

Bronquite Infecciosa: soluções para os problemas atuais

Iara Maria Trevisol
Embrapa Suínos e Aves – Concórdia – SC
iara.trevisol@embrapa.br

Preciso iniciar fazendo uma pergunta: os problemas com Bronquite Infecciosa são atuais?

Façamos um exercício, buscando relatos preciosos da história da Bronquite Infecciosa no Brasil que poucos conhecem.

Os dados a seguir, foram literalmente copiados da Monografia intitulada: *Bronquite Infecciosa das Galinhas – A doença no Brasil* – construída e apresentada para concorrer ao então Prêmio Dow de Veterinária, em sua terceira edição, e que foi agraciado com o prêmio.

O trabalho inicia com ampla revisão científica da Bronquite Infecciosa (BI) no mundo. São 527 artigos que abrangem todos os aspectos da virose, até 1979.

A segunda etapa do trabalho é dedicada aos estudos da BI no Brasil:

1º diagnóstico foi em 1957, na Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais. Foi tese de doutorado do Dr. Osmane Hipólito:

- *“A Bronquite no Brasil foi “caçada”, ainda que não houvesse nenhuma indicação segura de sua presença entre nós.”*
- *“O aparecimento da BI no Brasil não se deu da maneira usual, com sintomatologia clássica e mortalidade em pintinhos.*
- *A BI surgiu como uma infecção suave, de sintomatologia branda e praticamente sem mortalidade, tanto que, a época alguns duvidaram da sua existência e do real significado econômico desta enfermidade para o país”.*

1960: Hipólito, Godoy e Muth: microscopia eletrônica para confirmar as características do vírus encontrado.

1963: Hipólito e Godoy: estudos sobre a disseminação da doença.

1973: Hipólito, Bottino e Pinto: síndrome nefrite-nefrose (SNN). Foi isolado vírus a partir de tecido renal.

1973: July, JR & Hipólito O.: Considerações sobre o caso de SNN.

1975: Solis, J.: Incidência da BI no Brasil: pesquisa de anticorpos nas regiões Nordeste e Centro-Sul: 75% e 63,3% respectivamente, de amostras positivas para BI.

1978: Herédia SAM, Oliveira RL & Lopez ZM: estudo sorológico:
- 11 plantéis de reprodução, aproximadamente 1 milhão de reprodutores,
- 9 linhagens,

- triângulo Mineiro, Metalúrgica, Mata e Alto São Francisco;
- setembro a dezembro de 1977;
- 442 soros e 46 suabes de traqueias analisados;
- 100% de prevalência; não houve isolamento viral, não houve influência aparente de linhagem ou localização geográfica.

1978: Hsiung HM, Hipólito, O e Silva E.N: novo estudo de prevalência:

- 475 amostras de soro de diferentes regiões do país;
- diferentes explorações avícolas: poedeiras, reprodutoras e frangos de corte;
- 66,55% das amostras positivas;
- somente em Bastos/SP, 92% dos soros estavam positivos, havendo sérias indicações de vacinação, apesar do uso não estar ainda autorizado no Brasil.

1978: Lamas da Silva JM: publica uma revisão sobre a doença.

1979: Lamas da Silva JM, Hwang MH e Cesaro AJ.: aspectos clínicos e anatomopatológicos da SNN: 6 granjas de Minas Gerais e SP;

- 300 mil frangos de corte; idade entre 15 e 45 dias; mortalidade de 4 a 15%;
- principais sinais clínicos: cama com aspecto úmido, mortalidade brusca, por 5 a 7 dias, cianose de crista e da barbela e diarreia branco-leitosa.
- sorologia negativa no momento do surto e positiva 3 semanas após;
- lesões renais: achados constantes:
 - órgão aumentado 2 a 3 vezes o seu volume normal;
 - friável;
 - com conteúdo branco-leitoso.
- isolamento positivo (rins): embriões com depósito de uratos nos mesonefros.

