



Monitoração sorológica para bronquite infecciosa em galinhas de postura comercial no Estado do Ceará*

Serological evaluation for infectious bronchitis in commercial laying hens of Ceará State, Brazil

Rosa Patrícia Ramos Salles¹, William Maciel Cardoso², Josué Moura Romão³ & José Luiz Castro Aguiar Filho¹

RESUMO

A bronquite infecciosa das galinhas (BIG) é responsável por altas perdas financeiras na indústria avícola brasileira. O objetivo desse estudo foi verificar o comportamento dos títulos de anticorpos específicos para o vírus da bronquite infecciosa em poedeiras comerciais de várias empresas avícolas. Os soros foram coletados de 76 lotes provenientes de oito empresas durante o período de junho de 1998 a junho de 2001 no Estado do Ceará. Entre a primeira e a segunda coleta não houve vacinação. As aves das diversas empresas e lotes receberam o mesmo programa vacinal e foram submetidas a duas coletas de sangue (10 amostras/ lote) com um intervalo médio de cinco semanas. Os títulos de anticorpos foram medidos através do teste de ELISA indireto. Para análise dos dados utilizou-se a análise de variância ANOVA e a comparação entre as coletas de sangue o teste *t* de Student com $p < 0,05$. Dos 76 lotes analisados, 19 lotes (25 %) apresentaram um aumento estatisticamente significativo dos títulos na segunda sorologia quando comparada com a primeira, o que é indicativo de desafio a campo.

Descritores: bronquite infecciosa, galinhas de postura, vacinação, ELISA, anticorpos, sorologia.

ABSTRACT

Infectious bronchitis is responsible for high financial losses in the Brazilian poultry industry. The aim of this study was to verify the serology against infectious bronchitis virus in commercial laying hens flocks in the production phase. Serum samples were collected from 76 flocks belonging to eight companies, during the period of June 1998 to June 2001, in Ceará, Brazil. All companies adopted the same vaccination program. Approximately ten samples of blood were collected in each flock. Sample animals in each flock were submitted to two blood collections in an interval of approximately five weeks between collections. No vaccination was performed between the first and the second blood collections. Antibody titers were detected by the indirect ELISA method. Data analysis was carried out by ANOVA, and comparisons among blood collections by the Student's *t*-test ($p < 0.05$). A significant increase in antibody titers to the infectious bronchitis virus in sampled animals was observed in 25% (19/76) of the flocks during the period of study, which indicates a field challenge.

Key words: infectious bronchitis virus, poultry, hens, vaccination, ELISA, antibody titers, serology.

INTRODUÇÃO

A bronquite infecciosa das galinhas (BIG) é a enfermidade que maior prejuízo econômico causa à produção industrial da espécie *Gallus gallus* [11,29]. No Brasil, o agente foi isolado pela primeira vez em 1957 [14]. O agente causador da BIG é um coronavírus [4]. Trata-se de uma enfermidade altamente contagiosa e de rápida disseminação, podendo afetar a produção de frangos de corte, matrizes pesadas e poedeiras comerciais em qualquer idade [1,6,15,21,24,28].

A prevenção da BIG ainda é um problema para a indústria avícola mundial, pois a proteção cruzada contra o desafio com diferentes sorotipos não é eficiente [5,18]. O diagnóstico da BIG pode ser realizado por exames sorológicos, através da detecção de anticorpos séricos contra o VIB [10]. O teste de ELISA, técnica sorológica mais sensível e popular para monitorar lotes [27], detecta a presença de anticorpos contra o VBI no soro, contudo não identifica sorotipos diferentes de um determinado vírus [12,13,16,17].

Estudos sorológicos no Ceará realizados em 1997 em plantéis de frangos de corte e poedeiras comerciais, comprovaram que plantéis vacinados contra a BIG apresentaram sintomatologia clínica com uma dinâmica do perfil de anticorpos indicativo de desafios de campo [2,3].

Este trabalho teve por objetivo, verificar através do teste sorológico de ELISA a detecção de anticorpos contra VBI para avaliar possível ocorrência de desafios de campo de BIG em lotes de postura comercial com presença ou ausência de sintomatologia sugestiva, no Estado do Ceará no período de junho de 1998 a junho de 2001.

