

AVALIAÇÃO SOROLÓGICA COMPARATIVA ENTRE DOIS ESQUEMAS DE VACINAÇÃO CONTRA D.I.B (DOENÇA INFECCIOSA DA BURSA)

E.N.C. Tessari¹, A.L.S.P. Cardoso¹, A.G.M. Castro¹, A.M.I. Kanashiro¹, P. Silvestrini Júnior²

¹Laboratório de Patologia Avícola de Descalvado, Instituto Biológico, Rua Bezerra Paes, 2278, CEP 13690-000, Descalvado, SP, Brasil.

RESUMO

A D.I.B. (Doença Infecciosa da Bursa) é de etiologia viral e afeta aves na faixa etária de 3-6 semanas. A Bursa de Fabricius é o órgão alvo do vírus. A imunidade passiva é transmitida pelas reprodutoras à progênie protegendo contra infecções precoces. Através de análise sorológica foram avaliados dois diferentes esquemas de vacinação e a necessidade de vacinação contra D.I.B. no primeiro dia de idade. Foram avaliados 20 lotes de pintos, representados por 20 pintos cada lote. No incubatório, 10 lotes receberam vacina contra D.I.B. e os outros 10 não foram vacinados. No primeiro dia de idade foram determinados os títulos de anticorpos maternos e no décimo dia de idade avaliou-se a queda dos títulos de anticorpos. As análises sorológicas foram feitas através do teste ELISA. Considerando-se idades semelhantes das matrizes foram obtidos parâmetros semelhantes de títulos de anticorpos no primeiro dia de vida, tanto nos lotes vacinados como nos não vacinados. No décimo dia de idade, os títulos de anticorpos de ambos os lotes tiveram uma redução semelhante, não apresentando diferença significativa entre os lotes. Através dos resultados obtidos concluiu-se que os altos títulos de imunidade passiva tornam desnecessária a vacinação contra D.I.B. em pintos no primeiro dia de idade.

PALAVRAS-CHAVE: Aves, gumboro, vacinação, imunidade.

ABSTRACT

EVALUATION SOROLOGIC COMPARED BETWEEN TWO VACCINATION SCHEMES AGAINST B.I.D. (BURSA INFECTED DISEASE). The B.I.D. (Bursa infected diseases) is the viral etiology infecting chickens range 3-6 weeks of age. The Fabricius bursa is the target organ of this virus. The passive immunity is transmitted by the female to the offspring protecting from early infections. Through sorologic analysis of different schemes of vaccination and necessity of vaccination against B.I.D. on the first day of age, 20 batches of chicks, with 20 chicks in each, were evaluated. In the incubatory 10 batches were vaccinated and 10 others were not. On the first day of age we evaluated the mother antibody titles and on the tenth day we evaluated anti-body titles. The analysis were done through ELISA. Considering the similar ages of the parental, we observed similar parameters of titles of anti-body in both batches, on the first day of age. On the tenth day of age the titles of anti-body were seduced by the same amount, no significative changes were observed between them. Therefore we concluded that high titles of passive immunity make it unnecessary vaccination of chicks on the first day of age.

KEY WORDS: Poultry, gumboro, vaccination, immunity.

INTRODUÇÃO

Doença transmissível de etiologia viral, família Birnavírus (BROWN *et al.*, 1986), acomete aves jovens alterando a morfofisiologia do sistema imunológico (SKEELES *et al.*, 1980). O genoma deste vírus consiste em dois segmentos com dupla fita de RNA (DOBOS *et al.*, 1979; LUKERT *et al.*, 1991).

A Doença Infecciosa da Bursa (D.I.B.) tem distribuição mundial e o primeiro relato desta doença foi feito por COSGROVE (1962) nos Estados Unidos; no Brasil o primeiro diagnóstico foi realizado em 1972 (NAKANO *et al.*, 1972). Durante vários anos, foi confundida com variantes de vírus de "Bronquite Infecciosa" (WINTERFIELD & HITCHNER, 1962), devido às lesões renais observadas no campo, sendo posteriormente estabelecidos agentes etiológicos distintos.

²Estagiário, Graduando de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Uberlândia.

O vírus que provoca a D.I.B. ou Doença de Gumboro é classificado em dois sorotipos distintos 1 e 2. Somente o sorotipo 1 é capaz de causar a doença em galinhas (McFERRAN *et al.*, 1980).

