

CAPÍTULO 11

Caracterização do genoma e teste de proteção vacinal para amostras do vírus da bronquite infecciosa das aves associadas a surtos “atípicos” da doença

Iara Maria Trevisol
Fátima Regina Ferreira Jaenisch
Virginia Santiago Silva
Liana Brentano
Arlei Coldebella
Ediane Paludo
Diane Gritti
Daine Ross
Paulo Augusto Esteves

Introdução

A bronquite infecciosa das aves (BI) é uma doença viral respiratória aguda, disseminada no mundo todo. É uma doença altamente contagiosa, com sinais clínicos como: espirros, ronqueira e estertores traqueais. Os sintomas diminuem o desempenho das aves, com perda de peso e refugagem. As complicações com infecções bacterianas secundárias causam grandes perdas econômicas por condenações de carcaças devido, principalmente, a aerossaculite (CAVANAGH; NAQI, 2003). O vírus da bronquite infecciosa das aves (VBI) replica no oviduto, causando perdas de 10 a 50% na produção de ovos, alterações da qualidade da casca e conseqüentes deformações nos ovos, sendo que, frequentemente, a produção não retorna aos níveis normais (CAVANAGH; NAQI, 2003). Algumas amostras são altamente nefropatogênicas, podendo causar mortalidade de até 30% em aves jovens. A natureza altamente transmissível da doença e a ocorrência de múltiplos sorotipos do vírus têm complicado os resultados da vacinação e aumentado os custos de prevenção da doença com imunização. A capacidade do VBI de incorporar frequentes mutações e recombinações em seu genoma resultam no surgimento de novos vírus (que podem apresentar perfil genômico considerado variante ou clássico). No entanto, segundo Cavanagh et al. (1992), há evidências de uma considerável proteção cruzada mesmo entre diferentes sorotipos, uma vez que as alterações nem sempre são significativas, não resultando na necessidade de novas amostras vacinais contra estas "variantes". Portanto, para configurar situações de falhas vacinais, os testes de proteção vacinal *in vivo* tornam-se tão ou mais relevantes do que apenas a caracterização sorológica ou molecular do vírus (COOK, 1997). Em 1991, na Inglaterra, em galinhas em produção vacinadas, começou a ser relatado a presença de sinais de bronquite infecciosa com características incomuns. Tais surtos foram associados a um novo tipo de vírus, completamente diferente das amostras de VBI descritas até então. O novo vírus foi denominado 793B (GOUGH et al., 1992) e amostra 4/91 (PARSONS et al., 1992). A doença relatada apresentava mortalidade elevada e uma miopatia do músculo peitoral profundo (GOUGH et al., 1992, citado por COOK et

al., 1996). No Brasil, a partir de 2003, surtos “atípicos” de bronquite associados com a apresentação de um novo tipo de lesão, caracterizada por degeneração e necrose da musculatura peitoral, também foram observados (BRENTANO et al, 2005). Nestes casos, o vírus da BI foi isolado em ovos embrionados tendo seu genoma detectado pelo teste de Reação em Cadeia da Polimerase posterior à Transcrição Reversa da região-alvo do genoma viral (RT-PCR). Ao executar-se experimentos de infecção viral “in vivo” (em aves tipo Specific Pathogen Free - SPF), foi possível reproduzir doença respiratória e renal, tanto com lesões macroscópicas como microscópicas, mas não foi possível reproduzir as lesões de miopatia. Os autores concluíram, então, pela necessidade de novos testes.

