinação. Devido a estes fatos, poedeiras comerciais que são mantidas por um ano ou mais, são vacinadas várias vezes com a vacina viva, às vezes com mais de um sorotipo. Mesmo os frangos de corte, que são processados em apenas seis ou mais semanas de idade, podem ser revacinados se a BIG causa muitas perdas na área. A revacinação pode ser com um sorotipo diferente, dando proteção contra uma ampla gama de sorotipos (DARBYSHIRE; PETERS, 1984; GOUGH; ALEXANDER, 1979).

A eficácia da vacinação com a vacina viva varia entre linhagens puras de galinhas; por exemplo, diferenças genéticas entre indivíduos afeta a eficácia da resposta imune (CAVANAGH, 2003).

A maioria das vacinas atenuadas não foram desenvolvidas comercialmente contra estirpes nefropatogênicas do VBI. Há, no entanto, estudos versando sobre o desenvolvimento de vacinas inativadas experimentais com estirpes nefropatogênicas do VBI (PEI et al., 2001; LADMAN et al., 2002, DE WIT et al., 2011).

Ainda, dentro desse mesmo contexto, alguns autores sugerem a associação de vacinas atenuadas preparadas com estirpes de referência pertencentes a diferentes genótipos/sorótipos, como ocorre com o uso da primo-vacinação com vacina com a estirpe Massachusetts (H120 ou Ma5), seguida da administração da vacina com a estirpe 4/91 (DE WIT et al., 2011). Além disso, um outro procedimento recomendado é associação de uma primeira vacinação com estirpe Massachusetts atenuada seguida de uma segunda vacinação com estirpe de campo inativada (LADMAN et al., 2002), pois com a ocorrência de novos sorótipos variantes do VBI, torna-se complicado desenvolver mais rapidamente uma estirpe vacinal atenuada a partir de um novo isolado de campo, ou em se aplicar várias vacinas vivas contra esse vírus em um curto período de tempo sem provocar interferências entre elas, aumentando a necessidade de vacinas inativadas, bem como há o risco de disseminação de uma estirpe vacinal atenuada exótica em um determinado país ou região.

2.7.1.2 Vacinas com vírus inativado contra o VBI

Vacinas inativadas, também chamadas de vacinas mortas, são obtidas a partir do vírus infectivo original, que passa pela eliminação irreversível da sua infectividade por métodos físicos ou químicos. São, portanto, vacinas compostas de partículas víricas íntegras, porém inertes e sem capacidade replicativa. São consideradas vacinas seguras porque possíveis vírus contaminantes, se presentes no estoque original de vírus, são também inativados durante o processo de inativação. Além disso, após a inativação, não existe possibilidade de retorno do vírus vacinal à forma virulenta (ANDRE, 2003; BORNE, 2003).

Atualmente, a β -propiolactona e os derivados da etilenemina são os inativantes mais utilizados pela indústria de vacinas. Além disso, as vacinas inativadas requerem o uso de potencializadores da resposta imunológica denominados adjuvantes (BOX et al., 1980; GOLDSTEIN; TAURASO, 1970; TIMMS; BRACEWELL, 1983).

Vacinas inativadas em emulsão oleosa contra o VBI foram desenvolvidas durante os anos 1960 e 1970. O objetivo era fazer uma vacina que daria imunidade duradoura a ave/galinha, especialmente para proteger contra quedas de produção de ovos. Alguns estudos, utilizando vacina inativada contra VBI, foram bem sucedidos na obtenção de proteção no trato respiratório frente ao desafio viral, embora geralmente a uma taxa menor que 59%. Entretanto, foi alcançada uma melhor proteção com a vacina inativada contra perdas na produção de ovos. Por isso, a prática comum é vacinar poedeiras com a vacina viva em duas ou três semanas de idade, seguido de mais vacinas vivas até pouco antes das aves começarem a postura dos ovos, quando então são dadas vacina mortas/inativadas. As vacinas vivas servem para dar proteção à ave jovem e a vacina inativada para uma melhor resposta imune (CAVANAGH, 2003; CAVANAGH, 2007; MCDUGALL, 1969; SONG et al., 1998).

Esta associação entre vacinas “vivas” e vacinas “mortas” têm demonstrado bons resultados em pesquisas recentes, conferindo às aves uma maior resposta imunológica frente à infecção. Além disso, torna-se mais fácil a formulação de vacinas com estirpes homólogas induzindo uma melhor resposta imune (LADMAN et al., 2002; DE WIT et al., 2011).

De Wit et al. (2011) obtiveram melhor proteção da traqueia de aves SPF (99,1%) contra uma estirpe classificada no genótipo variante brasileiro BR-I, associando uma dose de vacina viva com a estirpe Massachusetts (Mass) com uma segunda dose de vacina atenuada com a estirpe 4/91, quando comparado a vacinação atenuada (Mass) em única dose (91,5%) ou associada ao reforço com essa mesma vacina (90%).

Ao contrário, Ladman et al. (2002) demonstraram que aves primo-vacinadas com vacina atenuada e posteriormente re-imunizadas com vacina inativada oleosa formulada com estirpe nefropatogênica homóloga apresentaram menores índices de

lesões histopatológicas na traqueia e rins, quando comparados as aves apenas vacinadas com vacinas atenuadas.

Neste contexto, para formulação de uma nova vacina destaca-se a importância de selecionar uma estirpe com um elevado grau de semelhança ao antígeno viral. E com o surgimento de novos sorotipos e patotipos do VBI, a melhor proteção contra o desafio seria conseguir uma estirpe atenuada de sorotipo homólogo, principalmente em se tratando de patotipos nefropatogênicos. No entanto, a possibilidade de utilizar uma vacina viva com variante nefropatogênica para controlar a doença em plantéis comerciais não é possível até o momento presente, pois um vírus atenuado de segurança não está disponível, tornando importante a introdução de novas formulações de vacinas inativadas contendo sorotipos/patotipos homólogos (IGNJATOVIC; GALLI, 1994; LAMBRECHTS et al., 1993; LADMAN et al., 2002; DE WIT et al., 2011).

2.7.1.3 Adjuvantes em Vacinas Inativadas

Os adjuvantes são substâncias que têm a função de potencializar a resposta imunológica induzida por vacinas inativadas. Além de aumentar a magnitude da resposta imune, alguns adjuvantes são capazes de promover a indução da imunidade de mucosas e estimular linfócitos T_c, aumentando a eficiência de macrófagos e células dendríticas na apresentação de antígenos (BOX et al., 1980; BREWER, 2006; CANAL; VAZ, 2007; SILVA, 2004).

Na área veterinária, especificamente na avicultura, as substâncias mais utilizadas como adjuvantes são o óleo mineral e os sais minerais constituídos por sais de alumínio, embora outros compostos estejam sendo testados experimentalmente (BOX et al., 1980; BREWER, 2006; CANAL; VAZ, 2007; LAWRENCE et al., 1997; SILVA, 2004).

A série Montanide ISA de adjuvantes (pertencente a empresa Seppic) é formada por substâncias compostas à base de emulsão água-em-óleo utilizado para formulações de vacinas inativadas ou de subunidades. Seus benefícios comprovados na medicina veterinária incluem a produção de emulsões vacinais estáveis com baixa viscosidade, facilidade de aplicação, toxicidade reduzida e indução de uma resposta imune forte e de longa duração (LAWRENCE et al., 1997).

Dentre as formulações utilizadas na avicultura, destaca-se o adjuvante Montanide ISA 71, que devido à sua composição inovadora, baseada na forma de um óleo mineral leve específico e um emulsificante refinado obtido do manitol. Este adjuvante é capaz de aumentar a resposta de Th1 e melhorar de forma significativa a produção de IgG em relação aos adjuvantes de óleos tradicionais (JANG et al., 2011).

Embora este adjuvante não tenha sido testado em formulações de vacinas para VBI, ele demonstrou excelentes resultados em vacinas aviárias contra outras doenças. Jang et al. (2011) observaram em sua pesquisa que aves vacinadas com vacina formulada com adjuvante MONTANIDE ISA 71 adicionada de componente imunogênico (profilina) de *Eimeria acervulina*, apresentaram maior ganho de peso, menores índices de oocistos fecais e maiores níveis de anticorpos séricos anti-profilina de *E. acervulina*.

2.8 Vacinação versus variantes do VBI

Os programas de vacinação podem variar de um país para outro, ou mesmo de uma criação para outra, dentro do mesmo país, dependendo das condições locais o do levantamento das principais estirpes relatadas como circulantes. Em todos os países com avicultura mais avançada, existe uma grande cautela quanto ao uso indiscriminado de vacinas vivas, de modo a não se utilizar estirpes vacinais de outras partes do mundo que não estejam presentes em uma dada região ou país, e assim evitar a disseminação de linhagens genéticas e fenotípicas distintas das estirpes locais em suas criações (CAVANAGH et al., 1997; GELB et al., 1991)

Uma das maiores dificuldades encontradas na sanidade avícola é a identificação de sorotipos, patotipos e protectotipos de estirpes de campo em surtos da BIG. Esta tarefa necessita de grande empenho para isolamento seguido dos demais testes para caracterização antigênica e biológica desse vírus. O resultado normalmente é confirmado por outros testes, tais como VN e sequenciamento de nucleotídeos. Por isso, é de grande valia estabelecer características patogênicas de determinadas estirpes de campo, para que sirvam de ferramenta e auxiliem no direcionamento de possíveis surtos de BIG no Brasil (FERNANDO, 2013).

Em se tratando de Brasil, o controle da BIG é baseado principalmente no uso de vacina viva atenuada, sendo somente permitido a utilização de estirpes do sorotipo Mass na composição destas vacinas. Vacinas de caráter menos patogênico muitas vezes podem não conferir imunidade adequada para outros órgãos em adição ao trato respiratório (VILLARREAL et al., 2010).

Ainda neste contexto, sabe-se que os mecanismos essenciais de proteção contra a infecção do trato respiratório pelo VBI em galinhas têm sido definidos como a capacidade do sistema imune conferir resistência à traqueia contra a infecção por este vírus, reduzindo a replicação viral e impedindo principalmente que ocorram lesões mais severas na traqueia e a completa ciliostase no epitélio desse mesmo órgão, bem como impedindo a disseminação do VBI a partir da porta entrada para outros órgãos e tecidos do organismo hospedeiro. No entanto, com o repentino crescimento da indústria avícola no Brasil, a partir da década de 1990, diversas estirpes do VBI vieram a se adaptar trazendo grandes problemas sanitários. Estas estirpes muitas vezes se manifestam de maneira diferente das comumente associadas com a BIG em nosso país. O principal desafio para a comunidade científica é saber o estado de proteção imune desencadeado pela vacinação com estas estirpes preconizadas e/ou oficialmente autorizadas em nosso país, frente a estas novas variantes (FERNANDO, 2013).

A despeito da existência de inúmeros trabalhos na literatura versando sobre o nível de proteção contra o VBI, especialmente aquela que é decorrente do uso de vacinas, restam muitas dúvidas sobre a eficácia destas preparações vacinais frente as variantes isoladas em todo o mundo, e por isso é necessário antever as características biológicas destas estirpes, bem como buscar alternativas para um correto manejo sanitário contra estas variantes.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

- Desenvolver e avaliar uma vacina inativada contra nova estirpe variante do genótipo BR-I (IBVPR-05) do VBI isolada e identificada no Brasil.

3.2 Objetivos específicos

- Formular uma vacina experimental inativada a partir dessa nova variante do VBI isolada de campo no Brasil.
- Avaliar a imunogenicidade da vacina inativada formulada com a estirpe variante do VBI administrada após a vacina atenuada comercial formulada com a estirpe Massachusetts, por meio da mensuração das respostas imunes humorais e cito-mediadas;
- Avaliar o estado de proteção ao desafio com essa estirpe variante homóloga do VBI, estudando as alterações histopatológicas na traqueia e nos rins, e a carga viral presente nesses órgãos.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Vírus

Foi utilizada uma estirpe variante de campo do VBI (IBVPR-05), isolada e caracterizada geneticamente por Montassier et al. (2006, 2008), para a produção da vacina experimental inativada com adjuvante a base de água em óleo. A mesma estirpe variante foi utilizada para a realização da infecção experimental (desafio) nas aves.

4.2 Propagação da estirpe variante de campo do VBI

O procedimento de propagação da estirpe IBVPR-05 foi realizado em ovos embrionados SPF (specific pathogen free) provindos da Granja de Aves SPF da Brasil Foods, localizada em Uberlândia - MG. Esta técnica foi realizada com base na descrição de Owen et al. (1991), com modificações. Para a propagação viral uma amostra da variante do VBI em líquido córion-alantoide (LCA) foi inoculada em ovos embrionados SPF com 9 dias de idade. Inicialmente, a amostra foi preparada e diluída na razão 1:100 em meio Eagle e foi inoculada na cavidade córion-alantóide, administrando-se um volume de 200µL/ovo. Após 24 horas da inoculação, os ovos foram avaliados; a mortalidade que ocorreu neste período foi considerada inespecífica e o ovo, descartado. Decorridas 36 horas da inoculação, os ovos foram refrigerados a 4°C e o LCA foi colhido individualmente, sendo distribuído em alíquotas de 1,5mL e estocado a -70°C até o seu processamento para titulação da infectividade viral. A mortalidade dos ovos controle (ovos inoculados apenas com meio Eagle) foi avaliada diariamente e, ao final um período de sete dias, foram resfriados e os embriões foram avaliados quanto à presença de lesões características da infecção pelo VBI, tais como “nanismo, hemorragia e enrolamento”.

4.3 Titulação viral

A infectividade viral da estirpe IBVPR-05 foi determinada por titulação viral em ovos embrionados de galinhas SPF, com 9 dias de incubação,

segundo o protocolo de Owen et al. (1991). Partindo-se do líquido córion-alantóide colhido de ovos infectados com a estirpe IBVPR-05, após a terceira passagem, foram preparadas diluições de razão constante igual a 10, até a diluição final de 10^{-9} , em Meio Eagle (Gibco BRL, EUA) contendo antibióticos (200 UI/mL de Penicilina e 50 µg/mL de Estreptomicina) e antifúngico (50 UI/mL de Anfotericina B). As suspensões foram inoculadas na cavidade alantóide, no volume de 200 µL/ovo, sendo utilizados cinco ovos para cada diluição, além de dez ovos destinados ao controle (não infectados). A mortalidade foi observada durante todo o período de incubação, considerando-se morte inespecífica até 24 horas. Findados sete dias, as alterações embrionárias dos sobreviventes foram analisadas, e no final o número de Doses Infectantes Embrionárias 50% (DIE50%) foi determinado pelo o método de Reed e Muench (1938).

4.4 Preparação da vacina experimental

Para formulação da vacina foi utilizado como reagente para inativação viral a beta-propiolactona (BPL). Os vírus foram preparados, utilizando-se o LCA infectado na passagem em ovos embrionados de galinha e concentrado com PEG-NaCl (Bronzoni et al., 2005), contendo 10^8 DIE₅₀/ml da estirpe IBVPR05. BPL foi adicionada à suspensão de vírus para dar uma concentração de 1:2000, e a mistura foi incubada por 90 minutos a 37°C, sob agitação contínua, seguindo a metodologia utilizada por McDougall (1969).

Para o controle de vírus infeccioso residual, a IBVPR-05 inativada foi inoculado em ovos embrionados SPF com 9 dias de idade, sendo a presença e/ou ausência de lesões patológicas monitorada por 96 horas.

Após comprovada inativação viral, foi incorporada à mistura o adjuvante a base de água em óleo (MONTANIDE ISA 71 VG, SEPPIC) na proporção 70% do adjuvante mais 30% do vírus inativado, conforme as recomendações do fabricante Seppic.

4.5 Infecção experimental

Os experimentos foram realizados no infectório do Laboratório de Imunologia e Virologia Veterinária do Departamento de Patologia Animal da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Câmpus de Jaboticabal (FCAV-UNESP). O protocolo obedeceu aos Princípios Éticos de Experimentação Animal, adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação (COBEA), aprovado pela Comissão de Ética e Bem Estar Animal (CEBEA) da FCAV-UNESP, conforme o protocolo nº 01193/13.