A patogenicidade é de grande importância econômica na avicultura industrial pois causa severa imunodeficiência, destruindo os precursores de anticorpos produzidos pelas células B na Bursa de Fabricius (B.F.) (KIBENGE *et al.*, 1988; LUKERT *et al.*, 1991; TSUKAMOTO, *et al.* 1995). A Bursa de Fabricius é o órgão alvo do vírus da D.I.B. (LUKERT & SAIF, 1991). Animais bursectomizados apresentam-se altamente refratários à infecção (KAUFER & WEIS, 1980), o que explica a resistência de aves adultas, onde a Bursa de Fabricius está fisiologicamente atrofiada.

A D.I.B. é uma enfermidade altamente contagiosa com rápida disseminação entre lotes infectados e susceptíveis. Considera-se que o período de susceptibilidade das aves está entre 3 e 6 semanas de idade (LUKERT & SAIF, 1991).

Os efeitos imunodepressivos causados pela doença clínica induzem a morbidade e mortalidade das aves (ALLAN *et al.*, 1972; FARAGHER *et al.*, 1974; HUDSON *et al.*, 1975; IVANYI & MORRIS, 1976; LUKERT *et al.*, 1991).

As seqüelas associadas à imunossupressão incluem: dermatite gangrenosa, corpos de inclusão na Síndrome de hepatite-anêmica, infecção por *E. coli* e falhas na vacinação. O vírus não acomete humanos e não tem importância na saúde pública (LUKERT & SAIF, 1991).

A incidência da infecção provocada pelo vírus da D.I.B. encontra-se em áreas de produção de aves. Todos os lotes estão expostos ao vírus durante os primeiros estágios de vida (JONES, 1986).

A resposta imune-humoral contra o vírus desafio ou vacinal da D.I.B. vem sendo pesquisada intensamente (HOWIE & THORSEN, 1981; LUKERT *et al.*, 1979; MARQUARDT *et al.*, 1980; SKEELES *et al.*, 1979; WINTERFIELD *et al.*, 1980). As respostas de anticorpos para D.I.B. eram medidas inicialmente através do teste de Precipitação em ágar Gel (AGP) (CURSIEFEN *et al.*, 1979; WEISMAN & HITCHNER, 1978), teste de Vírus Neutralização (VN) (GIAMBRONE, 1980; GIAMBRONE, 1983; SNYDER *et al.*, 1984); atualmente o teste mais utilizado é o ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) que é um teste sensível, quantitativo e eficiente no diagnóstico de D.I.B. (LUCIO & HITCHNER, 1979). Com os resultados destes estudos tem-se desenvolvido programas de vacinação mais eficientes. Os títulos séricos de anticorpos produzidos pela vacinação são menores que aqueles produzidos por uma infecção de campo (HITCHNER, 1976).

A imunidade passiva é transmitida pelas reprodutoras à progênie, através da gema, e protege contra infecções precoces da D.I.B. resultando em proteção contra o efeito imunossupressor do vírus. A

meia vida dos anticorpos maternos contra D.I.B. é de três a cinco dias (SKEELES *et al.*, 1979).

LUCIO & HITCHNER (1979) indicaram que reprodutoras vacinadas com vacinas oleosas apresentavam níveis mais elevados de anticorpos propiciando uma imunidade materna maior à sua progênie.

A imunização é o principal método usado para o controle da D.I.B. em aves (BAXENDALE *et al.*, 1981).

Para obtenção de imunidade sólida e duradoura deve-se empregar um programa de vacinação adequado as condições locais, conhecer as condições ambientais e de manejo e avaliar os níveis de uniformidade dos anticorpos maternos transferidos a progênie. Estresse ambiental e manejo são fatores a serem considerados para o programa de vacinação ser efetivo. Monitoramento dos níveis de anticorpos das matrizes e da progênie são importantes para determinar o período ideal para a vacinação (LUKERT & SAIF, 1991).

SOLANO *et al.* (1985) referem que poedeiras comerciais vacinadas ou não no primeiro dia de vida no incubatório, quando analisadas, não apresentavam diferenças significativas em suas quantidades de anticorpos.