MATERIAIS E MÉTODOS

Animais Utilizados

Foram analisadas 1804 amostras de soros obtidas de 76 lotes de poedeiras comerciais em fase de produção com 45 e 50 semanas de idade na primeira e segunda coleta, respectivamente, pertencentes a oito empresas de diferentes regiões do Estado do Ceará. As aves foram criadas sob condições industriais, alojadas em gaiolas suspensas com a densidade de quatro aves por gaiola. Todos os galpões utilizados na pesquisa distavam dos demais 100 metros. Os lotes foram escolhidos de forma a apresentar uma maior uniformidade quanto ao programa de vacinação adotado e a linhagem das aves (Lohmman ou Hy-line), e não

receberam vacinação no intervalo entre a primeira e a segunda coleta.

Os 76 lotes em estudo foram provenientes de oito empresas aqui representadas pelas letras de A a H, e distribuídas cronologicamente da seguinte forma:

Empresas - A: seis lotes (1998); quatro lotes (1999) e quatro lotes (2001); B: três lotes (1998); dois (1999); C: onze lotes (1998); quatro (1999); dois (2000) e três (2001); D: quatro lotes (1998); um (1999) e três (2001); E: oito lotes (1998); quatro (1999); três (2000) e um (2001); F: quatro lotes (1998); G: um lote (1998) e dois lotes (1999) e H: quatro lotes (1998); um (1999) e um (2000).

Programa Vacinal

As aves foram vacinadas contra bronquite infecciosa das galinhas de acordo com o programa descrito na Tabela 1.

Tabela 1. Programa de vacinação empregado nas poedeiras comerciais das oito empresas em estudo no Ceará de 1998 a 2001.

Idade (sem.)	Estirpe	Via aplicação
01	H120	ocular
05	H120	ocular
11	H120	ocular
17	inativada	intra-muscular

Coleta e Análise das Amostras

As aves foram submetidas a duas coletas de sangue com um intervalo médio de cinco semanas entre a primeira e segunda coleta, realizadas às 45 e 50 semanas de idade, respectivamente. Em cada coleta foram obtidas, aproximadamente, dez amostras de sangue de cada lote. O sangue foi obtido através da venopunção aspirativa (0,5 mL/ave) da veia braquial [20,23]. Após a coagulação sanguínea, o soro foi separado, congelado e encaminhado ao laboratório acondicionado em isopor contendo gelo reciclável. No laboratório as amostras foram analisadas através de um Kit comercial de ELISA indireto da empresa Kirkegaard & Perry Laboratories seguindo as recomendações do fabricante.

Análise Estatística

Os dados foram analisados através do Programa Estatístico SAS (SAS, 1995) [22].

Os resultados referentes aos títulos de anticorpos foram submetidos à análise de variância (ANOVA). O fator ou variável independente usada foi a idade de coleta, dentro de cada lote. Os Títulos Médios Geométricos foram calculados utilizando-se os procedimentos padrão [26].

As médias foram comparadas através do teste *t* de Student. Antes da análise, os valores foram transformados em Log (x+1). Os resultados foram representados com Média ± Erro padrão e o nível de significância utilizado foi de 5 %.

RESULTADOS

Os resultados sorológicos das empresas que apresentaram diferença estatística significativa ($p < 0,05$) entre as duas sorologias estão representados na Tabela 2. Estes são expressos em títulos médios geométricos (GMT) em lotes de 45 e 50 semanas de idade, por empresa durante o período de 1998 a 2001, sendo analisados 76 lotes pertencentes a oito empresas, representando um total de 1804 amostras de soros.

A Tabela 2 representa os GMT contra o vírus da bronquite infecciosa das galinhas (VBI), das cinco empresas que apresentaram diferença estatística significativa entre as duas sorologias. A empresa A apresentou quatro lotes com elevação expressiva de títulos entre as sorologias, sendo que os lotes 2 e 3 apresentaram elevação de títulos (de 6620 para 26285 e de 8242 para 23466, respectivamente) na segunda sorologia. Na empresa B apenas um lote apresentou aumento de títulos expressivo (de 697 para 7949). Na empresa C, nove lotes mostraram aumento significativo dos títulos de anticorpos na segunda sorologia. A empresa D apresentou apenas um lote com aumento significativo de títulos na segunda sorologia, sendo este (de 49 para 2693) e a empresa H apresentou quatro lotes com elevação significativa de títulos de anticorpos na segunda sorologia com relação à primeira.