➤ A partir destes trabalhos, os professores e pesquisadores reuniram-se com a Divisão de Defesa Sanitária Animal (DDSA), para avaliar a situação da bronquite infecciosa das galinhas no Brasil. Neste encontro, em 10 de maio 1977, o grupo concluiu que a doença apresenta importância sanitária para a avicultura nacional, e recomendam:

- 1º) Que seja introduzida a vacinação contra bronquite infecciosa aviária no Brasil;
- 2º) Que seja constituído um grupo de Trabalho permanente para estudar e assessorar o órgão oficial de Defesa Sanitária Animal nas atividades de profilaxia da bronquite infecciosa das galinhas a serem adotados no país;
- 3º) Que seja autorizada a importação de dois milhões de doses de vacina contra bronquite infecciosa das galinhas, em caráter emergencial, vírus vivo, amostra Massachusetts clássica;
- 4º) Que o Ministério da Agricultura propicie recursos para que os estudos e pesquisa do grupo de trabalho continuem;
- 5º) Que seja consultada a indústria nacional sobre suas possibilidades de produzir vacina contra bronquite infecciosa das galinhas, no menor tempo possível.

Em 13 de maio de 1977, é criado através da Portaria 003 do DDSA o grupo de trabalho permanente para bronquite infecciosa das galinhas, a fim de estudar e propor medidas destinadas ao diagnóstico e à profilaxia da BI.

Constituem o grupo:

Osmane Hipólito	Faculdade de Med Vet e Zoot - USP
José Maria Lamas da Silva	Escola de Veterinária - UFMG
Renato Augusto da Silva	Escola de Vet - UFRJ e Minist. da Agricultura
Mário Nakano	Instituto Biológico - Estado de São Paulo
Margarida Maria Lopes Lima	CATI – Secretaria de Agricultura do Estado de São Paulo
Domingos IsoldiPinkoski	Ministério da Agricultura
Eunio Ney Teixeira	Ministério da Agricultura
Luiz Oliveira e Silva Sobrinho	Ministério da Agricultura
Décio de Araújo Lyra	Ministério da Agricultura

Em 28 de junho de 1977 ocorre a 1ª reunião oficial do grupo de trabalho, com a seguinte pauta: 1) Importação da amostra vacinal; 2) Produção de vacina; 3) Normas de controle; 4) Controle de produção; 5) Áreas, granjas e tipos de exploração, onde a vacina será aplicada; 6) Controle da comercialização e da aplicação; 7) Programa de vacinação; 8) Laboratórios de diagnóstico e de controle.

Fica deliberado:

1. O Ministério da Agricultura deverá importar amostra vacinal tipo Massachusetts clássica (suave) para produção da vacina no país. É proposto também que a DDSA solicite aos pesquisadores e suas Instituições as amostras de campo isoladas.

2. Sete laboratórios se interessam pela produção da vacina: Fama, Salsbury, Leivas Leite, Vallé, Prado, Rhodia Mérieux, BioVet.

Ao Ministério caberá fornecer as amostras vacinais, a amostra de vírus de desafio e a apresentação das normas para controle da produção e da comercialização, cabendo aos laboratórios interessados buscar a tecnologia e mão de obra especializada necessária.

3 e 4. Dr. Renato Augusto da Silva propõe que a minuta dessas normas seja elaborada pelo Dr. Décio de Araújo Lyra e Dr. José Maria Lamas da Silva, que posteriormente seja colocada para apreciação dos demais membros.

5 e 6. A vacinação será voluntária e controlada pelo Ministério da Agricultura, em nível estadual; deverá ser instituída norma específica para esse fim; veterinários indicados pelos Estados, que estarão envolvidos nos trabalhos do controle da doença deverão receber cursos sobre BI.

7. Em áreas reconhecidas como sujeitas a altos riscos e/ou em plantéis que apresentem complicações com micoplasmose aviária:

- idades para vacinar: 4 dias; 12 a 14 dias; 12 a 15 semanas.
- vias de aplicação: ocular; nasal; água de bebida, nebulização.

Em áreas reconhecidamente livres de risco e/ou em plantéis livres de micoplasmose aviária:

- idades para vacinar: 12 a 14 dias; 12 a 15 semanas.
- vias de aplicação: ocular; nasal; água de bebida, nebulização.

Não será recomendada vacinação para frangos de corte.