MATERIAL E MÉTODOS

Divisão dos lotes e vacinação:

Foram avaliados vinte lotes de pintos de um dia de idade com a mesma procedência e de matrizes de mesma idade, com vinte pintos em cada lote. Dez desses vinte lotes receberam no incubatório somente vacina de Marek (LOTE A) e outros dez, vacina de Marek associada à vacina de Gumboro estirpe intermediária (LOTE B). Com dez dias de idade estes lotes novamente foram avaliados para mensuração de seus títulos de anticorpos.

Colheita das amostras:

No incubatório foram colhidas vinte amostras de soro, em cada um dos lotes pesquisados, para avaliar títulos maternos através do teste de ELISA. Após dez dias, foram efetuadas novas colheitas de vinte amostras de soro em cada um dos lotes para novos testes de ELISA (teste Imunoenzimático, método indireto, utilizado para quantificar anticorpos). Essa análise está delineada para medir a concentração relativa de anticorpos contra o vírus de Gumboro presente nos soros das aves.

A placa utilizada para o teste da empresa IDEXX Inc. contém 96 orifícios recobertos com o antígeno viral.

Os soros analisados foram diluídos 1:500 (1 microlitro de soro para 500 microlitros de diluente). Foram utilizados 100 microlitros desse soro diluído.

Após a adição do soro diluído nos 96 orifícios da placa sensibilizada com o antígeno, esperou-se 30 minutos, tempo necessário para haver reação antígeno-anticorpo. Após esse tempo, lavou-se a placa com água destilada por três vezes consecutivas. Depois de lavar adicionou-se o Conjugado (anticorpo de coelho antígeno IgG de galinha marcados com enzima Peroxidase), aguardou-se 30 minutos e lavou-se novamente com água destilada por três vezes. Depois de lavar, adicionou-se aos 96 orifícios o Substrato Cromogênio, reativo que será degradado pela enzima Peroxidase presente no Conjugado, que, ao ser degradado, emitirá cor que será mais intensa quanto maior for a degradação. A quantidade desse complexo depende da quantidade de anticorpos presentes no soro que está sendo analisado.

A prova foi lida em leitora MICROPLATE - EL 310 a uma intensidade de luz a 610 nm.

Os resultados foram analisados estatisticamente com nível de significância de 5%, através do teste de Tukey (ELFAKI *et al.*, 1992).

RESULTADOS

Os resultados foram obtidos através de método experimental e avaliados estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Os soros dos lotes de aves no primeiro dia de idade não apresentaram diferenças significativas ($P > 0,05$) na quantidade de anticorpos, quando avaliados atra-

vés do título médio de anticorpos dos lotes (Gmean) obtidos pelo teste imunoenzimático indireto (ELISA) nos lotes vacinados (Lote A) e lotes não vacinados (Lote B) (Tabela 1 e Fig. 1).

Aos dez dias de idade os lotes foram novamente testados sorologicamente através do teste de ELISA para acompanhar a queda dos anticorpos maternos e não foram encontradas diferenças significativas ($P > 0,05$) quando avaliados através do teste de Tukey (Tabela 2 e Fig. 2).

DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

A imunização é o principal meio para o controle da D.I.B. (doença infecciosa da bursa) (BAXENDALE *et al.*, 1981) e a vacinação das aves assume um importante papel na criação de frangos de corte, tanto na parte de sanidade como no custo desta criação.

A imunidade passiva dos pintos é um fator de grande importância tendo uma meia vida de três a cinco dias (SKEELES *et al.*, 1981) o que pode conferir uma segurança aos lotes em que se baseia na não vacinação no primeiro dia de idade. Na ave, a imunidade passiva é muito importante e é transferida à progênie através da gema, ou seja, via vertical.

A escolha do tipo de vacina e do esquema de vacinação dependem da virulência do vírus da D.I.B. e também do nível de anticorpos maternos (GIAMBRONE, 1984).

Estudos realizados por SOLANO *et al.*, 1985, de-

Tabela 1 – Títulos médios dos lotes (Gmean), obtidos pelo teste de ELISA de lotes vacinados (Lote A) e não vacinados (Lote B) no primeiro dia de idade.

Nº de lotes	Lote A Gmean	Lote B Gmean
1	3960	4136
2	4120	4590
3	4402	4660
4	4175	4490
5	5084	4302
6	4280	4083
7	4525	4260
8	4243	3951
9	4239	4120
10	4641	4082
μ	4366,9a	4267,4b
S	106,47	79,85
C.V. (%)	0,57	1,87

Médias seguidas por letras distintas não diferem em 5% pelo teste de Tukey.