DISCUSSÃO

A administração associada de vacinas vivas atenuadas e vacinas inativadas contra a bronquite infecciosa das galinhas, utilizando a estirpe H120, nas mesmas idades e vias de aplicação, produziu diferentes estados de respostas sorológicas, demonstrados pelos títulos geométricos médios (GMT) entre as empresas analisadas. Os GMT dos lotes que apresentaram diferenças estatísticas significativas entre as

sorologias (primeira e segunda) variaram de 49 a 16514 e de 2693 a 32318 na primeira e segunda sorologia, respectivamente. Das oito empresas analisadas, cinco (63,25 %) empresas (A, B, C, D e H) apresentaram diferença estatística significativa nos títulos individuais entre a primeira e a segunda sorologia, com elevação dos títulos em 19 lotes.

Cinco empresas apresentaram diferença estatística significativa entre a primeira e a segunda sorologia, mostrando elevação dos títulos na segunda sorologia em relação à primeira e neste intervalo não houve estímulo vacinal, o que pode indicar desafio de campo [7,9,19].

Os níveis de anticorpos geralmente se elevam após um desafio de campo pelo vírus da bronquite infecciosa das galinhas [11]. Durante o período estudado a empresa A apresentou quatro lotes dos 14 analisados com diferença estatística significativa entre os títulos da primeira e segunda sorologia o que sugere desafio de campo em 28,57 % dos lotes da referida empresa. A empresa B apresentou, durante o período estudado, um lote em cinco analisados com diferença estatística significativa entre os títulos da primeira em relação à segunda sorologia sugerindo desafio de campo em 20 % dos lotes avaliados da referida empresa. A empresa C apresentou nove lotes em 20 analisados com diferença estatística significativa entre os títulos da primeira e da segunda sorologia o que sugere desafio de campo em 45 % dos lotes avaliados. A empresa D apresentou um lote dos oito analisados com diferença estatística significativa entre os títulos da primeira e da segunda sorologia sugerindo desafio de campo em 12,5 % dos lotes avaliados da referida empresa. A empresa H apresentou dos seis lotes analisados, quatro lotes com diferença estatística significativa entre os títulos da primeira em relação à segunda sorologia o que sugere desafio de campo em 66,66 % dos lotes avaliados da referida empresa durante o período avaliado.

Estas diferenças são sugestivas de desafio de campo por vírus da bronquite infecciosa das galinhas [19,28]. O aumento nos títulos entre duas análises, sem vacinação entre elas, pode ocorrer em função de uma vacinação recente ou desafio de campo com consequente estímulo antigênico [6,8]. Títulos de 10000 ou maiores em poedeiras ou reprodutoras em produção, que não receberam vacinas inativadas, podem ser interpretadas como desafio de campo [25].

Apesar das oito empresas avaliadas utilizarem o mesmo programa vacinal, com as mesmas estirpes,

Tabela 2. Títulos de anticorpos contra o vírus da bronquite infecciosa das galinhas mensurados pelo teste de ELISA dos lotes de poedeira comercial das cinco empresas que apresentaram diferença estatística significativa, analisadas no período de junho de 1998 a junho de 2001 no Estado do Ceará.

Empresas	Lote	Idade (semanas)	
		45	50
Média geométrica dos títulos (GMT)			
A	1*	84	4463
	2*	6620	26285
	3*	8242	23466
	4*	90	4463
B	1*	697	7949
C	1*	15566	35902
	2*	10828	21487
	3*	16514	27418
	4*	1067	6226
	5*	440	9462
	6*	113	9191
	7*	11514	32318
	8*	5206	30854
	9*	195	4726
D	1*	49	2693
H	1*	8585	13409
	2*	11789	19844
	3*	9550	12623
	4*	304	4620

* = diferença significativa ($P < 0,05$) entre as sorologias.

vias de aplicação e na mesma idade de vacinação das aves, as respostas sorológicas foram diferentes e com elevado grau de variação. Este fato pode ser explicado por falhas na vacinação, armazenamento inadequado da vacina antes da sua aplicação, surgimento de estirpes variantes, a má qualidade da água e elevados desafios de campo por VBI nas empresas avícolas [5].