Em 2005, três isolados brasileiros de VBI envolvidos com casos de lesões respiratórias, renais, alterações na quantidade e qualidade dos ovos e miopatia, previamente isolados, foram submetidos a PCR da sub-unidade 1 da proteína Spike (S1) e, posteriormente, sequenciados (BRENTANO et al., 2006). Duas amostras apresentaram perfil relacionado a amostras nefropatogênicas do VBI e uma delas foi classificada como sorotipo Massachusetts. Os resultados de filogenia encontrados indicam que não há relação entre o perfil genômico variante e as novas lesões de miopatia observadas. Uma dessas amostras foi utilizada para testes de desafio frente a uma vacina sorotipo Massachusetts (TREVISOL et al., 2006). Os resultados demonstraram redução dos sinais clínicos, mas não da ciliostase, e alta taxa de recuperação viral quando comparou-se grupo vacinado e agredido com o grupo somente desafiado. Em tal estudo, não houve completa proteção cruzada, e a possibilidade de rever programas vacinais, bem como o sorotipo vacinal, é questionada, mas não respondida.

Mesmo com o uso de vacinação, o controle da BI nunca foi, conforme relatos de campo, plenamente satisfatório, sendo, porém, importante lembrar que não existem dados de prevalência nacional atualizados (ITO et al., 2006). Sendo assim, é importante conhecer o perfil filogenético destas amostras que se apresentam atualmente envolvidas com miopa-

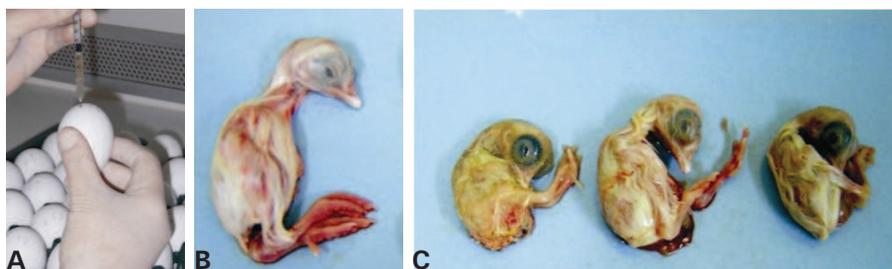
tia e determinar o grau de proteção conferido pela amostra vacinal Massachusetts frente às amostras isoladas no Brasil para melhor caracterizar tais variantes presentes no território nacional, gerando informações mais concretas sobre este novo sorotipo denominado VBI 4/91.

Objetivos

- Isolar amostras do vírus da bronquite infecciosa das aves envolvidas em casos de miopatia, tanto em frangos de corte quanto em reprodutores (matrizes);
- Caracterizar o genoma do vírus da bronquite infecciosa das aves envolvidas em casos de miopatia;
- Realizar um levantamento da ocorrência de variantes do vírus da bronquite infecciosa das aves associadas a surtos “atípicos” da doença;
- Definir o grau de proteção vacinal cruzada frente à amostra “atípica” do vírus da bronquite infecciosa das aves associada a lesões musculares;
- Investigar a associação de lesões na musculatura das aves a variantes do vírus da bronquite infecciosa.

Material e Métodos

Durante o período de vigência do projeto, de 2007 a 2010, foram isoladas e recuperadas amostras do vírus da bronquite infecciosa das galinhas de casos de bronquite clássica (problemas respiratórios) e de casos “atípicos”, como presença de lesões na musculatura peitoral. Para isso, porções de pulmões/traqueias (amostra respiratória) e músculos foram submetidas à inoculação em embriões de aves SPF. As amostras que apresentaram lesões sugestivas da presença do VBI (Figura 1) foram submetidas à técnica molecular de RT-PCR, em que um fragmento de 1046 pares de base da proteína S1 foi amplificado e revelado em gel de agarose a 1% (Figura 2). Após a confirmação de positividade para VBI, os produtos da PCR foram purificados e sequenciados (ABI 3130 Life Technologies). Após, as sequências obtidas foram processadas e analisadas in silico com o auxílio dos seguintes softwares: Vector NTI 11; BLAST; BioEdit 7.0 e MEGA 5.