4.5.1 Delineamento Experimental: avaliação da vacina inativada com adjuvante a base de água em óleo

Foram utilizadas 26 aves SPF da linhagem de postura “White Leghorn”, distribuídas em três grupos, um grupo com 6 animais (controle) e dois com 10 animais (tratamentos experimentais), alojados separadamente em grupos em isoladores, com água e comida à vontade durante todo o experimento (Figura 2).

O primeiro grupo (Grupo A) foi vacinado por via óculo-nasal no 1º dia de idade com a vacina “viva” atenuada H120 do VBI (vacina comercial atenuada MASS I® FORT DODGE, na dose preconizada pelo fabricante, ou seja, $10^{4,0}$ DIE_{50%}), sendo novamente revacinado por via intramuscular (peitoral) aos 14 dias de idade com 0,5ml da vacina experimental inativada homóloga da nova variante de campo do VBI (IBVPR-05), na dose $10^{8,0}$ DIE_{50%}. O segundo (Grupo B) e terceiro (Grupo C) grupos receberam somente o diluente utilizado na vacinação do primeiro grupo. Aos 35 dias de idade as aves do primeiro (Grupo A) e segundo grupos (Grupo B) foram desafiadas via óculo-nasal com a estirpe variante de campo do VBI (10^4 DIE₅₀). O terceiro grupo (Grupo C) foi mantido como controle negativo da infecção, já que não foi submetido à vacinação nem ao desafio.

As aves foram observadas quanto aos sinais clínicos, anotando-se alterações significativas. Três aves de cada tratamento experimental (Grupo A e B) foram sacrificadas aos 3, 7 e 11 dias pós-infecção (d.p.i.); já no grupo controle (grupo C) apenas 2 aves foram sacrificadas em cada intervalo, para colheita de material, sendo colhidas amostras de traquéia, rins, soro e lágrima.

Parte das amostras de traquéia foi destinada à histopatologia, e o restante das amostras teciduais foram submetidas ao congelamento rápido em nitrogênio líquido e armazenadas a -70°C até o momento de serem processadas pela técnica de extração de RNA, seguindo os procedimentos descritos por OKINO et al. (2013).

As amostras de soro e de lágrima foram coletadas e armazenadas a -20°C , até o momento de serem processadas pela técnica de Sandwich-ELISA-Concanavalina A (S-ELISA-Con A).



Figura 2. Fotografia do isolador utilizado para alojamento das aves durante todo experimento (Fonte: FCAV-UNESP, Jaboticabal-SP).

4.6 Mensuração de anticorpos locais e sistêmicos contra o VBI

Para mensuração de anticorpos anti-VBI do isótipo IgG foi utilizado o teste de Sandwich-ELISA-Concanavalina A (S-ELISA-ConA), segundo as recomendações de BRONZONI et al. (2005), presentes tanto no soro sanguíneo, como na secreção lacrimal em amostras colhidas das aves, vacinadas ou não, e submetidas à infecção experimental.

Resumidamente, $50\mu\text{L}$ de Concanavalina A ($0,00625\text{ mg/mL}$ de PBS pH 7,4) foram aplicados nas cavidades da microplaca de poliestireno (Costar). A microplaca foi incubada a 4°C “overnight” (14-16 horas). A Concanavalina em

excesso foi eliminada, por três lavagens das cavidades da microplaca com tampão PBS acrescido de Tween 20 0,1% (PBST) pH 7,4.

Foi realizado o bloqueio com tampão PBS acrescido de leite em pó desnatado (LPD) a 10% (100µL por cavidade), a microplaca foi incubada a 37°C durante 45 minutos, e em seguida lavada três vezes com tampão PBST. Na fase subsequente, foram adicionados 50µL de suspensão antigênica viral (IBVPR-05 do VBI em LCA) diluído a 1:2 em PBS (pH 7,4) acrescido de 10% de LPD por cavidade, com incubação a 37°C, por uma hora. Seguindo-se a adição do antígeno e quatro lavagens foram adicionadas as amostras-teste de soro, na diluição 1:100 (IgG), ou de lágrima, na diluição 1:25, em duplicata. A reação foi incubada durante uma hora a 37°C. As microplacas foram lavadas quatro vezes com tampão PBST. Acrescentou-se 50µL dos anticorpos conjugados com peroxidase anti-IgG de galinha (1:2000), incubando-se durante duas horas a 37°C. Seguindo quatro lavagens das microplacas com PBST, foram acrescidos 50 µL de solução do substrato-cromógeno orto-fenileno-diamina (OPD, Dako, USA) diluído em H₂O deionizada contendo 0,006% de H₂O₂, sendo a reação incubada por um período de 15 minutos à temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Por fim, a reação de degradação enzimática do substrato foi bloqueada pela adição de 50µL/cavidade de ácido clorídrico 1M, sendo, ao final, as densidades ópticas (DO) obtidas e mensuradas em leitor de microplaca a 490nm (Bio-Rad, Modelo-550, USA). Os valores de DO obtidos foram convertidos em A/P (amostra x positivo), de acordo com a equação abaixo.

$$AP = \frac{(\text{DO amostra teste} - \text{DO controle negativo})}{(\text{DO controle positivo} - \text{DO controle negativo})}$$

4.7 Quantificação da expressão de genes relacionados às respostas imunes e da replicação viral

4.7.1 Extração de RNA total

A extração do RNA total dos órgãos em avaliação foi realizada com o kit comercial Trizol Reagent (Invitrogen, Life Technologies), seguindo as recomendações do fabricante.

Aproximadamente 100mg a 200mg das amostras foram maceradas juntamente com 1000µL de Trizol Reagent, com auxílio de um micropistilo e um microtubo isento de DNase e RNase. A mistura foi homogeneizada por 15 segundos em vórtex e incubada por 5 minutos à temperatura ambiente (TA). Acrescentou-se 200µL de uma mistura de clorofórmio e álcool isoamílico (24:1), realizando-se agitação por inversão por no mínimo 10 vezes. Após um período de cinco minutos à TA, as amostras foram centrifugadas a 12000g durante 15 minutos a 4°C. Após a centrifugação, aproximadamente 500µL do sobrenadante foi separado e transferido para outro microtubo de 1,5mL livre de DNase e RNase. As amostras de RNA foram precipitadas em 500µL de isopropanol, após incubação por quinze minutos, a -70°, e centrifugação 12000g, por dez minutos a 4°C. O isopropanol suspenso foi descartado e as amostras foram lavadas em 1000 µL de etanol (75%) e secas à TA. Em seguida, os precipitados foram ressuspensos em 12µL de água tratada com dietil-pirocarbonate 0,1% (DEPC).

4.7.2 Transcrição reversa (RT)

A reação de transcrição reversa foi efetuada em um Termociclador PTC – 200 Peltier Thermal Cycler (MJ Research). O protocolo começou incubando-se a 65°C durante cinco minutos: 50ng do RNA genômico extraído, dNTP 0,5mM (Invitrogen, Life Technologies), 0,5µg de Randon Primer (Invitrogen, Life Technologies) e 3µL de água DEPC. Em seguida, acrescentou-se o tampão da RT 5 x (Invitrogen), 40U de inibidor de ribonucleases (Invitrogen, Life Technologies) e incubou-se a 42°C durante dois minutos. Por fim, 50U da enzima SuperScript (Invitrogen) foi adicionada a mistura, incubando-se a 42°C durante 50 minutos, e a 70°C por 15 minutos. O volume final da reação foi de 20µL. O DNA complementar (cDNA) obtido pela transcrição reversa foi armazenado a -20°C para uso posterior na técnica de PCR em tempo real.

4.7.3 PCR em tempo real

Após a extração do RNA total e a síntese do cDNA, foi realizado o método de PCR em tempo real seguindo os procedimentos descritos por Okino et al. (2013). Em suma, utilizou-se o marcador SYBR Green I, sendo a reação

conduzida em um aparelho termociclador Chromo 4 - PTC – 200 Peltier Thermal Cycler (MJ Research). Foi utilizado um volume de 2,0µL de cDNA proveniente da RT, ao qual acrescentou-se 10,0µL da mistura KAPA SYBR® FAST Universal 2X qPCR Master Mix (KAPABIOSYSTEMS), 10pmol de cada “primer” desenhados por Okino et al (2013) (Tabela 1), completando-se com água para um volume final de 20µl. Destaca-se que tanto o primer forward como o reverse foram desenhados para regiões de Exons específicos para a quantificação dos genes de cadeia beta do CD8, granzima A e também do gene constitutivo GAPDH, de forma que somente o RNAm serviria como molde (template) para a amplificação pela técnica de qPCR em tempo real. As reações foram realizadas em microtubos especiais de 0,2mL com as tampas apropriadas para leitura óptica, o que é requerido pelo sistema de detecção e mensuração fotométrica desse equipamento de PCR em tempo real.

Tabela 1. Primers desenhados (Okino et al., 2013) para regiões de Exons específicos para a quantificação dos genes de cadeia beta do CD8, granzima A e gene constitutivo GAPDH.

Gene	Primers (5´-3´)	Acession number	Location (nt)	Product size	Exon boundary
GAPDH	Forward: AGCTGAATGGGAAGCTTACTGG	NM_204305.1	719-792	74 bp	4/5
	Reverse: GCAGGTCAGGTCAACAACAGAG				
CD8β (2)	Forward: CTGCATGGCTCCGACAATGG	NM_205247.2	710-802	93bp	2/3
	Reverse: ATCGACCACGTCAAGCTGGG				
Granzyme A (2)	Forward: GCGTAGCAGGATGGGGACAA	NM_204457.1	429-627	199bp	4/5
	Reverse: CCACCTGAATCCCCTCGACA				

Foi realizada a quantificação relativa da expressão gênica da Granzima A e do marcador cadeia beta de linfócito T citotóxico CD8+, a partir do cDNA obtido pela técnica de RT, utilizando-se a técnica de PCR em tempo real.

O perfil térmico da PCR foi constituído por um primeiro ciclo de 95°C por três minutos, seguindo-se de mais 40 ciclos, compostos por desnaturação a 95°C por 3 segundos, anelamento a 60°C por 15 segundos e extensão a 72°C por 18 segundos. Ao final dessa etapa, foi realizada a dissociação dos produtos amplificados de DNA, entre a temperatura de 65°C e 95°C para a avaliação da T_m , e as leituras efetuadas a cada 0,2°C. Todas as amostras foram testadas, no mínimo, em duplicata.

A quantificação relativa da expressão gênica das citocinas e demais genes relacionados à imunidade celular foi realizada conforme o método descrito por Livak e Schmittgen (2001), sendo a expressão de cada gene normalizada em relação ao gene GAPDH, utilizando-se como nível basal de expressão gênica as amostras provenientes de aves do grupo controle negativo (grupo C, não imunizadas e não desafiadas).

Para a quantificação da replicação viral os ciclos da reação foram constituídos por um primeiro ciclo de 95°C por três minutos, seguindo-se de mais 40 ciclos compostos por desnaturação a 95°C por três segundos, anelamento a 45°C por 30 segundos e extensão a 72°C por três segundos. Ao final dessa etapa de 40 ciclos, foi realizada a dissociação dos produtos amplificados de DNA, entre a temperatura de 65°C e 95°C, para a avaliação da T_m , e as leituras efetuadas a cada 0,2°C. Todas as amostras foram testadas, no mínimo, em duplicata.

4.7.4 Construção da curva padrão para quantificação da carga viral pela técnica de PCR em tempo real

A curva padrão foi construída para quantificação relativa do cDNA. Um fragmento de cerca de 1,6Kb do gene S1 da estirpe M41 do VBI foi clonado no vetor pGEM T Easy (Promega). O DNA plasmidial foi extraído, quantificado através da leitura em biofotômetro (Eppendorf) e submetido a diluições seriadas de razão constante igual a 10 (10^{-1} a 10^{-10}), e em seguida à técnica de RT-PCR em tempo-real com a utilização de “primers” para amplificação de sequência parcial do gene S1 do VBI.

O valor obtido da quantificação do DNA plasmidial extraído foi convertido em número de moles utilizando-se o programa computacional Molbio.ru (www.molgen.mpg.de/~soldatov/protocols/scripts/01_07.html).

Os valores de “threshold cycle” (CT) obtidos a partir da RT-PCR em tempo real foram subsequentemente usados para calcular e traçar uma linha de regressão linear através do logaritmo do número de moles do “template” (eixo Y) contra o valor correspondente de CT (eixo X).

4.8 Avaliação do estado de proteção após a infecção experimental

4.8.1 Avaliação histopatológica

Após serem colhidas, as amostras foram processadas por técnicas histológicas usuais de fixação, desidratação, diafanização e coloração com hematoxilina-eosina (HE), para a realização dos exames histopatológicos. Essas etapas foram conduzidas por laboratório terceirizado.

Foram avaliadas alterações circulatórias como hiperemia e hemorragia; alterações celulares como degenerações, necrose e autólise; presença de infiltrado inflamatório; alterações de crescimento como hipotrofia e hipertrofia; presença de pigmentos como hemossiderina. As alterações foram descritas e classificadas de acordo com a distribuição (focal, multifocal e difusa) e intensidade (discreta, moderada e acentuada) da lesão (Tabela 2). Durante a observação microscópica foram utilizados os aumentos de 4x, 10x, 20x, 40x na objetiva.

Tabela 2. Parâmetros de avaliação da intensidade de lesões observadas nos tecidos frente ao desafio e vacinação com o VBI.

Intensidade (escore) da lesão	% de severidade acometida no tecido
Ausente (0)	0%
Discreto (I)	> 0 e ≤ 25%
Moderado (II)	> 25 e ≤ 50%
Acentuado (III)	> 50%

%; percentagem

4.9 Análise estatística dos resultados

Toda a análise estatística foi realizada empregando-se o programa computacional Graphpad Prisma 4 for Windows, versão 4.0, Inc. 2003, sendo adotados testes não paramétricos.

Para a determinação das diferenças das medianas entre os grupos do delineamento experimental relativo à ELISA e q-PCR foi utilizado o teste de Mann-Whitney (dois grupos experimentais). Entre os ensaios foram aplicados intervalos de confiança de 95%, e considerados estatisticamente significantes níveis descritivos iguais ou inferiores a 0,05.

As análises de correlação entre os ensaios foram determinadas pelo método de Spearman, ao nível de significância de 5%. Os diferentes graus de correlação entre os ensaios foram classificados de acordo com a tabela 3.

Tabela 3. Critérios de interpretação do coeficiente de correlação de Spearman

Valores de r	Descrição
+1,00	Correlação positiva perfeita
+0,70 a +0,99	Correlação positiva forte
+0,30 a +0,69	Correlação positiva moderada
+0,01 a +0,29	Correlação positiva fraca
0,00	Nenhuma correlação
-0,01 a -0,29	Correlação negativa fraca
-0,30 a -0,69	Correlação negativa moderada
-0,70 a -0,99	Correlação negativa forte
-1,00	Correlação negativa perfeita

5 RESULTADOS

5.1 Determinação da infectividade viral

O título infectante da estirpe variante brasileira IBVPR-05 do VBI, determinado por titulação viral em ovos embrionados SPF foi igual a $10^{6,83}$ $DIE_{50\%}$ / ml.

5.2 Preparação da vacina experimental

Foi obtida uma vacina contra variante brasileira IBVPR-05 classificada no genótipo BR-I do VBI formulada como uma emulsão estável com adjuvante a base de água em óleo (Montanide ISA 71) apresentando as seguintes características: aspecto homogêneo, coloração esbranquiçada, fácil manipulação com ausência de enrijecimento no preparo e administração e inexistência de atividade infectante residual.

5.3 Alterações macroscópicas em aves vacinadas ou não e desafiadas com a estirpe IBVPR-05

Durante a colheita das amostras e de órgãos foi realizada minuciosa necropsia das aves, em todos os intervalos pós-infecção. No tocante ao grupo não vacinado (grupo B), a ave 3 apresentou, no intervalo de 3 dpi, caquexia e diminuição de tamanho quando comparados as aves do mesmo grupo e do outro grupo experimental. Na necropsia da ave 4 foram encontrados, aos 7 dpi, ambos os rins com coloração pálida em todo o órgão, enquanto que na ave 5 foi encontrada acentuada nefromegalia, com as bordas dos rins arredondadas e presença de dilatação vascular na superfície (Figura 3). Esse último achado é sugestivo de congestão/hiperemia. As aves 7, 8, 9 e 10 desse mesmo grupo não vacinado apresentaram os mesmos achados macroscópicos no rim e, ainda, na ave 8 foi detectada a presença de discreto exsudato muco-seroso na traqueia.