8. O grupo conclui pela necessidade da DDSA efetuar levantamento nos estados de SP, RS, PR, MG, PE e RJ para identificar laboratórios que poderiam efetuar diagnóstico da BI e funcionar como laboratórios de triagem.

Fica deliberado também que em BH, RJ e SP serão instalados os laboratórios destinados a proceder ao controle das vacinas produzidas.

Fica deliberado, ainda, que nas próximas reuniões do Grupo de Trabalho, seja convidado um representante da Embrapa, a fim de possibilitar a participação daquela empresa nos trabalhos de pesquisa, objetivando o isolamento e tipificação de material de campo.

Nada mais havendo, o Sr. Presidente do Grupo de Trabalho para BI encerrou a reunião.

Dia 12 de setembro de 1977, acontece a segunda reunião do Grupo de Trabalho para BI:

Dr. José Maria Lamas da Silva relata sobre a elaboração da minuta das normas destinadas ao controle da produção, da comercialização e do uso da vacina para BI.

Cada membro deve estudar e remeter a DDSA suas considerações.

Ficou determinado que o Laboratório de Medicina Preventiva da USP será responsável pelo isolamento e identificação das amostras de vírus.

Este laboratório também é responsável pelo treinamento do pessoal técnico.

O Laboratório do Instituto de Veterinária da UFRJ será responsável pelo controle de qualidade das vacinas produzidas.

Amostras de vírus de campo:

Dr. José Maria Lamas da Silva coloca que, em resposta a solicitação da DDSA, colocou a disposição do Grupo de Trabalho, 2 amostras de vírus e que outras 2 estariam sendo trabalhadas.

Dr. Osmane Hipólito informa que dispõe de 5 amostras e outras 2 estariam sendo trabalhadas.

Fica deliberado que as amostras ficarão sob a guarda do Dr. Osmane Hipólito, devendo ser fornecidas ao Dr. Renato Augusto da Silva para uso no laboratório de controle.

Discute-se a proposta de um curso sobre BI para 10 a 20 de outubro, com a possibilidade da presença do Dr. Hitchner.

Ficou deliberado que seria solicitado a Fundação de Estudo e Pesquisa em Medicina Veterinária Preventiva, da UFMG, um projeto de curso sobre as Doenças Respiratórias das Aves, com destaque para a BI.

Nada mais havendo, o Sr. Presidente do Grupo de Trabalho para BI encerrou a reunião.

A monografia vencedora do Prêmio Dow, termina com as Normas para a produção, controle e emprego de vacinas contra a BI.

No verso da impressão desta monografia encontra-se este texto:

Prêmio DOW de Veterinária: com este prêmio, a DOW Química S.A. pretende patentear seu reconhecimento à contribuição da classe Médica-Veterinária, no campo da pesquisa científica no Brasil.

O prêmio DOW de Veterinária é constituído de uma quantia em dinheiro, equivalente a 50 salários mínimos vigentes na região de SP durante a época da entrega, placa de prata comemorativa e a impressão de uma edição do trabalho vencedor.

- **Em 1979**, o Ministério da Agricultura aprova e licencia a importação e a produção local de vacina viva contra a BI, com amostras H120 e H52, sorotipo Massachusetts, para uso em todo o país.
- **Em 1980**, as vacinas inativadas contendo a mesma amostra são introduzidas no país.

Nessa época, as atividades de pesquisa em sanidade avícola, no Centro Nacional de Pesquisa em Suínos e Aves (CNPSA) - Embrapa Unidade de Concórdia em SC, estavam iniciando, a equipe de empregados e colaboradores estava sendo treinada e os laboratórios equipados. A Unidade dispunha de bolsas de iniciação científica da Embrapa e do CNPq. Médicos Veterinários, Biólogos e profissionais convidados do Instituto Interamericano de Cooperação para a Agricultura (IICA), compunham o quadro de pesquisadores.