Fotos: Iara M. Trevisol/Embrapa

Figura 1. A) Inoculação em ovos embrionados, B) Embrião normal 6 dias pós inoculação; e C) Embriões seis dias pós inoculação apresentando enrolamento, nanismo e hemorragia

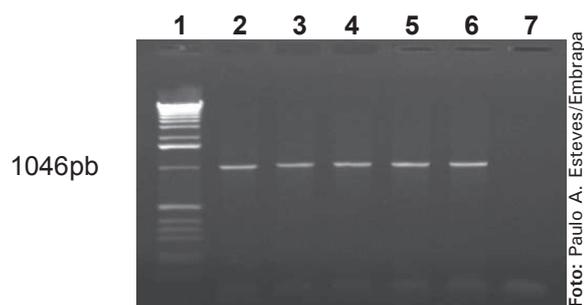


Figura 2. RT-PCR dos LCA colhidos da p6 em embriões de galinhas SPF: 1) Marcador peso molecular 1KB; 2) LCA contr (+) am M41; 3) LCA p6 amA; 4) LCA p6 amB; 5) LCA p6 amC; 6) LCA p6 amD; 7) LCA contr (-)

A partir da análise filogenética, duas amostras foram selecionadas para os testes de desafio *in vivo*: a amostra BIBR8471 recuperada de matrizes com sinais respiratórios e renais, além de lesões no músculo peitoral, e a amostra BIBR010, isolada de matrizes com sinais respiratórios, taxa de mortalidade elevada e lesões de músculo. Tanto a vacina H120 quanto as amostras de desafio foram tituladas e diluídas para obtermos uma dose aproximada de $10^{3,5}$ DIE⁵⁰/ave. A amostra M41 foi utilizada sob a mesma metodologia como referência de desafio. As aves receberam duas doses de vacina via ocular aos 14 e 21 dias de idade e foram desafiadas quatro semanas pós-vacinação (AVIAN..., 2008). A

taxa de proteção foi avaliada no 5º dia pós-desafio através do inverso do percentual de alterações ciliares das traqueias. Nesse mesmo dia foram colhidas porções de traqueias em formol 10% e processados para posterior exame microscópico. As aves foram submetidas aos seguintes tratamentos:

Grupos	Tratamento
1	Controle negativo (NV/ND)
2	Controle da vacinação (V/ND)
3	Patogenicidade amostra variante BIBR8471 (NV/D am.BIBR8471)
4	Resposta ao vírus variante BIBR8471 (V/D am.BIBR8471)
5	Patogenicidade amostra variante BIBR010 (NV/D am. BIBR010)
6	Resposta ao vírus variante BIBR010 (V/D am. BIBR010)
7	Controle desafio (amostra referência M41) (NV/D am. M41)
8	Controle resposta a amostra homóloga (M41) (V/D am. M41)

NV: não vacinado; ND: não desafiado; V: somente vacinado; D: somente desafiado.

Para os testes *in vivo*, aves SPF foram aleatoriamente divididas em oito grupos, mantidas em unidades isoladoras com ar filtrado e pressão positiva (Figura 3).



Figura 3. Cabines isoladoras – estrutura da Embrapa Suínos e Aves para testes *in vivo*

Resultados e discussão

Cinco amostras de vírus foram recuperadas de casos clássicos de bronquite e 11 de casos "atípicos" da enfermidade. Dos casos em que havia lesões musculares envolvida, cinco amostras de tecido muscular foram estudadas. Em nenhuma delas foi possível isolar vírus ou fazer sua identificação pela RT-PCR.

Das 16 amostras virais isoladas, 11 foram caracterizadas pela sequência de aminoácidos: quatro apresentaram perfil de clássica e sete apresentaram perfil de amostra "variante". Este resultado confirma a existência de amostras variantes e amostras clássicas envolvidas em surtos clínicos de BIG no Brasil e colabora com outros autores que citam a grande diversidade genética das amostras brasileiras (ABREU et al., 2006; VILLARREAL, 2007; MONTASSIER, 2008).

Para definir o grau de proteção cruzada das amostras BIBR8471 e BIBR010, frente à vacina H120, foi primeiramente calculado o percentual de aves com ciliostase (Tabela 1). O inverso do percentual de ciliostase foi considerado como percentual de proteção (Tabela 2).