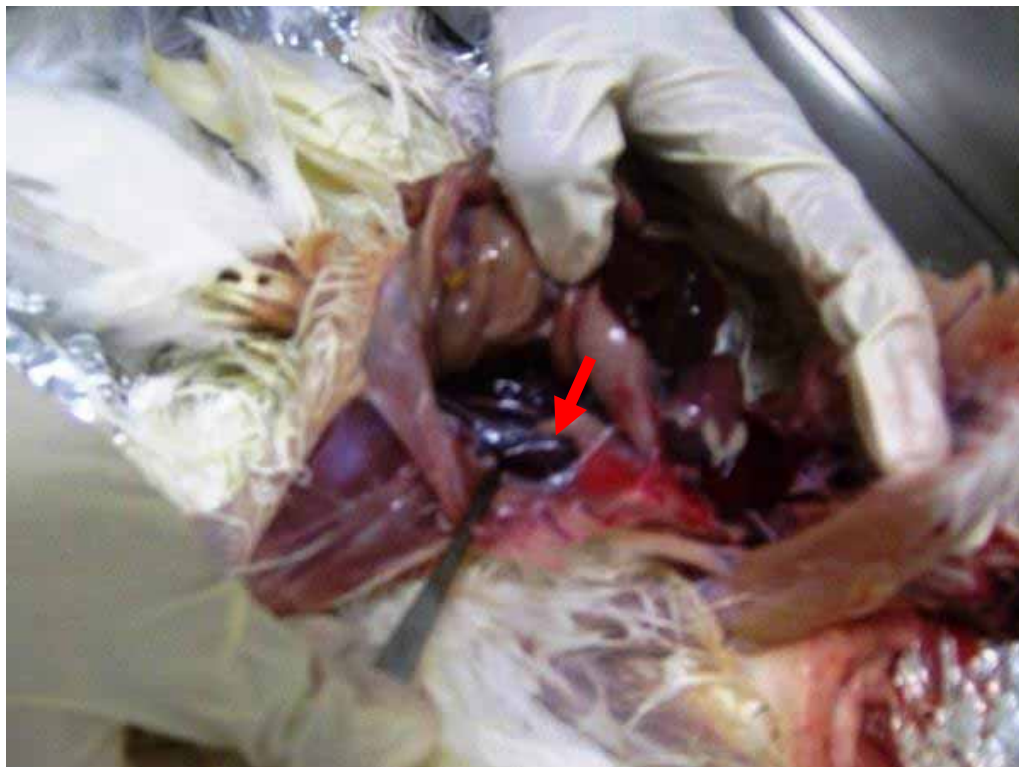


Figura 3. Imagem fotográfica das alterações macroscópicas pertencentes a ave 5 do grupo B (não vacinado e desafiado com a estirpe variante IBVPR-05). Nota-se acentuada nefromegalia e congestão dos rins (seta vermelha).

As aves pertencentes ao grupo A (aves vacinadas) e C (controle), em todos os intervalos, não apresentaram lesões e/ou alterações macroscópicas significativas.

5.4 Histopatologia

5.4.1 Traqueia

Alterações histopatológicas significativas na traqueia foram observadas a partir do terceiro dpi. Dentre os parâmetros avaliados, pode-se observar apenas hiperemia multifocal na forma discreta em uma ave do grupo B (não vacinado) e na forma moderada em uma ave do grupo A (vacinado). Também foi observado hipertrofia de células caliciformes em uma ave do grupo A (Tabela 4).

No sétimo dpi, no qual as aves se encontravam em fase aguda da doença, as lesões foram melhores evidenciadas, especificamente no grupo não vacinado (B), de forma que foram observados infiltrado inflamatório (misto) e hiperemia em todas as aves desse grupo (Figura 4). Alterações como

descamação ciliar (epitélio aciliar) e hipertrofia da mucosa, foram evidenciadas em duas aves na forma focal e acentuada e hemorragia mulfi-focal moderada foi observada apenas em uma ave. Nas aves do grupo vacinado foi observado apenas hipertrofia de células caliciformes e leve infiltrado inflamatório (misto) em uma única ave.

Aos décimo primeiro dpi, as lesões traqueais regrediram nas aves do grupo não vacinado, sugerindo que estava ocorrendo uma regeneração do epitélio ciliado. Foi observada também nesse mesmo intervalo pós-desafio, apenas hiperemia moderada variando de discreta a multi-focal em todas as aves deste grupo, e ainda discreta inflamação multi-focal em uma ave. No grupo vacinado, todas as aves apresentaram hipertrofia de células caliciformes na forma acentuada (Figura 5).

As aves do grupo C (controle) não apresentaram lesões microscópicas quer seja na traqueia, quer seja nos rins.

Tabela 4. Alterações microscópicas observadas na traqueia dos grupos A (vacinado e desafiado com variante IBVPR-05), B (não vacinado e desafiado com variante IBVPR-05) e C (controle), FCAV/UNESP – Jaboticabal – SP, (2014).

Dpi	Alterações patológicas		
	A	B	C
3	hiperemia MF I (1) hipertrofia de células caliciformes F III (1)	hiperemia MF II (1)	0
7	hipertrofia de células caliciformes F III (1) Inflamação F I (1)	inflamação MF II (2)/ MF I (1) hiperemia MF II (2)/D II (1) hipertrofia mucosa F III (2) Epitélio aciliar F III (2) hemorragia MF II (1)	0
11	hipertrofia de células caliciformes F III (3)	inflamação MF I (1) hiperemia D II (3)/MF II (1)	0

Dpi = dias pós-infecção; A: vacinado com a estirpe IBVPR-05; B: grupo de aves não vacinadas e desafiadas com a variante; C: grupo controle; F: focal; MF: multi-focal; D: difuso; 0: ausente; I: discreto; II: moderado; III: acentuado; (): número de aves afetadas.

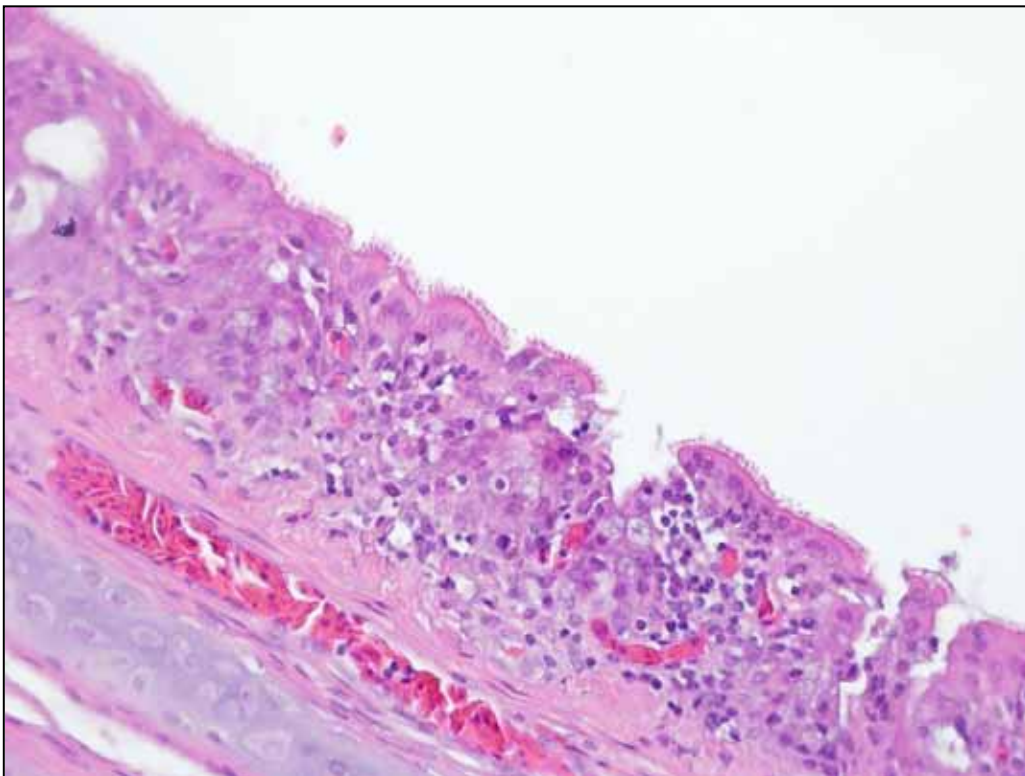


Figura 4. Fotomicrografia do tecido traqueal de ave do grupo B (não vacinado e desafiado com estirpe variante IBVPR-05) aos 7 dpi. Nota-se moderado infiltrado inflamatório por heterofilos, perda de epitélio ciliar, hiperemia discreta e pequenos focos hemorrágicos na mucosa. HE, obj. 400x.

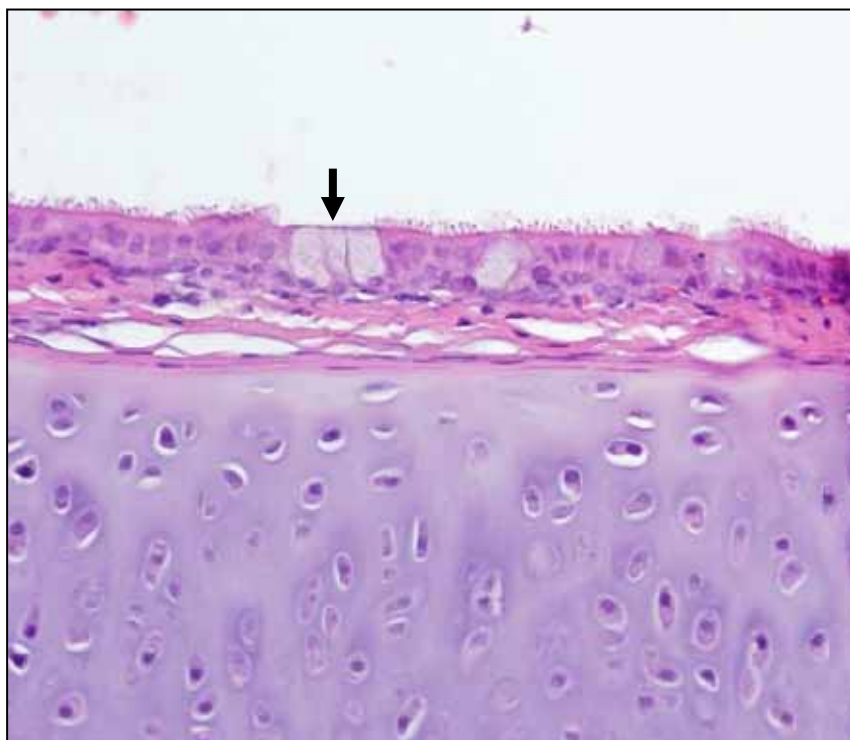


Figura 5. Fotomicrografia do tecido traqueal de ave do grupo A (vacinado e desafiado com estirpe variante IBVPR-05) aos 11 dpi. Nota-se acentuada hipertrofia das células caliciformes (seta preta). HE, obj. 400x.

5.4.2 Rim

As aves do grupo não vacinado (B) desenvolveram lesões renais já no terceiro dpi (Tabela 5). As lesões mais características foram relacionadas à hiperemia visualizada em três aves. Infiltrado inflamatório por heterófilos foi visualizado em duas das aves desse grupo, indicando quadro de nefrite aguda (Figura 6). Ademais, necrose tubular (picnose) multi-focal foi visualizada em apenas uma ave (Figura 7) e, em uma outra ave foram observadas algumas células tubulares com citoplasma edemaciado com coloração pálida indicando quadro de degeneração dos túbulos renais. No grupo vacinado (A), apenas uma ave apresentou hiperemia focal discreta no rim.

No sétimo dpi, apenas as aves pertencentes ao grupo não vacinado (B) apresentaram lesões patológicas significativas. Tais lesões foram caracterizadas por infiltrado inflamatório mulfi-focal, que foi observado em duas aves desse grupo. Foi também observada acentuada necrose tubular mulfi-focal em uma outra ave desse mesmo grupo. Alterações vasculares como hiperemia foi detectada em todas as aves não vacinadas (Figura 8). Por outro lado, não foram encontradas alterações patológicas nas aves do grupo vacinado (A).

A partir do décimo primeiro dpi, o tecido renal apresentava-se isento de necrose e com pontos de regeneração epitelial. Apenas nas aves do grupo B foram visualizadas lesões patológicas, sendo as únicas observadas hiperemia e infiltrado inflamatório. Nas aves pertencentes ao grupo A e C não foram evidenciadas alterações patológicas dignas de nota.

Tabela 5. Alterações microscópicas observadas no tecido renal pertencente aos animais dos grupos A (vacinado e desafiado com variante IBVPR-05), B (não vacinado e desafiado com variante IBVPR-05) e C (controle), FCAV/UNESP – Jaboticabal – SP, (2014).

Dpi	Alterações patológicas		
	A	B	C
3	hiperemia F I (1)	inflamação F I (1) e F II (1)	0
		necrose MF I (1)	
		hiperemia MF I (1)/D II (2)	
		degeneração MF II (1)	
7	0	inflamação MF I (1)/MF III (1)	0
		necrose MF III (1)	
		hiperemia D II (2)/ MF III (1)	
11	0	inflamação F III (1)/ MF I (1)	0
		hiperemia D II (3)/MF II (1)	

Dpi = dias pós-infecção; A: grupo desafiado e vacinado com a estirpe IBVPR-05; B: grupo de aves desafiadas com a estirpe IBVPR-05; C: grupo controle; F: focal; MF: multi-focal; D: difuso; 0: ausente; I: discreto; II: moderado; III: acentuado; (): número de aves afetadas.

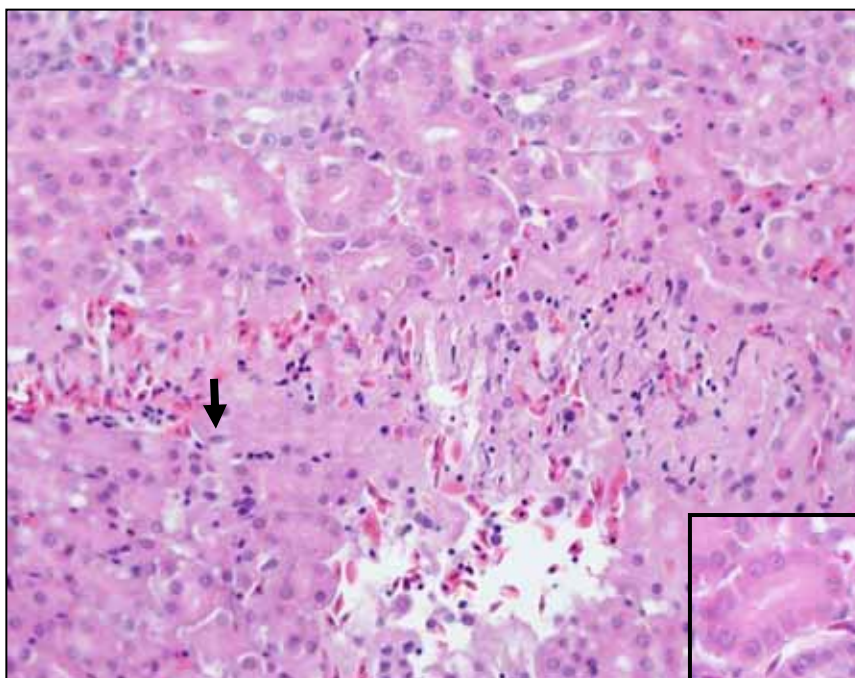


Figura 6. Fotomicrografia do tecido renal de ave pertencente ao grupo B (não vacinado e desafiado com estirpe variante IBVPR-05) aos 3 dpi. Nota-se moderado infiltrado inflamatório (heterofílico) e discreta degeneração das células tubulares (seta preta) indicando um quadro de nefrite aguda. Destaca-se no canto inferior direito tecido renal sem alteração patológica pertencente a uma ave do grupo C (controle). HE, obj. 400x.