No setor de virologia, iniciavam os estudos sobre a enfermidade denominada, bronquite infecciosa das galinhas (BIG), doença respiratória aguda, altamente contagiosa causada por um coronavírus. Nesse estudo iniciam-se os isolamentos de amostras brasileiras (Wentz, 1990; 1991). Em continuidade aos estudos, foi determinada a relação antigênica entre diferentes amostras do vírus isoladas no Brasil e amostras de referência. Os testes sorológicos evidenciaram que algumas amostras diferiam da amostra clássica Massachusetts. Iniciam as discussões sobre possíveis falhas vacinais (Wentz 1992).

1992: Wentz, et al.:

- 14 amostras isoladas: PR, SC e SP;

- 14 amostras sorotipificadas:

- 2 grupos: 3 amostras semelhantes a Beaudette e 11 amostras diferentes da Beaudette e semelhantes entre si, mas não com Arkansas.

Necessidade de testes de proteção cruzada.

1992: Di Fábio: Bronquite infecciosa das galinhas: vacinar frangos?

- VBI no Complexo Respiratório ou Síndrome Respiratória do frango e SNN.

- VBI corresponde a 60% dos agentes envolvidos com problemas respiratórios;

- 14 casos de SHS, 8 foram detectados VBI;

- Fatores predisponentes: ambientais, microrganismos oportunistas, outros agentes respiratórios e a combinação destes fatores;

- Reações vacinais dependentes das diferenças no grau de atenuação e patogenicidade entre vacinas H120 disponíveis;

- Decisão de vacinar ou não frangos de corte: ... levar em conta a avaliação técnica do problema quanto ao nível de comprometimento dos lotes afetados,

número de lotes afetados dentro da região, presença ou não de sintomas clínicos, isolamento do agente ou sorologia confirmatória e lesões macro e microscópicas; além disso, as características de transmissão e sobrevivência do agente no meio ambiente e sua alta sensibilidade a maioria dos desinfetantes.

- A cepa H120, altamente atenuada e a possibilidade de cepas variantes coexistindo, preocupam quanto a eficácia da proteção em problemas sanitários em que o VBI esteja envolvido.

1998: Martins et al.: cultivo de anéis de traquéias (CAT) para tipificar amostras:

- 02 referências: M41 (Mass) e A5468 (Connecticut);
- 04 isolados de campo: 03= Mass e 1 não Mass, não Conn.

1998: Lunge et al.: análise molecular de 5 amostras de campo isoladas de casos clínicos respiratórios e/ou renal da região Sul;

- cepas de referência: Delaware 072, Flórida, Gray, Connecticut, Arkansas, Mass Europa (H120, H90 e H52) e Mass EUA (M41).
- amostras do Brasil: um único grupo distinto das amostras européias e americanas, denominadas *Simbios B1*.

❖**2000:** Di Fábio, et al.: 126 casos de campo investigados de doença respiratória, digestiva e/ou renal: maio a dezembro de 1995:

- SP, RJ, PR, SC, BA e RO;
- 15 amostras: frangos de corte (11), poedeiras (2), matriz de corte (1) e codorna (1);
- 4 amostras isoladas: patogênica para traquéias;
- sorotipificação (CAT) de 14 amostras: 5 grupos antigênicos diferentes: 1 Mass e outros 4 semelhantes entre si e diferentes dos sorotipos descritos em outros países;
- proteção *in vivo*: 4 grupos antigênicos: diferentes entre si e entre outros isolados de outros países.
- vacina Massachusetts (MA5) no 1º dia: protegeu muito bem contra o desafio com 3 de 4 isolados;
- A vacina 4-91, licenciada para uso em muitos países mas não no Brasil, *mostrou-se também eficaz* e particularmente o uso de um programa vacinal incorporando ambas vacinas.
- Uma nova vacina de BI não é requerida para cada novo sorotipo descrito.
- Confirma o valor do conceito de protectotipos com relação à proteção de BI.

❖**2001:** Souza, MB, Martins NRS & Resende JS: MG: 1972 a 1989:

- 14 isolados de surtos de BI em granjas com problemas respiratórios e renais;
- plantéis não vacinados: 14 de frango de corte e 1 de poedeiras;
- Elisa com anticópos monoclonais (AcMs) para S1 da amostra M41=
 - 03 amostras Mass e 11 não Mass.
- As amostras vacinais H52 e H120 classificadas, de acordo com a literatura, no sorotipo Massachusetts não foram detectadas pelos AcMs contra M41, indicando diferenciação antigênica em S1.
- O resultado permitiu especular que as amostras vacinais não tenham induzido, na prática, uma boa imunização contra algumas amostras de VBI de campo, ainda que do mesmo sorotipo.