Tabela 1. Avaliação da ciliostase no epitélio traqueal cinco dias após o desafio

Grupos	Tratamentos	% de ciliostase
1	NV/ND	18,0
2	V/ND	9,0
3	NV/D am. BIBR8471	91,0
4	V/D am. BIBR8471	9,0
5	NV/D am. BIBR010	37,5
6	V/D am. BIBR010	0,0
7	NV/D am. M41	100,0
8	V/D am. M41	18,0

Tabela 2. Percentual de proteção da vacina H120 frente a amostra de referência para estudos de bronquite e duas amostras de campo.

Tratamentos	% de proteção
V/D am. BIBR8471	91,00
V/D am. BIBR010	100,0
V/D am. M41	82,0

A alta patogenicidade da amostra M41 foi confirmada pelo alto índice de lesão nos cílios traqueiais (100% de alteração nos batimentos ciliares), bem como da amostra “variante” BIBR8471. Já a amostra BIBR010, também classificada como “variante”, apresentou alterações ciliares inferiores à amostra de referência e a “variante” BIBR8471. Isso pode ser interpretado como uma baixa patogenicidade da amostra BIBR010 para o trato respiratório das aves. Por outro lado, a amostra BIBR8471 mostrou-se altamente patogênica (91% de alteração nos batimentos ciliares) e, mesmo assim, o percentual de proteção de 82% atende as normas internacionais para testes de eficácia de vacinas vivas que exige no mínimo 90% de proteção (AVIAN..., 2008). Os resultados obtidos até o momento evidenciam que duas amostras variantes genotipicamente pertencem a um mesmo prototipo ou imunotipo.

A análise microscópica das traqueias das aves inoculadas corroborou com as avaliações de virulência e patogenia do processo infeccioso. Os achados microscópicos mais evidentes foram: descamação do epitélio, perda dos cílios, presença de edema, congestão e infiltrado mononuclear e heterofílico, nas camadas mucosa e submucosa (Figura 5). As lesões foram mais severas para amostra BIBR8471 e menos significativas para a amostra BIBR010.

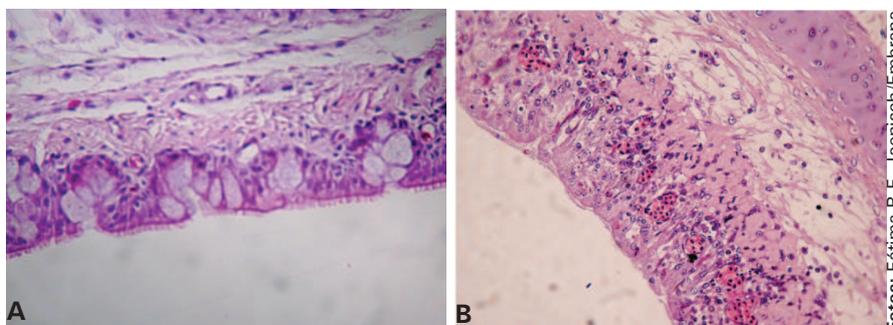


Figura 4. Corte histológico de traqueia de frango, (H&E, 40X). A) Mucosa traqueal, sem alterações: camada epitelial com cílios, glândulas mucoides evidentes; B) Mucosa traqueal, apresentando descamação do epitélio, perda dos cílios, edema e infiltrado inflamatório

Considerações finais

Conclui-se que, embora as amostras BIBR8471 e BIBR010 tenham sido classificadas genotipicamente como “variantes”, duas doses de $10^{3.5} \text{DIE}_{50}/\text{ave}$ de vacina H120 comercial (amostra tipo Massachusetts) foram capazes de induzir proteção para ambas. Entretanto a amostra BIBR8471 apresentou-se como uma amostra “variante” altamente patogênica, enquanto a BIBR010 foi de baixa virulência.