O surgimento de estirpes variantes pode ser explicado por alguns autores que acreditam que a recombinação sofrida pelo VBI é uma forma importante do surgimento de novas amostras geneticamente distintas no ambiente avícola nacional, como consequência talvez e principalmente, da vacinação em múltiplas datas não uniformes em lotes próximos, em granjas ou áreas de alta densidade avícola [4].

CONCLUSÕES

Através deste trabalho foi possível verificar que das oito empresas de postura comercial, analisa-

das no período de junho de 1998 a junho de 2001, cinco empresas (62,5%) apresentaram resultados sorológicos através do teste ELISA compatíveis com desafio a campo com o vírus da bronquite infecciosa das galinhas, com elevação dos títulos na segunda sorologia em relação à primeira, com diferença estatística significativa onde $p < 0,05$ e que dos 76 lotes analisados, 19 (25%) apresentaram um aumento estatisticamente significativo dos títulos entre as sorologias, o que é indicativo de desafio de campo por estirpe vacinal ou selvagem.

AGRADECIMENTO

Agradecemos à indispensável colaboração do Professor Doutor Davide Rondina nas análises estatísticas.

REFERÊNCIAS

- 1 **Butcher G.D., Winterfiel R.W. & Saapiro D.P. 1990.** Pathogenesis of H13 nephropathogenic infectious bronchitis virus. *Avian Disease*. 34: 916-921.
- 2 **Cardoso W.M. & Posso G.S. 1997.** Levantamento sorológico de bronquite infecciosa em frangos de corte no Estado do Ceará, no período de julho de 1996 a junho de 1997. In: *Anais do III encontro de Pesquisadores da UECE* (Fortaleza, Brasil). p.181.
- 3 **Cardoso W.M. & Salles R.P.R. 1997.** Levantamento sorológico de bronquite infecciosa pelo teste de ELISA, em poedeiras comerciais no Estado do Ceará. In: *Anais do III encontro de Pesquisadores da UECE* (Fortaleza, Brasil). p.182.
- 4 **Cardozo R.M., Martins N.R.S., Resende J.S., Resende M., Teixeira A.A.P., Jorge M.A., Souza M.B. & Epiphany E.O.B. 2001.** Proteção e caracterização de anticorpos monoclonais contra o vírus da bronquite infecciosa das galinhas. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*. 53: 162-174.
- 5 **Cook J.K.A. 1997.** Bronquite infecciosa: Situação mundial, regional e tipificação. In: *Simpósio sobre sanidade avícola. Conferencia APINCO '97* (São Paulo, Brasil). pp. 13-27.
- 6 **Cook J.K.A. 1999.** Diagnostico de la bronquitis infecciosa. In: *XVI Congreso latinoamericano de aviculture* (Lima, Peru). pp. 25-29.
- 7 **Cook J.K.A. 1984.** The classification of new serotypes of infectious bronchitis virus isolated from poultry flocks in Britain between 1981 and 1983. *Avian Pathology*. 13: 733-741.
- 8 **Cubillos A., Ulloa J., Cubillos V. & Cook J.K.A. 1991.** Characterization of strains of infectious bronchitis virus isolated in Chile. *Avian Pathology*. 20: 85-89.
- 9 **Davelaar F.G., Kouwenhoven B. & Burger A.G. 1984.** Occurrence and significance of infectious bronchitis virus variant strains in egg and broiler production in The Netherlands. *Veterinary Quartely*. 6: 114-120.
- 10 **Gelb J.J. 1989.** Infectious bronchitis. In: Purchase H.G., Arp L.H., Domermuth C.H & Pearson J.E. (Eds). *A Laboratory Manual for Isolation and Identification of Avian Pathogens*. 3rd edn. Kennet Square: American Association of Avian Pathologists, pp. 124-127.
- 11 **Gelb J.J., Nix W.A. & Gellman S.D. 1998.** Infectious bronchitis virus antibodies in tears and their relationship to immunity. *Avian Disease*. 42: 364-374.
- 12 **Gelb J.J., Wolff J.B. & Moran C.A. 1991.** Variant serotypes of infectious bronchitis virus isolated from commercial layer and broiler chickens. *Avian Disease*. 35: 82-87.
- 13 **Gough R.E., Randall C.J., Dagless M., Alexander D.J., Cox W.J. & Pearson D. 1992.** A new strain of infectious bronchitis virus infecting domestic fowl in Great Britain. *Veterinary Record*. 130: 493-494.
- 14 **Hipólito O. 1957.** Isolamento e identificação do vírus da bronquite infecciosa em galinhas no Brasil. *Arquivo da Escola de Veterinária - UFMG*. 10: 131-135.
- 15 **Ito N.M.K. 1998.** Bronquite Infecciosa das Galinhas. In: *Anais do Simpósio de Sanidade Avícola* (Fortaleza, Brasil). pp. 12-18.
- 16 **Jia W., Karaka K., Parrish C.R. & Naqi S.A. 1995.** A novel variant of avian infectious bronchitis virus resulting from recombination among three different strains. *Archives of Virology*. 140: 259-71.
- 17 **Karaka K., Naqi S.A., Palukaitis P. & Lucio B. 1990.** Serological and molecular characterization of three enteric isolates of infectious bronchitis virus of chickens. *Avian Disease*. 34: 899-904.
- 18 **Koch G., Kant A. & Cook J.K.A. 1991.** Epitopes of neutralizing antibodies are localized within three regions of the S1 spike protein of infectious bronchitis virus. In: *International Symposium of Infectious Bronchitis*, 2. Rauschholzhausen. *Anais Germany: World Veterinary Poultry Association*. pp. 154-160.
- 19 **Kouwenhoven B. & Davellar F.G. 1989.** The use and significance of AGP, VN and HI test in serological monitoring of VBI infection and vaccination. In: *III Seminario Internacional de Patologia y Producción Aviar* (Santiago, Chile). pp. 121-130.
- 20 **Mockett A.P.A., Cook J.K.A. & Higgins M.B. 1987.** Maternally-derived antibody to infectious bronchitis virus its detection in chick trachea and serum and its role protection. *Avian Pathology*. 16: 407-416.
- 21 **Nakamura K., Imai K. & Tanimura N. 1996.** Comparison of the effects of the infectious bronchitis and infectious laryngotracheitis on the chicken respiratory tract. *Journal of Comparative Pathology*. 114: 11-21.
- 22 **SAS Institute. 1995.** JMP Statistics and graphics Guide. Ver. 3.1. Cary: SAS Institute Inc. Release 6.12.