- Algumas das amostras de campo provavelmente são oriundas de variantes surgidas a partir de amostras vacinais, H120 e H52, e podem estar antigenicamente mais próximas destas do que da M41.

- A detecção de amostras antigenicamente relacionadas à amostra M41 suscita a hipótese de que o mecanismo de preservação desse padrão antigênico mantém alguma correlação com *bestfit* de modelação molecular de S1 e o respectivo receptor celular. Amostras de VBI evolutivamente mais adaptadas, por exemplo M41, podem apresentar vantagem evolutiva que está sendo preservada apesar do longo período desde a sua descrição.

❖ **2002:** Epiphany, E.O.B et al.: Validação da técnica de SN em CAT:

- 04 isolados de surtos de BI de granjas com problemas respiratórios e renais, em MG testados por SN cruzada;

- amostras de referência: Mass: M41, H52, H120 e Connecticut (A5968);

- 03 amostras foram consideradas homologas da Mass;

- 01 amostra não Mass e não Connecticut;

- H120 não neutralizou M41!

- O processo de atenuação de VBI para o desenvolvimento de vacinas, resultado da adaptação do isolado original em embriões, seleciona mutantes que, mais adaptados à este sistema, possuem diferenças em regiões da glicoproteína S1 que também determina o sorotipo.

Essas diferenças podem estar sendo detectadas na prova de SN, uma vez que o soro específico contra M41 não neutralizou H120.

- A classificação dos isolados brasileiros pelo CAT deve contribuir para o conhecimento do universo antigênico local e assim subsidiar a elaboração de programas de controle mais eficazes, seja pela utilização de vacinas específicas ou mesmo a produção de vacinas autóctones.

2005: Brentano, et al.: amostra sorotipo 4/91 – 793B no Brasil?

- 3 amostras de matrizes pesadas;

- isolamento viral e PCR positivos;

- houve reprodução da doença nas formas respiratória e renal;

- não houve reprodução de lesões musculares.

- Especula-se que a miopatia pode ser o resultado da deposição de imunocomplexos na parede dos capilares que irrigam o músculo peitoral. Porém, a patogenia desse tipo de lesão ainda não foi confirmada.

❖ **2005:** Pena, L.J.et al.: revisão: na avicultura industrial mundial, o controle da BI tem sido feito, com relativo sucesso, pela combinação de medidas básicas de biossegurança (isolamento, higiene, lotes com idade única, controle de trânsito de veículos e pessoas, *all-in-all-out* e *vazio sanitário*), que incluem programas de vacinação desenvolvidos de acordo com a região ou país (Villegas,1997; Hoerr *et al.*, 1999; Resende, 2003; Bernardino,2004).

- As vacinas atenuadas de sorotipos variantes somente devem ser utilizadas em áreas onde este tipo de vírus for responsável por grandes perdas econômicas e, após a sua completa caracterização, pois há o risco de se introduzir um novo sorotipo na região, bem como a ocorrência de recombinação genética entre os diferentes sorotipos, gerando uma nova variante, que pode ter consequências desastrosas para a avicultura (Di Fabio,

1992; Martins, 1992; Di Fabio & Rossini, 2000; Rocha 2000; Resende, 2003; Di Fabio, 2004).

- A elaboração de vacinas autógenas inativadas para ser utilizadas em aves de vida longa tem sido sugerida por alguns autores para o controle da BI nos casos de identificação e caracterização de amostras variantes que não sejam neutralizadas pela vacina do sorotipo liberado para uso no país (Di Fabio, 1992; Martins, 1992; Di Fabio & Rossini, 2000; Rocha 2000; Resende, 2003; Di Fabio, 2004).