μ - média aritmética do Gmean dos lotes

S - desvio padrão dos lotes C.V.- coeficiente de variação

Tabela 2 – Títulos médios dos lotes (Gmean), obtidos pelo teste de ELISA de lotes vacinados (Lote A) e não vacinados (Lote B) no décimo dia de idade.

Nº de lotes	Lote A Gmean	Lote B Gmean
1	981	998
2	652	636
3	970	960
4	921	940
5	880	860
6	774	751
7	730	786
8	980	1093
9	875	904
10	708	602
μ	847,1a	853b
S	47,48	53,31
C.V. (%)	5,6	6,25

Médias seguidas por letras distintas não diferem em 5% pelo teste de Tukey.

μ - média aritmética do Gmean dos lotes

S - desvio padrão dos lotes C.V.- coeficiente de variação

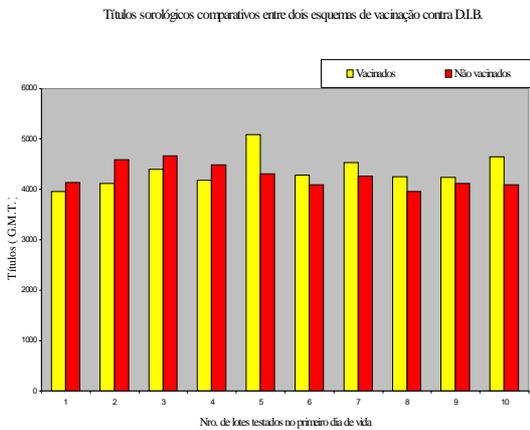


Fig. 1 - Gráfico comparativo entre os títulos médios de anticorpos (Gmean) de pintos de um dia, lotes vacinados e lotes não vacinados.

monstraram que a eficácia da imunização através de vacinas de estirpe intermediária, determinam um incremento à resposta de anticorpos (conversão sorológica) ao vírus da D.I.B. quando os anticorpos maternos diminuem.

A indústria avícola consiste em um setor significativo no mundo da avicultura. Nos Estados Unidos mais de oito bilhões de aves são produzidas anualmente e a prevenção da doença com vacinação é uma parte integral deste controle (SHARMA, 1999).

Programas de vacinação são importantes para a estratégia do controle da imunossupressão causada pela D.I.B. pois esta imunossupressão deixa as aves suscetíveis a infecções secundárias e podem ocorrer falhas na vacinação (LUTTICKEN, 1997). As indústrias avícolas baseiam-se nestes programas de vacinação para minimizar custos e problemas com a D.I.B. (FUSSELL, 1998).

Este trabalho demonstrou que não se faz necessário a vacinação dos pintos de um dia de idade, desde que sejam avaliados os títulos de anticorpos maternos.

SOLANO *et al.* (1985) demonstrou que poedeiras vacinadas ou não no primeiro dia de vida não apresentavam diferenças significativas nos títulos de anticorpos.

Programas de vacinação bem elaborados em conjunto com um monitoramento sorológico (ELISA) (SHARMA, 1999) resultam em uma economia para a indústria avícola, onde a minimização de custos e melhora dos índices zootécnicos e sanitários são fundamentais para a otimização dos resultados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALLAN, W.H.; FARAGHER, J.F.; CULLEN, G.A. Imunossuppression by the infections bursal agent in chickens immunized against Newcastle disease. *Vet. Rec.*, v.90, p.511-512, 1972.
- BAXENDALE, W. & LUTTICKEN, D. The results of field trials with an inactivated Gumboro vaccine. *Dev. Biol. Stand.* v.51, p.211-219, 1981.

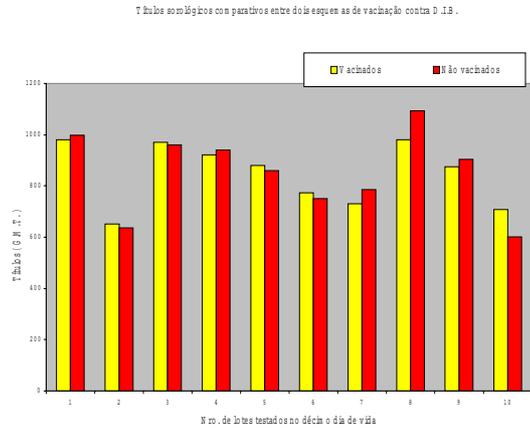


Fig. 2 - Gráfico comparativo entre os títulos médios de anticorpos (Gmean) de pintos com dez dias de idade, lotes vacinados e lotes não vacinados.