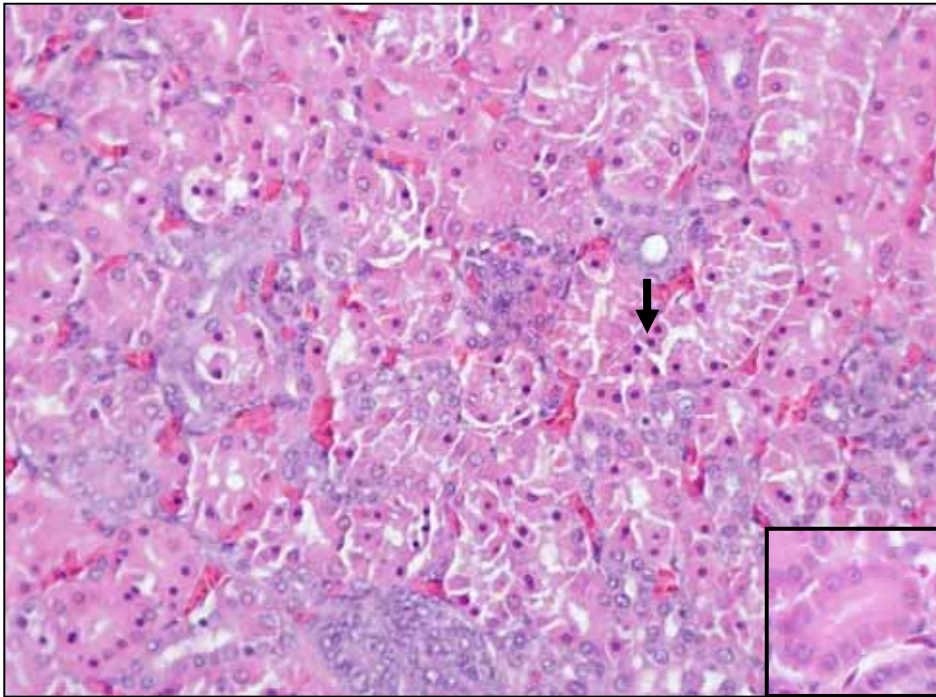


Figura 7. Fotomicrografia do tecido renal de ave pertencente ao grupo B (não vacinado e desafiado com estirpe variante IBVPR-05) aos 3 dpi. Nota-se acentuada hiperemia vascular, células tubulares com núcleo em picnose (seta preta) demonstrando um quadro típico de necrose tubular. Destaca-se no canto inferior direito tecido renal sem alteração patológica pertencente a uma ave do grupo C (controle). HE, obj. 400x.

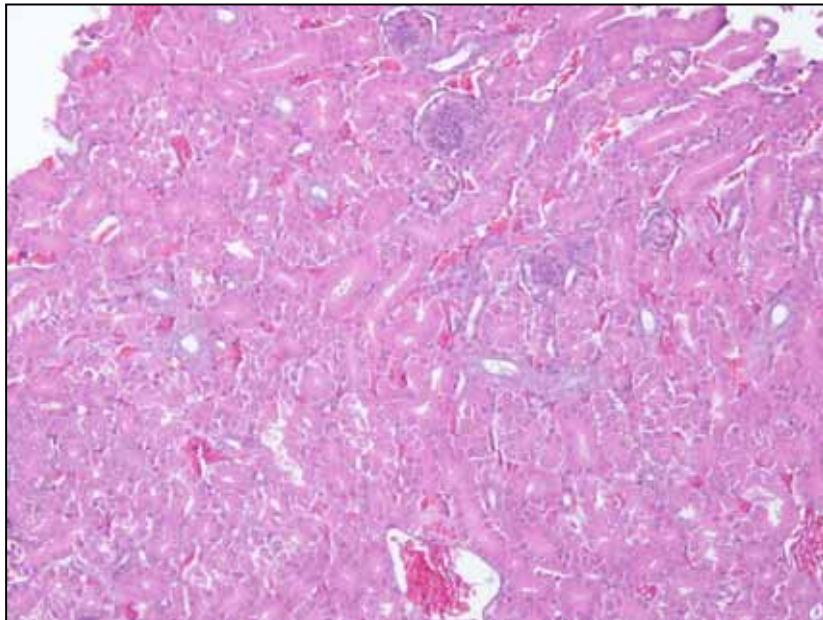


Figura 8. Fotomicrografia do tecido renal de ave pertencente ao grupo B (não vacinado e desafiado com estirpe variante IBVPR-05) aos 7 dpi. Nota-se acentuada hiperemia vascular em todo o órgão. HE, obj. 100x.

5.5 Mensuração de anticorpos locais e sistêmicos contra o VBI

As amostras pertencentes às aves do grupo C (não vacinado e não desafiado com a estirpe variante IBVPR-05), que foram colhidas em todos os intervalos do delineamento experimental, não apresentaram positividade para os anticorpos anti-VBI do isótipo IgG testados no soro sanguíneo e lágrima.

Em relação ao grupo vacinado (A), já ao terceiro dpi foram observados aumentos significativos nos níveis de anticorpos sistêmicos e locais anti-VBI do isótipo IgG, havendo diferença estatística significativa quando comparado ao grupo não vacinado (B). Esses níveis de anticorpos no soro sanguíneo (Figura 9) e na secreção lacrimal foram mantidos também ao sétimo dpi (Figura 10).

No entanto, ao décimo primeiro dpi os níveis de IgG atingiram a sua concentração máxima no soro, com valores significativamente maiores no grupo que recebeu a vacina. Na secreção lacrimal os maiores níveis de anticorpos IgG foram alcançados com 7 dpi, e com 11 dpi, com valores significativamente maiores no grupo A que recebeu a vacina atenuada (Massachussets) e a inativada (variante IBVPR-05) contra o VBI.

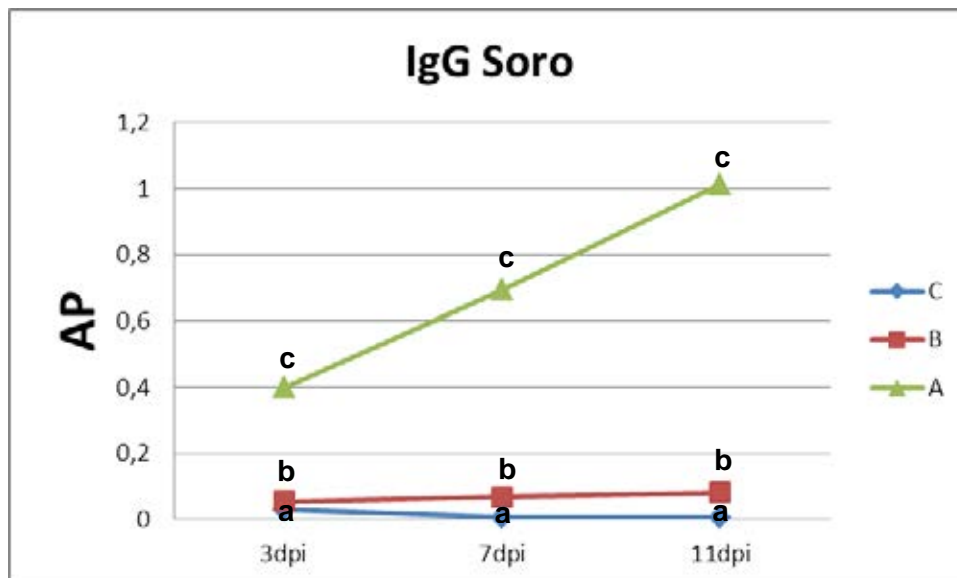


Figura 9. Perfil cinético da produção de anticorpos do isótipo IgG anti-VBI detectados pelo S-ELISAConA nas amostras de soro das aves, nos diferentes intervalos pós-infecção (pi). Legenda: dpi- dias pós infecção; A- grupo vacinado e desafiado com estirpe variante IBVPR-05; B- grupo não vacinado e desafiado com estirpe variante IBVPR-05; C- grupo controle; AP: amostras/positivas. Estão indicadas na figura as diferenças significativas (a,b,c) pelo teste de Mann-Whitney entre os grupos vacinados e não vacinados para cada intervalo avaliado; $p < 0.05$, médias seguidas de letras minúsculas diferentes diferem-se estatisticamente.

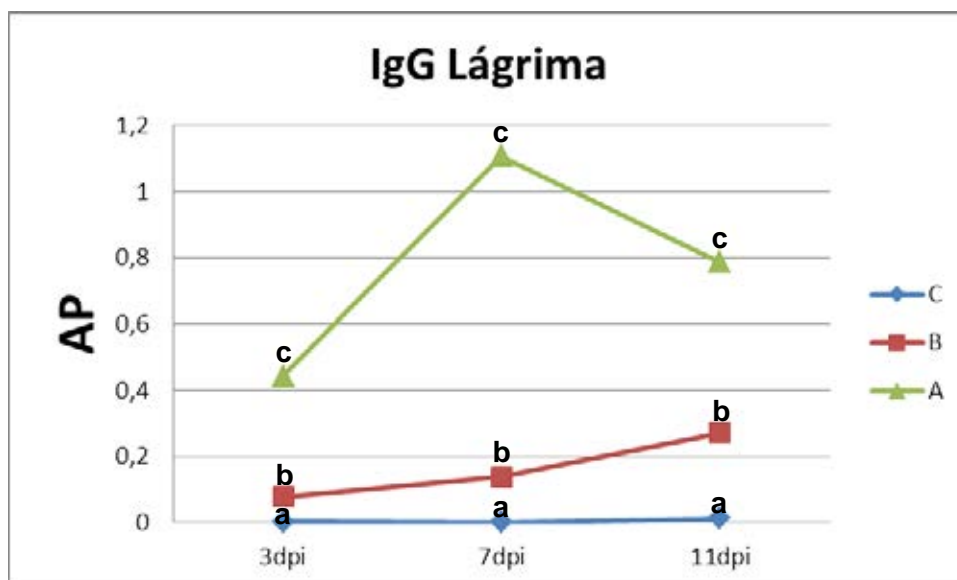


Figura 10. Perfil cinético da produção de anticorpos do isótipo IgG anti-VBI detectados pelo S-ELISAConA nas amostras de lágrimas das aves, nos diferentes intervalos pós-infecção (pi). Legenda: dpi- dias pós infecção; A- grupo vacinado e desafiado com estirpe variante IBVPR-05; B- grupo não vacinado e desafiado com estirpe variante IBVPR-05; C- grupo controle; AP: amostras/positivas. Estão indicadas na figura as diferenças significativas (a,b,c) pelo teste de Mann-Whitney entre os grupos vacinados e não vacinados para cada intervalo avaliado; $p < 0.05$, médias seguidas de letras minúsculas diferentes diferem-se estatisticamente.

5.6 Quantificação da carga viral nos órgãos colhidos de aves vacinadas ou não e desafiadas com o VBI

5.6.1 Construção da curva padrão para quantificação absoluta da replicação viral

A equação linear gerada a partir da curva padrão foi $y = -0,3239x + 12,172$ com coeficiente de determinação (r^2) = 0,992 (Figura 11). O teste manteve linearidade por, no mínimo, oito ordens de magnitude; usando-se o coeficiente angular da equação linear, a eficiência do teste foi estimada em 110,37%. O desvio padrão dos valores de C(T) obtidos para cada reação contendo de 10^1 a 10^{10} cópias de DNA, calculadas a partir de dez corridas independentes, variou de 0,06 a 0,62 ciclos.

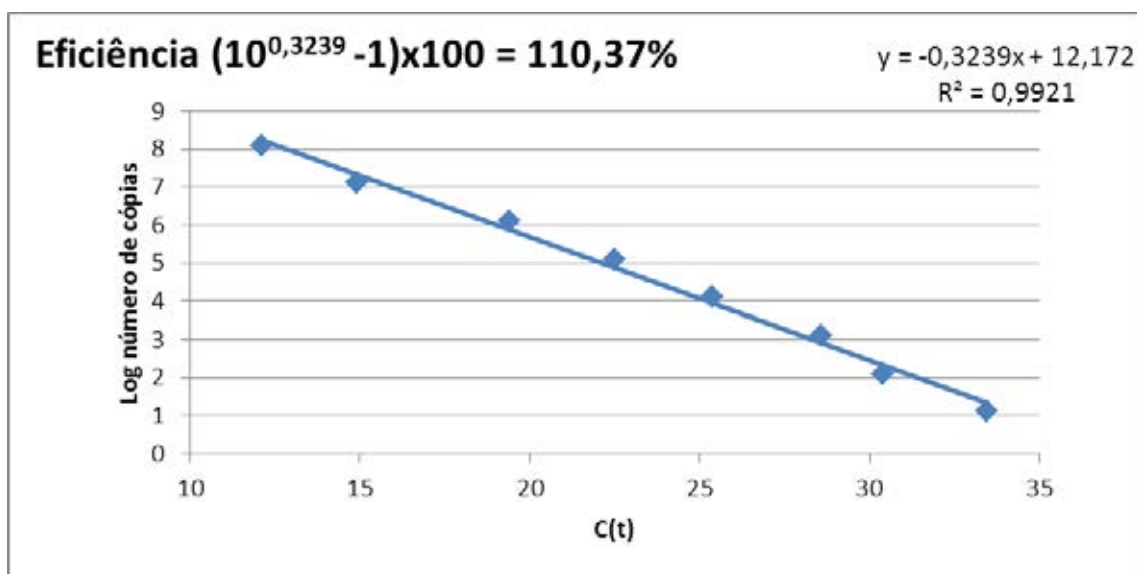


Figura 11. Curva padrão gerada com uso dos valores de C(t) vs. Log das diluições seriadas de razão 10 (10^{-3} a 10^{-10}) do DNA plasmidial correspondente ao gene S1 do VBI. A eficiência da reação foi de 110,37%, estimada com base no coeficiente angular da reta como indicado pela fórmula.

5.6.2 Quantificação absoluta da replicação viral em diferentes órgãos

Com respeito à avaliação da replicação viral em diferentes órgãos e correspondentes a cada um dos intervalos após a infecção, ou mais especificamente a carga viral contida nos órgãos analisados, constata-se que a maior carga viral apresentada foi nos rins das aves do grupo B (não vacinado) com a estirpe IBVPR-05, no terceiro dpi (Figura 12). Apenas no décimo primeiro dpi, as medianas não diferiram significativamente do grupo vacinado (A), apesar de observados maiores valores de carga viral no grupo não vacinado (B). Ainda neste contexto, pode-se observar que no terceiro dpi desse mesmo grupo (B), as amostras de traqueia dessas aves também demonstraram maior quantidade de vírus em relação às amostras obtidas de qualquer dos outros grupos analisados (Figura 13).

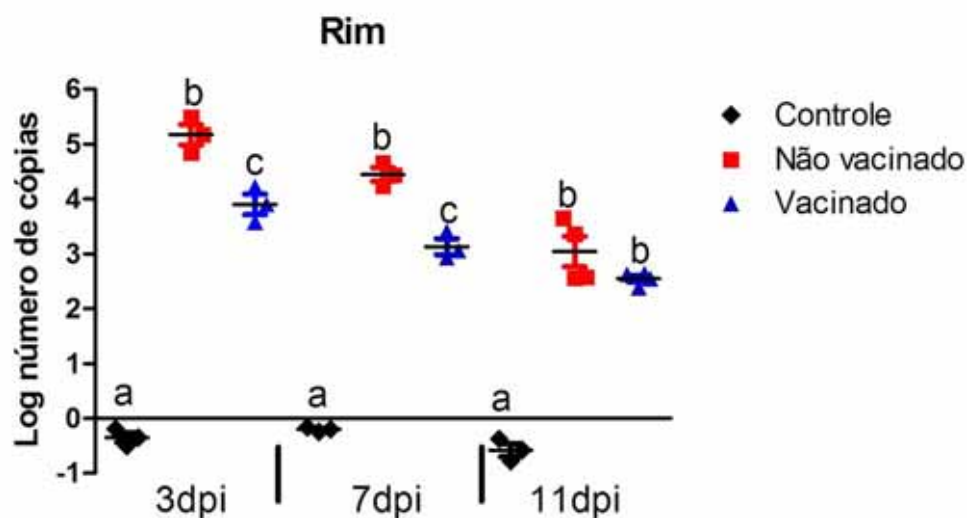


Figura 12. Número de cópias do gene S1 do VBI (Log_{10}) detectados nos rins das aves dos grupos A (vacinado e desafiado com estirpe variante IBVPR-05), B (não vacinado e desafiado com estirpe variante IBVPR-05) e no grupo C (controle). Estão indicadas na figura as diferenças significativas (a,b,c) pelo teste de Mann-Whitney entre os grupos vacinados e não vacinados para cada intervalo avaliado; $p < 0.05$, médias seguidas de letras minúsculas diferentes nas colunas diferem estatisticamente entre si.