Estes resultados reforçam a importância da classificação de novas amostras em imunotipos (protectotipos) para a tomada de decisão e elaboração de estratégias de controle dessa enfermidade. Conhecer a capacidade de proteção da vacina viva disponível é de fundamental importância no controle dessa enfermidade, uma vez que esse conhecimento influencia diretamente na decisão de permitir ou não a utilização de novas amostras vacinais vivas no país.

Agradecimentos

Ao excelente trabalho de nossas equipes de apoio técnico:

- virologia das aves: Tânia Alvina Potter Klein e Magda Regina Mulinari;
- histopatologia: Salete de Oliveira e Francieli Ianiski;
- isolamento e necropsia: Altair Althaus e Dejalmo da Silva;
- preparo de materiais: Gérson Luís Tessmann e Valmor dos Santos;
- granja SPF aves: Ademair Jair Wunder e Idelsino A. Gonçalves (*in memoriam*).

Referências

ABREU, J. T.; RESENDE, J. S.; FLATSCHART, R. B.; FOLGUERAS-FLATSCHART, Á. V.; MENDES, C. A. R.; MARTINS, N. R. S.; SILVA, C. B. A.; FERREIRA, M. C.; 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 Disease**, v. 50, n. 4, p. 494-501, 2006.

BRENTANO, L.; KLEIN, T. A. P.; JAENISCH, F. R.; BACK, A.; CASTRO, A. G. M. Isolamento do vírus de bronquite infecciosa das aves de surtos da doença associada a lesões "atípicas" de miopatia de músculo peitoral. **Brazilian Journal of Poultry Science – Revista Brasileira de Ciência Avícola**, sup. 7, p. 232, 2005.

BRENTANO, L.; ESTEVES, P. A.; TREVISOL, I. M.; HAYASHI, M. M.; LUCIANO, R. L.; CASTRO, A. G. M.; KLEIN, T. A. P.; MOLINARI, M. Sequenciamento parcial do gene S1 de vírus da bronquite infecciosa (IBV) isolados de surtos da doença associada a lesões de miopatia peitoral. **Brazilian Journal of Poultry Science – Revista Brasileira de Ciência Avícola**, sup. 8, p. 241, 2006.

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

CAVANAGH, D.; NAQI, S.A. Infectious Bronchitis. In: SAIF, Y. M.; BARNES, H. J.; GLISSON, J. R.; FADLY, A. M.; MC DOUGALD, L. R.; SWAYNE, D. E. (Ed.). **Diseases of Poultry**, 11. ed. Iowa: Iowa State Press, 2003. p. 101-119.

COOK, J.; ORBELL, S. J.; WOODS, M.A.; HUGGINS, M.B. A survey of the presence of a new infectious bronchitis virus designated 4/91. **Veterinary Record**, v. 138, p. 178-180, 1996.

COOK, J. K. A. Bronquite infecciosa aviária: situação mundial e distribuição de sorotipos. In: Simpósio sobre Sanidade Avícola, 1997, São Paulo. **Anais...** São Paulo: Facta, 1997. p.13-27.

ITO, N. M. K.; MIYAJI, C. I.; OKABAYASHI, S. Controle de variantes do vírus da bronquite infecciosa das galinhas. In: SIMPÓSIO SOBRE SANIDADE AVÍCOLA, 2006, Santos, SP. **Palestras do temário geral**. São Paulo: FACTA, 2006. p.75-99.

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. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 28, n. 3, p. 190-194, 2008.

AVIAN infectious bronchitis. In: OIE Terrestrial Manual 2008. Paris: OIE, 2008, p. 443-455.

TREVISOL, I. M. Teste de proteção vacinal para uma amostra de bronquite infecciosa isolada de caso de miopatia frente amostra de vacina comercial H120. **Brazilian Journal of Poultry Science – Revista Brasileira de Ciência Avícola**, supl. 8, p. 240, 2006.

VILLARREAL, L.Y. Molecular characterization of infectious bronchitis virus strain isolated from the enteric contents of Brazilian laying hens and broilers. **Avian Disease**, v. 51, n. 4, p. 974-978, 2007.