- BROWN, F. The classification and nomenclature of viruses: Summary of results of meetings of the International Committee on Taxonomy of Viruses in Sendai. *Intervirology*, v.25, p.141-143, 1986.
- COSGROVE, A.S. An apparently new disease of chickens-avian nephrosis. *Avian Dis.*, v.6, p.385-389, 1962.
- CURSIEFEN, D.; VIELTIZ, E.; LANDEGRAF, H.; BEATCH, H. Evaluation of a vaccine against infectious bursal disease in field trials. *Avian Pathol.*, v.8, p.341-351, 1979.
- DOBOS, P.; HILL, B.J.; HALLET, R.; KELLS, D.T.C.; BETCHT, H.; TENINGES, D. Biofysical and biochemical characterization of five animal viruses with Bisegmented double-stranded genomes. *J. Virol.*, v.32, p.593-605, 1979.
- ELFAKI, M.G.; KLEVEN, S.H.; JIN, L.H.; RACLAND, W.L. Sequential intracoelomic and intabursal immunization of chickens with inactivated Mycoplasma gallisepticum bacterin and iota carrageenan adjuvant. *Vaccine*, v.10, p.655-662, 1992.
- FARAGHER, J.T.; ALLAN, W.H.; WYETH, C.J. Immunosuppressive effect of infectious bursal agent on vaccination against Newcastle disease. *Vet. Rec.*, v.95, p.385-388, 1974.
- FUSSELL, L.W. Poultry industry strategies for control of immunosuppressive diseases. *Poultry Sci.*, v.77, n.8, p.1193-1196, 1998.
- GIAMBRONE, J.J. Microculture neutralization test for serodiagnosis of three avian viral Infections. *Avian Dis.*, v.24, p.284-287, 1980.
- GIAMBRONE, J.J. Gumboro vaccines: hard-hitting advice! *Broiler Ind.*, v.40, p.80-87, 1983.
- GIAMBRONE, J.J. IB spray vaccination. If water fails, try it. *Broiler Ind.*, v.46, p.52-54, 1984.
- HITCHNER, S.B. Infectivity of infections bursal disease virus for embryonating egg. *Poultry Sci.*, v.49, p.511-516, 1970.
- HITCHNER, S.B. Immunization of adults hens against infections bursal disease virus. *Avian Dis.*, v.20, p.611-613, 1976.
- HOWIE, R. & THORSEN, J. Na enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for infectious bursal disease virus. *Can. J. Comp. Med.*, v.45, p.51-55, 1981.
- HUDSON, L.; PATTISON, M.; THANTREY, N. Specific Blymphocytes suppression by infectious bursal agent (gumboro vírus) in chickens. *Eur. J. Immunol.*, v.5, p.675-679, 1975.