- 23 **Thompson G., Hussni M., Bauman B. & Naqi S. 1997.** Systemic and local antibody response to infectious bronchitis virus in chickens inoculated with infectious bursal disease virus and control chickens. *Avian Disease*. 41: 519-527.
- 24 **Tottori J., Yamaguchi R., Murakawa Y., Sato M., Uchida K. & Tateyama S. 1997.** Experimental production of ascites in broiler chickens using infectious bronchitis virus and *Escherichia coli*. *Avian Disease*. 41: 214-220.
- 25 **Villegas P. & Avellaneda G.E. 1992.** Intrepretacion de resultados serológicos em bronquitis infecciosa. In: *Avicultura Professional*. 10: pp. 21-23.
- 26 **Villegas P. & Purchase H.G. 1989.** Titration of biological suspensions. In: Purchase H.G., Arp L.H., Domermuth C.H & Pearson J.E. (Eds). *A Laboratory Manual for Isolation and Identification of Avian Pathogens*. 3rd edn. Kennet Square: American Association of Avian Pathologists, pp. 86-191.
- 27 **Wang C.H., Hong C.C. & Seak J.C.H. 2002.** An ELISA for antibodies against infectious bronchitis virus using a S1 spike polypeptide. *Veterinary Microbiology*. 85: 333-342.
- 28 **Wang C.H., Hsieh M.C. & Chang P.C. 1996.** Isolation, pathogenicity and H₁₂₀ Protection Efficacy of Infectious Bronchitis Viruses Isolated in Taiwan. *Avian Disease*. 40: 620-625.
- 29 **Wu Q.Z., Yang Q.W., Fu C., Zhao X.Y. & Ignjatovic J. 1998.** Antigenic and immunogenic characterization of infectious bronchitis virus strains isolated in China between 1986 and 1995. *Avian Pathology*. 27: 578-585.