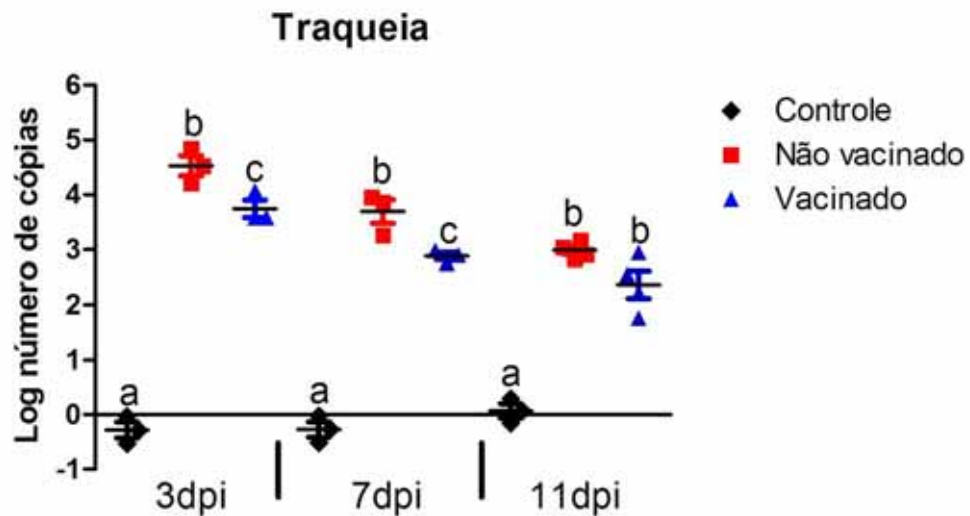


Figura 13. Número de cópias do gene S1 do VBI (Log_{10}) detectados nos rins das aves dos grupos A (vacinado e desafiado com estirpe variante IBVPR-05), B (não vacinado e desafiado com estirpe variante IBVPR-05) e C (controle). Estão indicadas na figura as diferenças significativas (a,b,c) pelo teste de Mann-Whitney entre os grupos vacinados e não vacinados para cada intervalo avaliado; $p < 0.05$, médias seguidas de letras minúsculas diferentes nas colunas diferem estatisticamente entre si.

5.6.3 Quantificação relativa da expressão de genes relacionados às respostas imunes cito-mediadas

5.6.3.1 Determinação da expressão gênica do marcador CD8+ da célula T

Os resultados do PCR em tempo real para avaliação da expressão gênica do marcador da cadeia β do CD8+ de células T citotóxicas nas amostras de rins das aves dos diferentes grupos experimentais apresentou variações em relação ao período pós-desafio que foi investigado. Houve aumento significativo da expressão gênica de CD8+, somente a partir do sétimo dpi em ambos os grupos, vacinado e não vacinado. As medianas entre os grupos vacinado e não vacinado, em todos os intervalos pós-infecção, não apresentaram diferenças significativas, embora os maiores valores de

expressão do gene da cadeia β do CD8+ tenham sido observados no grupo vacinado (Figura 14).

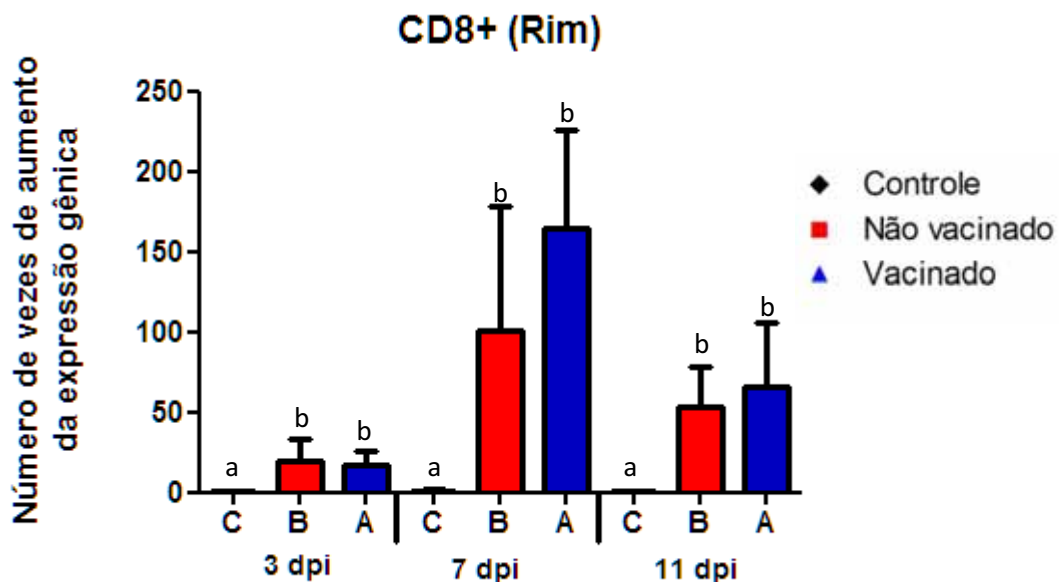


Figura 14. Comparação entre as intensidades da expressão do gene codificador do marcador de linfócito T citotóxico CD8+ no tecido renal, das aves do grupo A (vacinado e desafiado com estirpe variante IBVPR-05), grupo B (não vacinado e desafiado com estirpe variante IBVPR-05) e C (controle), nos diferentes intervalos pós-desafio. Não houve diferenças significativas pelo teste de Mann-Whitney entre os grupos vacinado e não vacinado, para cada intervalo avaliado ($p > 0,05$).

Em relação à traqueia, os valores de expressões do gene para CD8+ seguiram os mesmos parâmetros obtidos nos rins, enfatizando um aumento a partir do sétimo dpi, no entanto, não houve diferença significativa entre os grupos vacinados e não vacinados, embora ainda o grupo vacinado tenha apresentado maiores valores de expressão gênica (Figura 15).

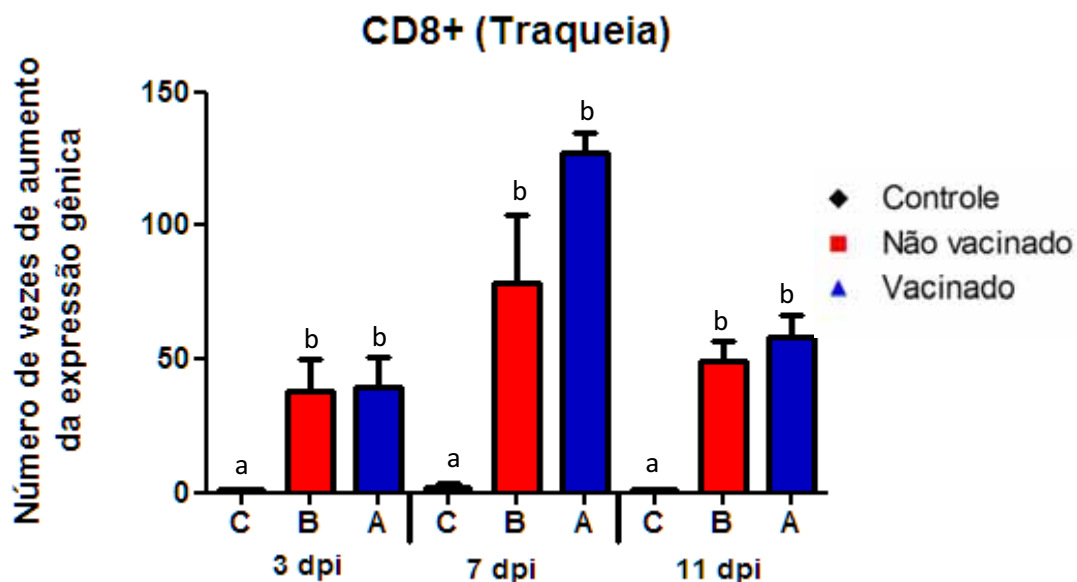


Figura 15. Comparação entre as intensidades da expressão do gene codificador do marcador de linfócito T citotóxico CD8+ na traqueia, das aves do grupo A (vacinado e desafiado com estirpe variante IBVPR-05), grupo B (não vacinado e desafiado com estirpe variante IBVPR-05) e C (controle), nos diferentes intervalos pós-desafio. Não houve diferenças significativas pelo teste de Mann-Whitney entre os grupos vacinado e não vacinado, para cada intervalo avaliado ($p > 0,05$).

5.6.3.2 Determinação da expressão gênica da Granzima A

Os resultados relativos à expressão gênica do outro marcador de linfócito T citotóxico, a Granzima A no rim, revelaram variações significativas em relação aos intervalos 3dpi e 7dpi. Comparando-se as medianas entre os grupos, o grupo vacinado apresentou valor significativamente aumentado de expressão em relação ao grupo não vacinado no terceiro e sétimo dpi; já no décimo primeiro dpi, não houve diferença significativa entre os grupos (Figura 16).

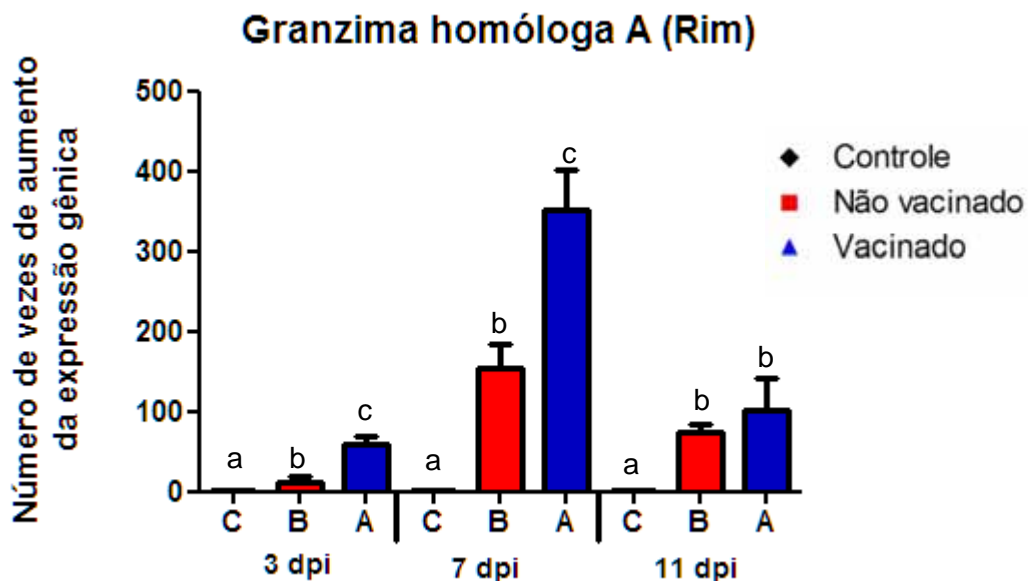


Figura 16. Comparação entre as intensidades da expressão do gene codificador da Granzima homóloga A no rim, das aves do grupo A (vacinado e desafiado com estirpe variante IBVPR-05), grupo B (não vacinado e desafiado com estirpe variante IBVPR-05) e C (controle), nos diferentes intervalos pós-desafio. Médias seguidas de letras minúsculas diferentes nas colunas diferem estatisticamente entre si ($p > 0,05$).

Em relação à quantificação do RNAm da Granzima homóloga A na traqueia, aumento significativo foi observado a partir do terceiro dpi, atingindo pico ao sétimo dpi para ambos os grupos, demonstrando diferença estatística nestes intervalos entre o grupo vacinado e não vacinado. Já no décimo primeiro dpi, apesar dos maiores valores serem observados no grupo vacinado em relação ao não vacinado, a diferença não foi significativa (Figura 17).

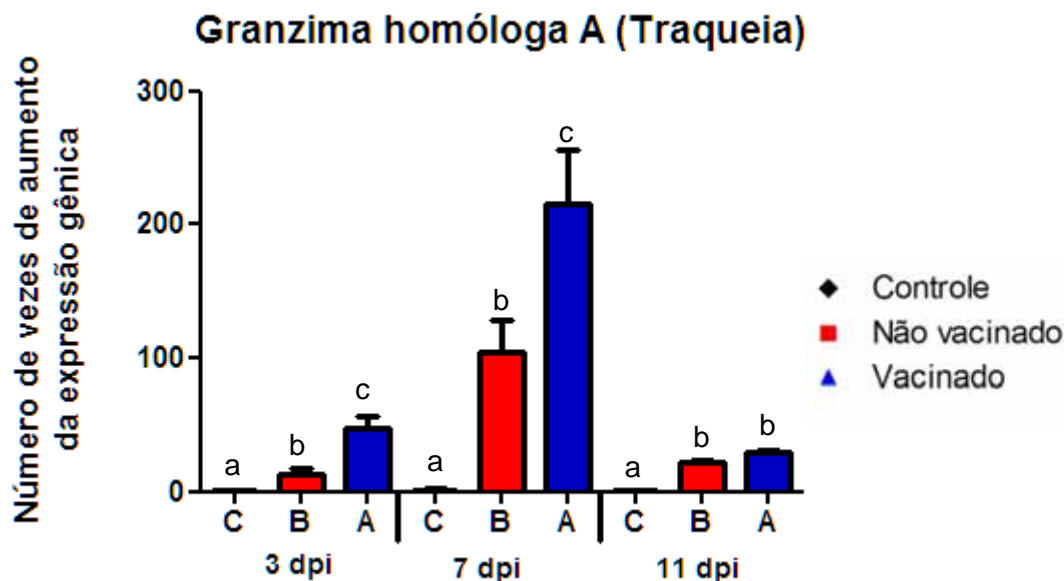


Figura 17. Comparação entre as intensidades da expressão do gene codificador da Granzima homóloga A na traqueia, das aves do grupo A (vacinado e desafiado com estirpe variante IBVPR-05), grupo B (não vacinado e desafiado com estirpe variante IBVPR-05) e C (controle), nos diferentes intervalos pós-desafio. Médias seguidas de letras minúsculas diferentes nas colunas diferem-se estatisticamente ($p < 0,05$).

5.7 Correlações

Em relação ao coeficiente de correlação (r) entre os resultados de carga viral presente na traqueia e nos rins e da mensuração de anticorpos anti-VBI na lágrima e no soro, foram observadas correlações positivas fortes entre a replicação do VBI e a mensuração de IgG na lágrima (traqueia r : 0,71; rins r : 0,87) e no soro (traqueia r : 0,78; rins r : 0,86).

Na comparação entre os resultados de replicação viral e da expressão dos genes imunorelacionados, foi verificada correlação positiva moderada com os achados de expressão de Granzima homóloga A (traqueia r : 0,40; rins r : 0,38) e CD8+ (traqueia r : 0,46; rins r : 0,36), em ambos os órgãos.

6 DISCUSSÃO

No presente estudo, todas as aves vacinadas por via intramuscular com a vacina inativada com adjuvante oleoso contendo a estirpe IBVPR-05 foram resistentes ao desafio homólogo com a mesma estirpe virulenta, com base na ausência de lesões microscópicas na traqueia e rins, e menor carga viral, bem como no aumento de níveis anticorpos lacrimais e séricos anti-IBV do isótipo IgG e na maior expressão dos genes de respostas imunes cito-mediadas, tais como o gene CD8 e a granzima A, tanto nos rins, como na traquéia.

As lesões microscópicas observadas nos rins provocadas pela estirpe IBVPR-05 foram semelhantes aos descritos em estudos anteriores para esta e outras estirpes nefropatogênicas do VBI (ALBASSAM et al, 1986; FERNANDO et al, 2013). No grupo apenas desafiado com a estirpe IBVPR05, as aves apresentaram, aos 3 dpi, lesões renais abundantes com difusa a moderada infiltração linfo-histiocítica entre os túbulos, e ao lado dos túbulos distais e ductos coletores. Tais alterações histopatológicas renais foram encontradas por Ladman et al. (2002) ao investigarem a patogenia produzida por estirpe nefropatogênica do VBI.