- IVANYI, J. & MORRIS, R. Immunodeficiency in the chicken. Iv. Na immunological study of Infectious bursal disease. *Clin. Exp. Immunol.*, v.23, p.154-165, 1976.
- JONES, B.A. Infections bursal disease serology in New Zealand poultry flocks. *N. Z. Vet. J.*, p.34-36, 1986.
- KAUFER, I. & WEIS, E. Significance of bursa of Fabricius as target organ in infections bursal disease of chickens. *Infec. Immun.*, v.27, n.2, p.364-367, 1980.
- KIBENGE, F.S.B.; DHILLON, A. S.; RUSSELL, R.G. Biochemistry and immunology of infectious bursal disease virus. *J. Gen. Virol.*, v.69, p.1757-1775, 1988.
- LUCIO, B. & HITCHNER, S.B. Infections bursal disease emulsified vaccine: Effect upon neutralizing-antibody levels in the dam and subsequent protection of progeny. *Avian Dis.*, v.23, p.466-478, 1979.
- LUCIO, B. & HITCHNER, S.B. Response of susceptible versus immune chicks to Killed, Live- modified, and wild infectious bursal disease virus vaccine. *Avian Dis.*, v.23, p.1037-1050, 1979.
- LUKERT, P.D.; LEONARD, J.; DAVIS, R.B. Infectious bursal disease-antigen production and immunity. *Am. J. Vet. Res.*, v.36, p.539-540, 1975.
- LUKERT, P.D. & SAIF, Y.M., Infectious bursal Disease. In: CALNAK, B.W.; BARNES, H.J.; BEARD, C.W.; YODER, H.W. *Diseases of poultry*. 9.ed. Ames: Iowa State University Press, 1991. p.648-663.
- LUTTCKEN, D. Viral diseases of the immune system and strategies to control infectious bursal disease by vaccination. *Acta Vet. Hung.*, v.45, n.3, p.239-249, 1997.
- McFERRAN, V.B.; McNULTY, M.S.; MCKILLOP, E.R.; CONNOR, J.T.; MCCracken, R.M.; COLLINS, D.S.; ALLAN, G. Isolation and serological studies with infectious bursal disease viruses from fowl, turkes and ducks: demonstration of a second serotype. *Avian Pathol.*, v.9, p.395-404, 1980.
- MARQUARDT, W.W.; JOHNSON, R.B.; ODENWALD, W.F.; SCHLOTTHOBER, B.A. Na indirect enzymelinked immunosorbent assay (ELISA) for measuring antibodies in chickens infected with infectious bursal disease virus. *Avian Dis.*, v.24, p.375-385., 1980.
- NAQI, S.A.; MARQUEZ, B.; SAHIN, N. Maternal antibody and its effect on infectious bursal disease immunizations. *Avian Dis.*, v.27, p.623-631, 1983.
- NAKANO, M.; PORTUGAL, M.A.S.C.; SALIBA, A.M.; NOBRE, D.; NARIMATSU, M.N. A ocorrência de doença de Gumboro no Brasil. Diagnóstico anatomopatológico. *Biológico*, São Paulo, n.38, p.60-66, 1972.
- SHARMA, J.M. Introduction to poultry vaccines and immunity. *Adv. Vet. Med.*, v.41, p.481-494, 1999.
- SOLANO, W.; GIANBRONE, J.J.; WILLIAMS, J.C.; LAUERMAN, L.H.; PANANGALA, V.S.; GARCES, C. Effect of maternal antibody on timing of initial vaccination of young white leghorn chickens against infectious bursal disease virus. *Avian Dis.*, v.30, n.4, p. 648-652, 1985.
- SKEELES, J.K.; LUKERT, P.D.; FLETCHER, O. J.; LEONARD, J.D. Immunization studies with a cell-culture-adapted infections bursal disease virus. *Avian Dis.*, v.23, p.456-465, 1979.
- SKEELES, J.K.; SLAVIK, M.F.; BEASLEY, J.N.; BROWN, A.H.; MEINECKE, C.F.; MARUCA, S.; WELCH, S. An age-related coagulation disorder associated with experimental infection with infections bursal disease virus. *Am. J. Vet. Res.*, v.41, p. 1458-1461, 1980.
- SNYDEER, D.D.; MARQUARDT, W.W.; MALLINSON, E.T.; SAVAGE, P.K.; ALLEN, D.C. Rapid serological profiling by enzyme-linked immuno-sorbent assay. III. Simultaneous measurements of antibody titers to infections bronchitis, infections bursal disease, and Newcastle disease viruses in a single serum dilution. *Avian Dis.*, v.28, p. 12-24, 1984.
- TSUKAMOTO, K.; TANIMURA, N.; MASE, M.; IMAI, K. Comparison of virus replication efficiency in lymphoid tissues among three infections bursal disease virus strains. *Avian Dis.*, v.39, p.844-852, 1985.
- WEISMAN, J. & HITCHNER, S.B. Infections bursal disease virus infection attempts in turkey and coturnix quail. *Avian Dis.*, v.22, p.604-609, 1978.
- WINTERFIELD, R.W.; DHILLON, A.S.; THACKER, H.L.; ALBY, L.J. Immune response of white Lighorn chicks from vaccination with different strains of infectious bursal disease virus and in the presence of maternal antibodies. *Avian Dis.*, v.24, p.179-188, 1980.
- WINTERFIELD, R.W. & HITCHNER, S.B. Etiology of infectious nephritis-nephrosis syndrome of chickens. *Am. J. Vet. Res.*, v.23, p.1273-1279, 1962.

Recebido para publicação em 10/3/00