❖ **2006:** Abreu, et al.: em MG: 15 isolados entre 1972-1999:

- 14 de frangos de corte; 01 de poedeiras;
- PCR para gene "N":
 - 4 amostras Mass,
 - 11 distintos: variantes genéticas regionais.
- Todos os isolados são distintos dos previamente estudados na Europa, Estados Unidos e Austrália, incluindo as cepas de vacinas comerciais.
- Além disso, os isolados apresentaram grande diversidade genética, independentemente da data de isolamento, antes e após a adoção oficial de vacinação no Brasil (1980), indicando a exclusividade geográfica e evolução natural do VBI, reforçando a necessidade de avaliação de isolados locais para o desenvolvimento de vacina.

2006: Pereira et al: teste de proteção cruzada: ciliostase, recuperação viral e lesões microscópicas;

- *não houve lesão significativa do epitélio traqueal;*
- resultados de histopatologia de traquéia corroboraram com ciliostase;
- *presença de lesões microscópicas nas gônadas: 2 fêmeas e um macho estudados;*
- nas aves vacinadas (H-120) e desafiadas: não foram encontradas alterações histopatológicas tanto em ovário, como nos testículos = mesmo prototipo.
- Considerando-se esses fatores, para estirpes que não possuem tropismo respiratório, *o re-isolamento viral deve ser muito mais indicativo da proteção ao desafio do que as técnicas de ciliostase e histopatologia da traqueia.*

❖ **2007:** Villarreal et. al.: VBI associado à orquite e infertilidade em machos:

- granja de avós;
- 06 galos de 57sem: traqueias, pulmões, rins e testículos;
- PCR: todos tecidos positivos para VBI; testículos positivos para MPV;
- isolamento (pool de testículos em embriões de 9-10 dias via CA):
 - positivo para VBI; negativo para MPV;
- análise filogenética do pool:
 - próxima a amostra Européia D274; as americanas Cal99 e Arkansas e amostras de campo da China, Korea e Espanha;
 - distante de: Mass, Connecticut, DE072 e 793B.
- IBV e MPV podem estar envolvidos;
- testes de reprodução da doença são necessários para estabelecer a associação.

2007: Trevisol, et. al.: testes *in vivo* com amostra oriunda de caso de miopatia:

- houve reprodução de doença respiratória;

- não houve reprodução de miopatia;
- houve proteção em 80% das aves (1dose H120) e 58% com 2 doses (?);
- recuperação viral em todos os grupos vacinados (?).

❖ **2007:** Villarreal, et. al.: VBI associado à diarreia:

- 2002 a 2006: 17 granjas de frangos (10 de SP, 1 do PR) e 1 de poedeiras (RS); outras 05 (?) com idade entre 8 a 42 dias;
- sem vacinação para VBI, exceto a granja do RS e uma de SP;
- histórico de problemas entéricos: diarreia, queda do estado geral, retardo de crescimento e aumento da taxa de conversão alimentar;
- sem sinais respiratórios ou reprodutivos evidentes.
- Nenhuma melhoria após tratamentos antibacterianos ou anticoccidianos;
- pool de conteúdo entérico de 5 aves cada granja;
- pool de tecido respiratório e renal de 5 aves cada granja;
- pool de conteúdo entérico de 10 granjas sem problemas entéricos;
- PCR para VBI e astrovírus; PAGE para rotavírus e reovírus;
- isolamento para amostras PCR/VBI+ (embriões de 10 dias via CA):
 - análise filogenética para VBI:
- 18 pools de conteúdo entérico: +s para VBI/PCR e
- negativos para rotavírus, astrovírus e reovírus;
- 18 pools de conteúdo resp. e renal: negativos para VBI;
- pools de conteúdo entérico de granjas sem problemas: negativos para todos os vírus pesquisados no estudo;
- 18 pools de conteúdo entérico: positivos para VBI/isolamento;
- 11 amostras: fragmento de 706pb da S1 do VBI: análise filogenética:
 - 11 amostras formaram um único grupo, próximo da amostra Européia D274; distante da Mass, da 4/91 (793B) e de outras amostras detectadas no mundo todo.
-as cepas do VBI detectadas foram a causa da doença entérica?
- Se foram, representam uma variante emergente importante?
- Considerando exemplos de evolução de certos coronavírus, o fato de que nas amostras pesquisadas nenhum outro vírus entérico foi encontrado, que as bactérias e protozoários podem ser desconsiderados como agentes etiológicos, e que não foi detectado VBI nas amostras entéricos de granjas sem problemas entéricos, pode-se especular que as estirpes de VBI detectadas tenham participado ou mesmo sejam o agente principal da doença entérica.
- Mais estudos precisam ser realizados para testar essa hipótese.
- A presença de genótipos variantes de VBI em granjas avícolas do Brasil tem sido demonstrada e pode ser a causa de frequentes surtos da doença, uma vez que o método de controle baseado na vacinação monovalente com o sorotipo Massachusetts é ineficaz.