Ademais, deve-se ressaltar que a imunidade homóloga induzida pela estirpe IBVPR05 inativada foi eficiente em conferir proteção às aves desafiadas com essa mesma estirpe virulenta, enquanto que estudos anteriores demonstraram que aves vacinadas apenas com vacina atenuada comercial (estirpe H120) e desafiadas com a estirpe heteróloga IBVPR-05 (nefropatogênica) não revelaram proteção, especialmente nos tecidos renais. O fato é que essas aves previamente imunizadas com a estirpe H120 e depois desafiadas apresentaram alterações histopatológicas significativas nos rins (Fernando et al., 2013).

Isso demonstra que a imunização com vacina comercial formulada com a estirpe atenuada H120 não é capaz de induzir proteção cruzada contra a estirpe variante brasileira IBVPR-05 e possivelmente contra outras variantes pertencentes a esse mesmo genótipo / sorotipo. Na verdade a estirpe IBVPR-05 previamente classificada em um outro genótipo do VBI isto é, o genótipo

BR-I (Montassier et al., 2006, 2012) deve pertencer a um um sorotipo diferente, tal como foi demonstrada em análises de atividade vírus-neutralizante de outras estirpes classificadas como genótipo BR-I (CHACÓN et al., 2011). Assim, e como acontece com muitos outros diferentes sorotipos do VBI, pouca ou nenhuma proteção cruzada é induzida após a vacinação com determinadas estirpes de referência que são heterólogas a novos sorotipos variantes existentes circulando no campo.

Ao comparar as alterações histopatológicas na traqueia dos grupos vacinado e não vacinado foi observada diferença no status da proteção. Assim, os danos causados pela estirpe variante brasileira IBVPR-05 foram maiores para as aves do grupo não vacinado, que mostraram infiltração moderada de células inflamatórias e degeneração/necrose epitelial. Alterações semelhantes foram encontradas por Okino et al. (2013) em aves não vacinadas e desafiadas com estirpe M41, embora a presença de lesões significativas na traqueia tenha sido maior nos resultados discutidos nesse último estudo, quando comparados com nossa pesquisa. Em contrapartida, Fernando et al (2013) observaram menores escores de lesões histopatológicas na traqueia, tanto em aves vacinadas com estirpe comercial (M41) quanto em aves não vacinadas frente ao desafio com estirpe variante brasileira IBVPR-05. Isto provavelmente se deve ao fato de a estirpe IBVPR-05 ter maior tropismo pelo tecido renal do que pelas células do trato respiratório.

Os resultados de RT-qPCR mostraram que as cargas virais foram mais elevadas no rim do que na traqueia, para ambos os grupos experimentais de aves; vacinadas e não vacinadas. Tal achado reforça o caráter nefropatogênico desse isolado. Os resultados de RT-qPCR também mostraram que houve diferença significativa no número médio de cópias do gene S1 que foi detectado nas amostras traqueais do grupo não vacinado nas quais foram detectados valores superiores àqueles encontrados nas amostras traqueais das aves do grupo vacinado ($P < 0,05$). Da mesma forma, a carga viral média detectada nos rins a partir de aves do grupo não vacinado foi superior, e mostrou uma diferença significativa em comparação com a observada no grupo vacinado ($P < 0,05$). Estes resultados foram semelhantes aos encontrados por Fernando et al. (2013) tanto em aves apenas vacinadas com estirpe comercial

heteróloga H120, quando em aves não vacinadas após desafio com a estirpe IBVPR-05.

Ladman et al. (2002) demonstrou que aves vacinadas com vacina atenuada heteróloga, mesmo quando após terem recebido doses vacinais de reforço, apresentaram maiores índices de re-isolamento viral presente no tecido renal, ao serem comparadas com aves vacinadas com vacina viva heteróloga mais vacina inativada homóloga frente ao desafio por uma estirpe nefropatogênica.

A maior carga viral presente nos rins pode estar relacionada com o desenvolvimento de lesões renais. Nesse contexto, sabe-se que a glicoproteína S1 do VBI é em grande parte responsável pelo tropismo de tecidos de uma estirpe do VBI (KUO et al., 2000).

Esta glicoproteína desempenha um papel crítico na infectividade viral e contém os determinantes antigênicos que induzem a formação de anticorpos neutralizantes. Assim, a variação na composição de aminoácidos localizados em algumas regiões da glicoproteína S1, isto é, os epítomos indutores de anticorpos neutralizantes, poderia resultar na alteração do tropismo de tecidos, virulência e antigenicidade de uma dada estirpe de VBI. Isso se constitui na principal estratégia do VBI para escapar dos mecanismos de defesa do hospedeiro (CAVANAGH et al, 1997; KEELER et al, 1998; COOK et al, 1999).

Dessa forma, as alterações nos genes da glicoproteína S1 da estirpe IBVPR-05, resultam em alterações significativas dessa mesma proteína e proporcionou uma acentuada predileção para a infecção de células epiteliais que não pertencem ao trato respiratório, possivelmente através de um mecanismo de fuga no hospedeiro, o que, no caso desta variante, aumentou o tropismo para as células epiteliais do rim, e isto levou ao desenvolvimento de nefrite nos animais não vacinados.

Os resultados do PCR em tempo real para avaliação da expressão gênica do marcador CD8+ de células T citotóxicas nas amostras de traquéia e de rins das aves pertencentes aos grupos vacinado e não vacinado apresentou variações na cinética do período pós-desafio que foi investigado. No sétimo dia pós-desafio foi verificado que os valores da expressão desses dois genes de resposta imune cito-mediada se elevaram mais acentuadamente nos dois

grupos experimentais de aves e declinaram depois deste período. Estudos prévios revelaram que as células efectoras T colhidas com 10 dias pós-infecção de aves com o VBI garantem a proteção das aves durante a fase aguda da infecção por este vírus e que a ativação dessas células T declina após 10 dias de infecção (COLLISSON et. al, 2003). Além disso, a ativação de células T por antígenos específicos se desenvolve até 10 dias pós-infecção, período no qual são encontrados os maiores números destas células. Durante este período, a infecção aguda é resolvida e as partículas infecciosas do VBI são reconhecidas e eliminadas do meio interno do hospedeiro e, após o “clearance” do patógeno, a maioria das células T específicas sofrem morte por apoptose (SEO e COLLISSON, 1997).

Embora não houvesse diferença estatística na expressão do gene de cadeia β do CD8 pelas aves do grupo vacinado em relação às aves do grupo não vacinado, maiores expressões deste gene foram observadas nas aves imunizadas. Ao contrário disso, Okino et al. (2013) observaram maiores valores significativos da expressão do gene de cadeia α do CD8 em aves vacinadas quando comparadas a não vacinadas. Isso se deve provavelmente ao fato de que o gene de cadeia α é também expresso em células NK, além das células T CD8+.

Diversamente do que ocorreu com a expressão do gene da cadeia β do CD8, os níveis de expressão do gene da granzima A revelaram-se, no 3º e 7º dpi, significativamente mais aumentados na mucosa traqueal e nos rins das aves vacinadas do que nas aves não vacinadas. Aumentos similares, embora mais precoces, da expressão do gene da Granzima A foram encontrados em aves previamente imunizadas, na idade de 1 dia, com vacina atenuada da estirpe Massachusetts (H120) e desafiadas 3 semanas depois com estirpe homóloga (M41) (Okino et al., 2013). Ainda, achados semelhantes do perfil da expressão gênica do marcador gênico Granzima A foram também descritos em estudos sobre infecção experimental de aves com o Vírus da Doença de Marek no tocante ao tempo pós infecção, tendo sido relatado um aumento gradativo na expressão deste gene nos períodos de 4 e 7 dpi, declinando em seguida (SARSON et. al, 2006).

Deve-se ressaltar nesse ponto que a resposta dos linfócitos T citotóxicos em galinhas contra a infecção pelo VBI parece exercer um papel preponderante na eliminação desse vírus do meio interno do hospedeiro durante a fase aguda da infecção. Na verdade, foi observado que a cinética da replicação viral após a infecção de aves não vacinadas previamente se correlaciona diretamente por um ou dois dias com a cinética da resposta de células T citotóxicas acompanhando, dessa forma, o aumento e depois o declínio do processo infeccioso causado pelo VBI (MONTASSIER, 2010, OKINO et al., 2013).

Um aspecto interessante na avaliação da expressão desses genes de imune-resposta foi a coincidência das elevações para a expressão dos genes CD8 das células T citotóxicas e da Granzima A, reforçando a participação das células T citotóxicas de memória nesse fenômeno de proteção induzida pela vacinação prévia com a vacina inativada oleosa contendo a estirpe IBVPR-05 para as aves desafiadas com a estirpe homóloga.

Há, portanto, uma forte evidência da importância da presença de linfócitos T de memória, a qual pode ser avaliada por meio da expressão gênica de alguns de seus marcadores como o Granzima A, que são ativados precocemente no grupo vacinado que assegura um combate mais rápido ao VBI em relação ao grupo não imunizado.

Ao se analisar o perfil cinético na resposta imune humoral sistêmica obtido neste estudo para os anticorpos anti-VBI do isótipo IgG, nota-se que houve aumento significativo dos níveis desses anticorpos, em todos os intervalos de tempos; os níveis de anticorpos elevaram-se significativamente no grupo vacinado, enquanto que no grupo B (não vacinado) tal aumento começou a ocorrer discretamente somente no 11^o dia pós infecção, ou seja a soroconversão foi mais tardia, provavelmente devido à falta de linfócitos B de memória conferidos aos grupos vacinados no primeiro dia de vida com vacina e reforço com vacina inativada homóloga.

No entanto, a maior parte dos artigos da literatura destaca que os títulos de anticorpos anti-VBI do soro sanguíneo não apresentam boa correlação com o estado de proteção ao desafio com estirpe virulenta do VBI, especialmente quando o estado de proteção é avaliado através da mensuração do grau de

lesões histológicas e do re-isolamento viral na traqueia e rins. Por outro lado, considera-se que os níveis de anticorpos presentes nas secreções mucosas estão mais envolvidos na proteção do trato respiratório e, especialmente, da porta de entrada desse vírus constituída pelas células epiteliais da mucosa nasal e traqueal (CAVANAGH, 2007; LANCELLOTTI et al., 2014; MONTASSIER, 2010).

Embora os anticorpos do isótipo IgG no soro sanguíneo revelaram uma associação com a proteção ao desafio com o VBI, os níveis destes anticorpos presentes na secreção lacrimal foram de maior magnitude principalmente no 7º dpi. Nesse sentido, os resultados obtidos corroboraram os dados observados em investigações anteriores que também encontraram importantes marcadores de imunidade humoral na secreção lacrimal (LANCELLOTTI et al., 2014; PEREIRA, 2006, OKINO et al., 2013).

Nossos resultados demonstraram a associação entre os anticorpos IgG anti-VBI lacrimais e proteção contra a infecção, esta descoberta não concordou com os dados registrados por Gelb et al. (1998). Esta discordância pode estar associada com o fato de que esses autores não determinaram títulos de anticorpos, como realizado neste estudo, e um método diferente de ELISA fora utilizado, o qual não foi capaz de discriminar isótipos de anticorpos, analisados aqui. Além disso, a proteção avaliada por Gelb et al. (1998) foi apenas com base na ausência de isolamento do vírus, enquanto que em nosso estudo, além de quantificação da carga viral presentes em rins e traqueia, foram avaliadas histopatologia e imunidade celular com base nos níveis expressos dos genes CD8 e *grazima A*.

Contrariamente a esta divergência, os resultados do presente inquérito concordou com os achados de Toro e Fernandez (1994) e Mondal e Naqi (2001), confirmando o envolvimento de anticorpos específicos locais no controle da infecção por VBI, especialmente aqueles que apresentam vírus-neutralização atividade e pertencentes a isótopos IgG. Além disso, nossos resultados confirmaram os achados de Okino et al. (2013), que caracterizam o papel da memória das respostas imunes humorais no compartimento das mucosas do trato respiratório e anexos; isto é, na secreção lacrimal. Okino et al. (2013) relataram que a resposta de memória que está relacionada à

produção de anticorpos anti-VBI do isótipo IgG lacrimal, nos intervalos de um e cinco dias após a infecção, está correlacionada ao estado de proteção da mucosa da traquéia contra a infecção pela estirpe M41 do VBI.

Assim, os nossos resultados indicaram que os anticorpos locais são efetivamente induzidos pela vacina inativada formulada com a estirpe variante brasileira do VBI em galinhas SPF e estes anticorpos forneceram uma parte significativa da proteção para as vias respiratórias superiores destas aves. Essa superfície da mucosa, especialmente a da traqueia se constitui na porta de entrada e no sítio primário de replicação do VBI. Além disso, as respostas imunes cito-mediadas, que foram avaliadas neste estudo através da expressão dos genes CD8 e da granzima A, não podem ser excluídas como um mecanismo de proteção adicional de resistência contra a infecção pelo VBI, dado que os linfócitos citotóxicos específicos T CD8 têm sido demonstrados como importantes fatores na imuno-proteção contra este vírus (COLLISSON et al., 2000; OKINO et al., 2013). Assim, o conceito correto aplicável para a definição de mecanismos mais eficazes de proteção imunológica contra a infecção por VBI é assumir que os anticorpos locais e mecanismos imunes celulares poderiam estar atuando em um aditivo ou de forma sinérgica, a fim de conferir um estado de proteção mais completa contra a infecção, como relatado também por Okino et al. (2013).

Como é geralmente o que ocorre na proteção induzida por vacinas contra estirpes respiratórias do VBI, a melhor proteção contra o desafio virulento por estirpes nefropatogênicas desse mesmo vírus é obtida também com estirpe homóloga pertencente ao mesmo genótipo / sorotipo, ou com estirpe que seja o mais semelhante possível a estirpe de desafio e principalmente que esteja circulando na criação de aves (LADMAN et al., 2002). No entanto, a possibilidade de utilizar uma vacina viva formulada com estirpe homóloga a uma das variantes do genótipo / sorotipo BR-I, tal como a estirpe IBVPR-05, para controlar a doença em planteis comerciais de aves não é possível atualmente, pois um vírus atenuado e estavelmente seguro não está disponível.

Em estudos anteriores (FERNANDO et al., 2013) já havia sido constatado que a vacinação com vacina atenuada comercial heteróloga (H120)

não reduziu o isolamento da estirpe variante brasileira IBVPR-05 no rim ou a incidência de lesões renais microscópicas. No tocante a isso, Ladman et al. (2002) demonstraram que vacinas atenuadas contendo estirpes heterólogas do VBI ainda podem oferecer proteção cruzada parcial. Observou-se em um estudo anterior que a imunização com estirpes vacinais heterólogas H120, H52, e D274, administradas individualmente, reduzem o tempo de re-isolamento de uma estirpe nefropatogênica, a estirpe PAIWolgemuth/98, bem como sua replicação na traqueia, o que resulta na diminuição da mortalidade após o desafio. Estes resultados sugerem que a imunização das aves com vacina atenuada contendo estirpe heteróloga do VBI pode oferecer proteção parcial, mesmo contra estirpes pertencentes a sorotipos virulentos heterólogos. Ademais foi verificado que em frangos jovens, a imunização das aves com vacina atenuada contendo estirpe heteróloga do VBI se constitui na principal abordagem prática para o controle imunoprolático da bronquite infecciosa no campo.

O uso de vacinas inativadas contra o VBI em galinhas é uma opção para controlar estirpes nefropatogênicas (IBVPR-05) em poedeiras e reprodutoras, oferecendo imunidade sistêmica para prevenir ou reduzir a doença renal. A propósito, outros estudos também demonstraram proteção renal conferida pela imunização com vacina inativada homóloga contra o VBI, bem como a melhoria da produção de ovos com casca de maior qualidade. Além disso, com base em resultados de re-isolamento do vírus após o desafio, as galinhas que receberam vacina inativada com estirpe homóloga revelaram uma maior proteção ao desafio com a mesma estirpe do VBI do que aves que receberam a vacina inativada contendo estirpes heterólogas. Neste contexto, exalta-se a importância de selecionar uma estirpe com um elevado grau de semelhança com o antígeno do vírus desafio para inclusão na vacina inativada, aumentando assim, o potencial de proteção imune da vacina (LADMAN et al., 2002).

Outro fato importante no que diz respeito à produção de vacinas inativadas é a escolha do adjuvante, considerado “potencializador imunogênico”, uma vez que estes adjuvantes possuem a função de estimular uma resposta imune mais acentuada e duradora no animal.

Para produção de vacinas inativadas para VBI no geral, utilizam-se adjuvantes oleosos, sendo o mais comum o incompleto de Freund (AIF) (CAVANAGH; NAQI, 1997). Já, neste estudo foi utilizado um adjuvante oleoso mais recentemente produzido, o Montanide ISA 71[®], que em conjunto com a vacina inativada produziu uma imunidade celular e humoral adequada induzindo uma proteção frente ao desafio com a estirpe variante do VBI. Embora ainda não haja relatos na literatura de seu uso para VBI, a série Montanide ISA W/O tem demonstrado eficácia superior em comparação com formulações de adjuvantes tradicionais (hidróxido de alumínio e emulsões à base de óleo), com uma variedade de vacinas para seres humanos e animais (BOWERSOCK; MARTIN, 1999; JANG, et al., 2011).

Nesse contexto, Jang et al. (2011) demonstrou que a utilização do adjuvante ISA 71 em conjunto com vacina composta de um antígeno recombinante de *Eimeria* foi mais eficaz em comparação com apenas a utilização do imunógeno profilina em aves desafiadas por *E. acervulina* e *E. tenella*. Os resultados sugeriram que o ISA 71 VG não só estimulou uma proteção mais completa contra coccidiose aviária experimental em comparação com outros adjuvantes, mas também o fez em doses vacinais mais baixas.

Adjuvantes de água-em-óleo, como a ISA 720, foram testados em ensaios clínicos humanos, e outros estudos têm demonstrado a sua capacidade de estimular a imunidade protetora contra o HIV e vacinas contra a malária (AUCOUTURIER et al., 2006; TOLEDO et al., 2001).

East et al. (1992) mostrou que Montanide ISA[™] 50 foi superior ao hidróxido de alumínio para a vacinação de ovelhas com um extrato parcialmente purificado de larvas de *Lucilia cuprina* (mosca varejeira). Iyer et al. (2001) demonstraram que Montanide[™] ISA 57 provoca rápidos e duradouros títulos de anticorpos em cobaias vacinadas contra febre aftosa. Em frangos, a vacinação contra o vírus da doença de Newcastle em combinação com uma emulsão de adjuvante óleo mineral produziu maior imunidade protetora contra a infecção por desafio subsequente (AUCOUTURIER; GANNE, 2000; AUCOUTURIER et al., 2001).

Apesar dos bons resultados observados neste trabalho, o adjuvante Montanide ISA 71[®] não foi previamente testado quanto à sua capacidade para

aumentar a imunidade contra o vírus da bronquite infecciosa aviária, necessitando de mais estudos para sua compreensão como adjuvante na vacina contra o VBI.

7 CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos com esta pesquisa, e em consonância com os objetivos propostos, pode-se concluir que:

- Foi obtida uma vacina contra variante brasileira classificada no genótipo BR-I do VBI, formulada sob a forma de uma emulsão estável com adjuvante a base de água em óleo, a partir da suspensão do líquido córion-alantoide obtido de ovos embrionados de galinhas SPF inoculados com essa estirpe (IBVPR05), que antes de ser emulsionada, foi inativada apropriadamente e não revelou, posteriormente, atividade infectante residual.

- A combinação da vacina atenuada comercial contendo a estirpe Massachusetts (H120) com a vacina inativada contendo a variante brasileira do VBI (IBVPR-05) revelou imunogenicidade suficiente para a indução de respostas de memória tanto da imunidade humoral (anticorpos locais e sistêmicos do isótipo IgG) como celular (expressão dos genes da cadeia β do CD8 e da Granzima A na traqueia e nos rins) nas aves submetidas a esse esquema vacinal.

- As respostas imunes humoral e celular induzidas pelo uso combinado da vacina atenuada comercial, contendo a estirpe Massachusetts, com a vacina inativada contendo a variante brasileira do VBI apresentaram uma associação relevante com o estado de proteção de aves vacinadas e desafiadas com essa estirpe variante do VBI, ficando caracterizada assim, a importância desse tipo de repostas imunes na proteção contra o VBI e a eficácia do esquema vacinal aqui adotado.

- São necessários estudos adicionais, com o objetivo de proporcionar mais informações para a produção de uma futura formulação vacinal inativada contra variantes brasileiras do VBI e de um esquema imunoprolático mais eficiente para se alcançar um controle mais efetivo da infecção por esse tipo de estirpes variantes do VBI nos plantéis avícolas do Brasil.

8 REFERÊNCIAS

ABREU, J. T., RESENDE, J. S., FLATSCHART, R. B., FOLGUERAS-FLATSCHART, A. V., MENDES, A. C., MARTINS, N.R., DILVA, C. B.; FERREIRA, B. M.; RESENDE, M. Molecular analysis of Brazilian infectious bronchitis field isolates by reverse transcription- polymerase chain reaction, restriction fragment length polymorphism, and partial sequencing of the N gene. **Avian Dis.**, v. 50, p. 494-501, 2006.

ALBASSAM, M. A., WINTERFIELD R. W.; THACKER H. L. Comparison of the nephropathogenicity of four strains of infectious bronchitis vims. **Avian Dis.**, v. 30, p. 468-476, 1986.

ANDRE, F.E. Vaccinology: past achievements, present roadblocks and future promises. **Vaccine**, v.21, p.593-595, 2003.

AUCOUTURIER, J.; GANNE, V. Assessment of oil adjuvants in Newcastle disease vaccine. In: **Proceedings of the 20th World Poultry Congress** (Montreal, Canada).August, 20–25. 2000.

AUCOUTURIER, J.; DUPUIS, L.; GANNE, V. Adjuvants designed for veterinary and human vaccines. **Vaccine** 19, 2666–2672. 2001.

AUCOUTURIER, J.; ASCARATEIL, S.; DUPUIS, L. The use of oil adjuvants in therapeutic vaccine. **Vaccine** 24, 44–45. 2006.

BENNEJEAN, G. et al. Vaccination of one-day-old chicks against Newcastle disease using inactivated oil adjuvant and/or live vaccine. **Avian Path**, 7: 15-27. 1978.

BIJLENGA, G.; COOK, J. K.; GELB, J. JR.; DE WIT, J. J. Development and use of the H strain of avian infectious bronchitis virus from the Netherlands as a vaccine: a review. **Avian Pathology**, v.33, n.6, p. 550-557, 2004.

BORNE, P. Vacinação. In: BORNE, P.; COMTE, S. **Vacinas e Vacinação na Produção Avícola**. Sao Paulo: Gessulli, Cap. 2. p. 26-45, 2003.

BOWERSOCK, T.L., MARTIN, S. Vaccine delivery to animals. **Advanced Drug Delivery Reviews** 38, 167–194. Lillehoj. 1999.

BOX, P. G.; BERESFORD, A. V.; ROBERTS, B. Protection of laying hens against infectious bronchitis with inactivated emulsion vaccines. **Vet. Rec.** 106: 264-268. 1980.

BRANDEN, R. C.; DA SILVA, E. N. Ocorrência de “nuevos” serotipos de bronquitis infecciosa en Brasil. In: **Proceedings of VI Seminario Internacional de Patologia aviar**, 6., Athens, GA, USA, 1986.

BREWER, J.M. (How) do aluminium adjuvants works? **Immunology Letters**, v.102, p.10-15, 2006.

BRONZONI, R. V. M. et al. Detection of Infectious Bronchitis Virus and Specific Anti- Viral Antibodies Using a Concanavalin A–Sandwich–ELISA. **Viral Imm.**, v. 18, p. 569-78, 2005.

CANAL, C. W.; VAZ, C. S. L. Vacinas víricas. In: FLORES, E. F. **Virologia Veterinária**. Santa Maria: Santa Maria, Cap. 12. p. 329-353, 2007.

CARDOSO, T. C.; MONTASSIER, H. J.; GALLETTI, M. C. M.; PINTO, A. A. Development and application of a sandwich ELISA to measure chicken antibodies of infectious bronchitis virus. **Virus Rev. Res.**, v.1, N. 1-2, p. 75-80, 1999.

CAVANAGH, D. Coronavirus avian infectious bronchitis virus. **Vet. Res.**, v.38, p.281-297, 2007.

CAVANAGH, D. Coronavirus IBV: structural characterization of the spike protein. **Journal of General Virology**; 64: 2577-2583, 1983.

CAVANAGH, D. Severe acute respiratory syndrome vaccine development: experiences of vaccination against avian infectious bronchitis coronavirus, **Avian Pathol**, 32:567–582, 2003.

CAVANAGH, D.; DAVIS, P. J.; COOK, J. K. A.; LI, D.; KANT, A; KOCH, G. Location of the amino-acid differences in the S1 spike glycoprotein subunit of closely related serotypes of infectious-bronchitis virus. **Avian Pathology**; 21:33-43, 1992.

CAVANAGH, D.; ELLIS, M. M.; COOK, J. K. A. Relationship between sequence variation in the S1 spike protein of infectious bronchitis virus and the extent of crossprotection in vivo. **Avian Pathol.**, v. 26, n. 1, p. 63-74, 1997.

CAVANAGH, D.; NAQI, S. A. Infectious Bronchitis. In: (Ed) Dis. Polt. University CHEN, B. Y.; HOSI, S.; NUNOYA, T.; ITAKURA, C. Histopathology and immunohistochemistry of renal lesions due to infectious bronchitis virus in chicks. **Avian Pathol.**, v. 25, n. 2, p.269-283, 1997.

CAVANAGH, D.; NAQI, S. A. Infectious bronchitis. In: Saif YM, Barnes HJ, Glisson JR, Fadly AM, McDougald LR, Swayne DE. **Diseases of Poultry**. 11 a ed. Ames: Iowa State Press; p. 101-119, 2003.

CHACON, J. L.; ASSAYAG, M. S; REVOLLEDO, L.; IVO, M.; PEDROSO, A. C.; VEJARANO, M. P.; FERREIRA, A. J. P. Pathogenic patterns in chicken challenged with variant strains of infectious bronchitis virus isolated from chickens flocks with defferent clinical manifestations. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON AVIAN CORONAVIRUS, 5. 1, 2009, Rauschholzhausen, Germany. **Proceedings...** p. 411-415, 2011.

CHEN, B. Y.; HOSI, S.; NUNOYA, T.; ITAKURA, C. Histopathology and immunohistochemistry of renal lesions due to infectious bronchitis virus in chicks. **Avian Pathol.**, v. 25, n. 2, p.269-283, 1996.

COLLISSON, E. W. et al. Memory T cells protect chicks from acute infectious bronchitis virus infection. **Virology**, v. 306, p. 376-384, 2003.

COLLISSON, E.W.; PEI, J.; DZIELAWA, J.; SEO, S.H. Cytotoxic T lymphocytes are critical in the control of infectious bronchitis virus in poultry. **Dev. Comp. Immunol.**, v.24, p. 187-200, 2000.

COOK, J. Coronaviridae. In: JORDAN, F.; PATTISON, M.; ALEXANDER, D.; COOK, J. K. A.; CHESHER, J.; BAXENDALE, W.; GREENWOOD, N.; HUGGINS, N. B.; ORBELL, S. J. Protection of chickens against renal damage caused by a nephropathogenic infectious bronchitis virus. **Avian Pathol.**, Colchester, v. 30, n. 4, p. 423-426, 2001.

COOK, J. K. A.; ORBELL, S. J.; WOODS, M. A.; HUGGINS, M. B. Breadth of protection of the respiratory tract provided by different live-attenuated infectious bronchitis vaccines against challenge with infectious bronchitis viruses of heterologous serotypes. **Avian Pathol.**, v. 28, p. 477-485, 1999.

COOK, J. K. A.; OTSUKI, K.; DA SILVA MARTINS, N. R.; ELLIS, M. M.; HUGGINS, M. B. The secretory antibody response of inbred lines of chicken to avian infectious bronchitis virus infection. **Avian Pathol.**, v. 21, p. 681-692, 1992.

COOK, J. K.; JACKWOOD, M.; JONES, R. C. The long view: 40 years of infectious bronchitis research. **Avian Pathology**. 41:3, p. 239-250, 2012.

DARBYSHIRE, J. H.; PETERS, R. W. Humoral antibody response and Assessment of protection following primary vaccination of chickens with maternally derived antibody against avian infection bronchitis virus. **Res. Vet. Science**, v.38, p.14-21, 1985.

DARBYSHIRE, J.H.; PETERS, R.W. Sequential development of humoral immunity and assessment of protection in chickens following vaccination and challenge with avian infectious bronchitis virus, **Res. Vet. Sci.** v. 37:77–86, 1984.

DE WIT, J. J.; COOK, J. K. A.; HEIJDEN, H. M. J. F. Infectious bronchitis virus variants: a review of the history current situation and control measures. **Avian Pathol.**, v.40 (3), p. 223-235, 2011.

DHINAKAR-RAJ, G.; JONES, R. C. Infectious bronchitis virus: immunopathogenesis of infection in the chicken. **Avian Pathol.**, Huntingdon, v. 26, n. 4, p. 677-706, 1997.

DI FÁBIO, J.; ROSSINI, L. I. Bronquite infecciosa das galinhas. In: BERCHIERI JR. A.; MACARI, M. **Doença das aves**. 1 Ed. Campinas: FACTA, p.293-300, 2000.

DI FÁBIO, J.; ROSSINI, L. I.; ORBELL, S. J.; PAUL, G.; HUGGINS, M. B.; MALO, A.; SILVA, B. G. M; COOK, J. K. A. Characterization of Infectious Bronchitis Vírus isolates from outbreaks of disease in commercial flocks in Brazil. **Avian Dis.**, Kennet Square, v.44, p.582-589, 2000.

DOMINGO, E. Quasispecies theory in virology. **J Virol.**, v. 76, n. 1, p. 463–465, 2002 .

EAST, I. J., EISEMANN, C.H., VUOCOLO, T., PEARSON, R.D., DONALDSON, R.A., CADOGAN, L.C. Vaccine against blowfly strike: the effect of adjuvant type on vaccine effectiveness. **International Journal of Parasitology** 22, 309–314. 1992.

FARAGHER, T. (Ed.). **Poultry diseases**. New York: WB Saunders,.p. 298–306. 2003.

FERNANDO, F. S. **Avaliação da patogenicidade e da imunidade cruzada de estirpe variante do vírus da bronquite infecciosa aviária isolada no brasil**. 2013. 129p. Dissertação de mestrado – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias do Campus de Jaboticabal – UNESP, Jaboticabal, 2013.

FERNANDO, F. S.; MONTASSIER, M. F. S.; SILVA; K. R.; OKINO, C. H.; OLIVEIRA; E. S.; FERNANDES; C. C.; BANDARRA, M. B.; GONÇALVES, M. C. M.; BORZI, M. M.; SANTOS, R. M.; VASCONCELOS, R. O.; ALESSI, A. C.; MONTASSIER, H. J. Nephritis Associated with a S1 Variant Brazilian Isolate of Infectious Bronchitis Virus and Vaccine Protection Test in Experimentally Infected Chickens. **International Journal Of Poultry Science**, Asia, v. 11, n. 12, p.639-646, 2013.

GELB, J. JR.; WOLFF , J. B.; MORAN, C. A. Variant serotypes of infectious bronchitis virus isolated from commercial layer and broiler chickens. **Avian Dis.** 35:82-87, 1991.

GELB, J. JR.; WOLFF, J. B.; MORAN, C. A. Infectious bronchitis virus antibodies in tears and their relationship to immunity. **Avian Dis.**, 42: 364-74.1998.

GELB, J. JR; KEELER, C. L.; NIX, W. A.; ROSENBERGER, J. K.; CLOUD, S. S. Antigenic and S-1 genomic characterization of the Delaware variant serotype of infectious bronchitis virus. **Avian Dis.**, v. 41, p. 661–669, 1997.

GELB, J.; LADMAN, B.S.; TAMAYO, M.; GONZALEZ, M.; SIVANANDAN, V. Novel infectious bronchitis virus S1 genotypes in Mexico 1998-1999. **Avian Dis.**, v. 45, n. 4, p.1060-1063, 2001.

GOLDSTEIN, M. A.; TAURASO, N. M. Effect of Formalin, 3-Propiolactone, Merthiolate, and Ultraviolet Light Upon Influenza Virus Infectivity, Chicken Cell Agglutination, Hemagglutination, and Antigenicity. **Applied Microbiology**, vol. 19, n 2. Feb. p. 290-294, 1970.

GOUGH, R.E.; ALEXANDER, D.J. Comparison of duration of immunity in chickens infected with a live infectious bronchitis vaccine by three different routes, **Res. Vet. Sci.** 26:329–332, 1979.

HIPÓLITO, O. Isolamento e identificação do vírus da bronquite infecciosa das galinhas no Brasil. **Arq. Esc. Sup. Vet. MG**, Belo Horizonte, v.10, p.131-63, 1979.

HOFSTAD, M.S. Cross-immunity in chickens using seven isolates of avian infectious bronchitis virus, **Avian Dis.** 25:650–654, 1981.

ICVA - International Committee on Taxonomy of Viruses <http://ictvonline.org/virusTaxonomy.asp?version=2011>. Acesso em: 20 de dezembro de 2014.

IGNJATOVIC, J.; GALLI L., The S1 glycoprotein but not the N or M proteins of avian infectious bronchitis virus induces protection in vaccinated chickens, **Arch. Virol.** 138:117–134, 1994.

IGNJATOVIC, J.; SAPATS, S. I.; ASHTON, F. A long-term study of Australian infectious bronchitis viruses indicates a major antigenic change in recently isolated strains. **Avian Pathol.**, v. 26, p. 535-552, 1997.

ITO, N. K.; MIYAJI, C.; OKABAYASHI, S. 2006. Controle de variantes do vírus da bronquite infecciosa das galinhas, In: CONFERÊNCIA APINCO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLAS, Santos. **Anais...** p.75-99. 2006.

IYER, A.V., GHOSH, S., SINGH, S.N., DESHMUKH, R.A. Evaluation of three 'ready to formulate' oil adjuvants for food-and-mouth disease vaccine production. **Vaccine** 19, 1097–1105. 2001.

JANG, S. I.; LILLEHOJ, H. S.; LEE, S. H.; LEE, K. W.; LILLEHOJ, E. P.; BERTRAND, F.; DUPUIS, L.; DEVILLE, S. Montanide™ ISA 71 VG adjuvant enhances antibody and cell-mediated immune responses to profilin subunit antigen vaccination and promotes protection against *Eimeria acervulina* and *Eimeria tenella*. **Experimental Parasitology**, Dajeon - Republic Of Korea, v. 127, n. 1, p.178-183, jan. 2011.

JUNGHERR, E. L.; CHOMIAK, T.W.; LUGINBUHL, R. E. Immunologic differences in strains of infectious bronchitis virus. In Annual Meeting of the United States Livestock Sanitary Association, Chicago, IL, USA. Proceedings... p. 203-209. 1956.

KANT, A.; KOCH, G.; VAN ROOZELAAR, D. J.; KUSTERS, J. G.; POELWIJK, F. A. J.; VAN DER ZEIJST, B. A. Location of antigenic sites defined by neutralizing monoclonal antibodies on the S1 avian infectious bronchitis virus glycopolyptide. **Journal of General Virology**. 73:591-596, 1992.

KEELER, C. L. JR., REED, K. L.; NIX, W.A.; GELB, J. JR. Serotype identification of avian infectious bronchitis virus by RT-PCR of the peplomer (S-1) gene. **Avian Dis.**, 42: 275-284. 1998.

KING, D.J.; CAVANAGH, D. Infectious bronchitis. In: CALNEK, B.W.; BARNES, H.J.; BERAD, C.W.; REID, W.M.; YODER, J.R. **Diseases of poultry**. 9 ed. Ames Iowa: IowaState University Press, p.471-484, 1991.

KISS, I.; KECSKEMETI, S.; TANYI, J.; KLINGEBORN, B.; BELAK, S. Preliminary studies on feline coronavirus distribution in naturally and experimentally infected cats. **Res. Vet. Sci.**, v. 68, p. 237-242, 2000.

KOCH, G.; HARTOG, L.; KANT, A.; VAN ROOZELAAR, D. J. Antigenic domains of the peplomer protein of avian infectious bronchitis virus: correlation with biological function. **J. Gen. Virol.**, v. 71, p. 1929-1935, 1990.

KUO, L., G.J. GODEKE, M.J. RAAMSMAN, P.S. MASTERS, P.J. ROTTIER. Retargeting of coronavirus by substitution of the spike glycoprotein ectodomain: crossing the host cell species barrier. **J. Virol.**, 74: 1393-1406. 2000.

KUSTERS, J. G.; NIESTERS, H.; LENSTRA, J. A., HORZINEK, M. C.; ZEIJST VAN DER, B. A. M. Phylogeny of antigenic variants of avian coronavirus IBV. **Virology**, New York, v. 169, n. 1, p. 217-221, 1989.

LADMAN, B. S.; POPE, C. R.; ZIEGLER, A. S.; SWIECZKOWSKI, T.; CALLAHAN, J. M.; DAVISON, S.; GELB, J. JR. Protection of Chickens after Live and Inactivated Virus Vaccination against Challenge with Nephropathogenic Infectious Bronchitis Virus PA/Wolgemuth/98. **Avian Diseases, Usa**, v. 46, n. 4, p.938-944, out. 2002.

LAI, M. M. C.; HOLMES, K. V. Coronaviridae: the viruses and their replication. In: KNIPE, D. M.; HOWLEY, P. M.; GRIFFIN, D. E.; LAMB, R. A.; MARTIN, M. A.; ROIZMAN, B.; STRAIS, S. E. **Fields virology**. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins; p.1163-1185, 2001.

LAMBRECHTS, C.; PENSAERT, M.; DUCATELLE R. Challenge experiments to evaluate cross-protection induced at the trachea and kidney level by vaccine strains and Belgian nephropathogenic isolates of avian infectious bronchitis virus. **Avian Pathol**. 22: 577-590. 1993.

LANCELLOTTI, M.; MONTASSIER, M. F. S.; FERNANDO, F. S.; SILVA, K. R.; OKINO, C. H.; SANTOS, I. L.; SANTOS, R. M.; BORZI, M. M.; ALESSI, A. C.; PEREIRA, G. T.; MONTASSIER, H. J. Relationship Between Mucosal Antibodies and Immunity Against Avian Infectious Bronchitis Virus. **International Journal Of Poultry Science**, Afeganistão, v. 13, n. 3, p.138-144, jun. 2014.

LAWRENCE, G.W.; SAUL, A.; GIDDY, A.J.; KEMP, R.; PYE, D. Phase I trial in humans of an oil-based adjuvant SEPPIC MONTANIDE ISA 720. **Vaccine**; 15:176-8, 1997.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using realtime quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. **Methods**, v.25, p.402-408, 2001.

MACARI, M. **Doença das aves**. 1 Ed. Campinas: FACTA, p.293-300, 2000.

MAKELA, P.H. Vaccines, coming of age after 200 years. **FEMS Microbiology Reviews**, v.24, p.9-20, 2000.

MATTHIJS, M.G.R. et al. Course of infection and immune responses in the respiratory tract of IBV infected broilers after superinfection with E. coli. **Vet. Immunol. Immunopatol.**, v.27, n.1-2, p.77-84, 2009.

MCDOUGALL, J. S. Avian infectious bronchitis: the protection afforded by an inactivated virus vaccine. **Vet. Rec.** 85:378-381. 1969.

MCKINLEY, E. T.; HILT, D. A.; JACKWOOD, M. W. Avian coronavirus infectious bronchitis attenuated live vaccines undergo selection of subpopulations and mutations following vaccination. **Vaccine**; 26:1274-1284, 2008.

MENDONÇA, J. F. P.; NELSON, MARTINS, R. da S.; CARVALHO, L. B. de; SÁ, M. E. P. de; MELO, C. B. de. Bronquite infecciosa das galinhas: conhecimentos atuais, estirpes e vacinas no Brasil. **Ciência Rural**, v.39, n.8, p.2559-2566, nov, 2009.

MONDAL, S.P.; NAQI, S. A. Maternal antibody to infectious bronchitis virus: its role in protection against infection and development of active immunity to vaccine. **Vet. Immunol. And Immunopathol.**, 79: 31-40. 2001.

MONTASSIER, M.F.S., L. BRENTANO, L.J. RICHTZENHAIN, MONTASSIER, H. J. Molecular analysis and evolution study of infectious bronchitis viruses isolated in Brazil over a twenty-one-year period. **Proceedings of the 7th International Symposium on Avian Corona and Pneumoviruses and Complicating Pathogens**; Wetter, Germany. Druckerei Schoreder., 1: 19-30. 2012.

MONTASSIER, H. J. Molecular Epidemiology and Evolution of Avian Infectious Bronchitis Virus. **Rev. bras. Ciên. Avícola.** v. 12, n. 2, 87-96, 2010.

MONTASSIER, H.J. Enfermidades do Sistema Imune. In: BERCHIERI JR. A.; MACARI, M. **Doença das aves.** 1 Ed. Campinas: FACTA, p.133-150, 2000.

MONTASSIER, M. F. S.; BRENTANO, L.; MONTASSIER, H.J.; RICHTZENHAIN, L. J. Genetic grouping of avian infectious bronchitis virus isolated in Brazil based on RT-PCR/RFLP analysis of the S1 gene. **Pesq. Vet. Bras.**, v. 28, p. 190-194, 2008.

MONTASSIER, M. F. S.; BRENTANO, L.; RICHTZENHAIN, L. J.; MONTASSIER, H. J. Genetic diversity on s1 glycoprotein of avian infectious bronchitis virus strains isolated in Brazil between 1988-2000. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON AVIAN CORONAVIRUS, 5., Germany. **Proceedings...** p. 119-131, 2006.

MUNEER, M. A., NEWMAN, J. A., HALVORSAN, D. A., SIVANANDAN, V., NAGARAJA, K. V. & COON, N. Efficacy of infectious bronchitis virus vaccines against heterologous challenge. **Research in Veterinary Science** 45: 22-27, 1988.

OIE. Avian infectious bronchitis. In: **OIE Terrestrial Manual** P. 443-455. 2008.

OKINO, C. H. **Desenvolvimento da técnica de RT-PCR em tempo real para a detecção e diferenciação de estirpes do vírus da bronquite infecciosa das galinhas.** Jaboticabal, 2007, 104p. Dissertação de mestrado – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias do Campus de Jaboticabal – UNESP, Jaboticabal, 2007.

OKINO, C. H.; ALESSI, A. C.; MONTASSIER, M. F. S.; ROSA, A. J. M.; WANG, X.; MONTASSIER, H. J. Humoral and Cell-Mediated Immune Responses to Different Doses of Attenuated Vaccine Against Avian Infectious Bronchitis Virus. **Viral Immunology**, Us, v. 26, n. 4, p.259-267, set. 2013.

OWEN, R. L. et al. Detection of viral antigen following exposure of one-day-old chickens to the Holland-52 strain of IBV. **Avian Pathol.**, 20, 663-73, 1991.

PEI, J.; SEKELICK, M.J.; MARCUS, P.I.; CHOI, I.S.; COLLISSON E.W. Chicken interferon type I inhibits infectious bronchitis virus replication and associated respiratory illness. **J. Interferon Cytokine Res.** 21:1071–1077, 2001.

PEREIRA, N.A. Uma nova estirpe brasileira do vírus da bronquite infecciosa causadora de lesões gonadais e a proteção cruzada induzida pela vacina comercial atenuada. **Biológico**, São Paulo, v. 68, p.250-254, 2006.

REED, L. J.; MUENCH, H. A simple method of estimating fifty per cent end points. **Am. J. Hyg.**, 27, 493-97, 1938.

ROWE, C. L.; BAKER, S. C.; NATHAN, M. J.; SGRO, J. Y.; PALMENBERG, A. C.; FLEMING, J. O. Quasispecies development by high frequency RNA recombination during MHV persistence. **Adv. Exper. Med. Biol.**, v. 440, p. 759-765, 1998.

SARSON, A. J. et al. Transcriptional Analysis of Host Responses to Marek's Disease Viral Infection. **Viral Immunol.**, v. 19, n. 4, p. 747-758, 2006.

SEO, S.H.; COLLISSON, E.W. Specific cytotoxic T lymphocytes are involved in in vivo clearance of infectious bronchitis virus. **J. Virol.** 71, pp. 5173–5177, 1997.

SILVA, L. C. Avaliação da capacidade adjuvante do cloreto de dimetildioctadecilamônio associado ao hidróxido de alumínio na indução da resposta imune humoral de bovinos vacinados com o vírus da diarréia viral bovina. **Braz J vet Res anim Sci**, 41(3) 2004.

SONG, C.S.; LEE, Y.J.; LEE, C.W.; SUNG, H.W.; KIM, J.H.; MO, I.P.; IZUMIYA, Y.; JANG, H.K.; MIKAMI, T. Induction of protective immunity in chickens vaccinated with infectious bronchitis virus S1 glycoprotein expressed by a recombinant baculovirus, **J. Gen. Virol.** 79:719–723, 1998.

TIMMS, L.M.; BRACEWELL, C.D. Cell mediated and humoral immune response of chickens to inactivated oil-emulsion infectious bronchitis vaccines. **Research in Veterinary Science**, v.34, p.224-30, 1983.

TOLEDO, H.; BALLY, A.; CASTRO, O.; RESIK, S.; LAFERTE, J.; ROLO, F.; NAVEA, L.; LOBAINA, L.; CRUZ, O.; MÍGUEZ, J.; SERRANO, T.; SIERRA, B.; PÉREZ, L.; RICARDO, M. E.; DUBED, M.; LUBIÁN, A. L.; BLANCO, M.; MILLÁN, J. C.; ORTEGA, A.; IGLESIAS, E.; PENTÓN, E.; MARTÍN, Z.; PÉREZ, J.; DÍAZ, M.; DUARTE, C.A. A phase I clinical trial of multi-epitope polypeptide TAB9 combined with Montanide ISA 720 adjuvant in non-HIV-1 infected human volunteers. **Vaccine** 19, 4328–4336. 2001.

TORO, H.; FERNANDEZ, I. Avian infectious bronchitis: specific lachrymal IgA level and resistance against challenge. **J. Vet. Med. B.**, 41: 467-472. 1994.

UBABEF: UNIÃO BRASILEIRA DE AVICULTURA. **Relatório anual 2012.**
Disponível em:
<http://www.abef.com.br/ubabef/exibenoticiaubabef.php?notcodigo=3293>.
Acesso em 02 de outubro de 2012.

VILLARREAL, L. Y. B.; BRANDÃO, P. E.; CHACÓN, J. L.; ASSAYAG, M. S.; MAIORKA, P. C.; RAFFI, A. B. S.; SAIDENBERG, A. B. S.; JONES, R. C.; FERREIRA, A. J. P. Orchitis in Roosters with Reduced Fertility Associated with Avian Infectious Bronchitis Virus and Avian Metapneumovirus Infections. **Avian Dis.** v. 51, p. 900-904, 2007a.

VILLARREAL, L. Y. B.; BRANDÃO, P. E.; CHACÓN, J. L.; SAIDENBERG, A. B. S.; ASSAYAG, M. S.; JONES, R. C.; FERREIRA, A. J. P. Molecular Characterization of Infectious Bronchitis Virus Strains Isolated from the Enteric Contents of Brazilian Laying Hens and Broilers. **Avian Dis.**, v. 51, p. 974- 978, 2007b.

VILLARREAL, L. Y. B.; SANDRI, T. L.; SOUZA, S. P.; RICHTZENHAIN, L. J. DE WIT, J. J.; BRANDAO, P. E. Molecular epidemiology of avian infectious bronchitis in Brazil from 2007 to 2008 in breeders, broilers, and layers. **Avian dis.**, v. 54, p.894–898, 2010.

WANG, C.H.; HSIEH, M.C.; CHANG, P.C. Isolation, pathogenicity and H120 Protection Efficacy of Infectious Bronchitis Viruses Isolated in Taiwan. **Avian Dis.**, Kennet Square, v.40, p.620-625, 1997.