2007: Chacón et al.: frequência de apresentação e distribuição de variantes:

- período: 2004-2006;
- granjas: 44 de matrizes; 62 frangos; 12 de postura.
- 118 casos clínicos positivos por PCR;
- alvos da PCR: *cepas vacinais: H120, D274 e 793B;*
- se negativo para estas referências = tipo variante;
 - Resultados: 88/118 amostras tipo variante;

- As cepas do VBI associados a quadros clínicos infecciosos são diferentes dos *sorotipos vacinais usados comercialmente* (74,5%) (??);
- As amostras variantes foram detectadas principalmente no Sul e Sudeste;
- 9 casos em matrizes e 3 casos em frangos: associadas a lesões de peito;
- variantes estão amplamente distribuídas em granjas comerciais, associadas a diferentes sintomatologias clínicas.

❖ **2008:** Montassier, M.F.S. et al:

- 12 amostras de vírus de frangos de corte e poedeiras (SC, PR e SP);
- 8 amostras de casos respiratórios; 4 amostras de problemas renais;
- método: PCR e RFLP;
 - 5 genótipos diferentes do vírus: 1 Mass e outros 4 diferentes entre si;
 - confirma a grande variabilidade genética de VBI no campo.

❖ **2009:** Mendonça, et al.: ampla revisão.

- A BI é uma doença endêmica no Brasil, permanecendo como problema econômico importante para a avicultura, apesar das tentativas de controle por vacinação.
- Os surtos no país têm ocorrido com frequência e com a emergência de novas variantes do vírus.
- As vacinas atenuadas devem ser usadas com cautela e, quando necessária, deve-se assegurar a adoção de estratégias de aplicação que reduzam a emergência de variantes por conta de reversão de virulência, como a unificação do manejo que permita um cronograma de vacinação regional simultâneo.
- A melhoria na biossegurança e a uniformização de plantéis e de manejo são práticas essenciais que podem trazer grandes vantagens no controle da BI.

❖ **2010:** Montassier, H.J. :

- Mutações e recombinação estão envolvidas nas variações genética e fenotípicas de vírus RNA, levando ao surgimento de novas estirpes variantes, como ocorre com o VBI.
- A consequência é o surgimento contínuo de novas variantes: sorotipos, patotipos e protectotipos
- Sequenciamento e análise dos genes de S1 e N proporcionam um método rápido e preciso para classificar e prever genótipos de VBI, sendo um poderoso instrumento para monitorar a evolução filogenética e epidemiológica de variantes.
- Apesar do uso de vacinação, a BI tornou-se um problema grave.
- Número significativo de variantes de campo do VBI identificadas circulando em granjas comerciais, entre 2000 a 2006.
- Estes vírus parecem ser nativos, pois possuem baixa relação genética com a maioria das amostras de referência da América do Norte, Europa e Ásia, mas são altamente relacionadas entre si.
- As variantes nativas do VBI foram evoluindo e circulando em áreas do Brasil e Argentina, e devem ser considerados como candidatas para a proteção contra a BI.
- Estudos *in vivo* e *in vitro* são necessários para determinar a patogenicidade e imunogenicidade destes novos isolados, antes de definir uma nova vacina.

❖ **2010:** Felipe, PAN, et al. Diversidade genética de amostras de BI:

- 102 pools de suabes traqueais de frangos com sintomas de BI;
- regiões sul (9), sudeste (11), e nordeste (3), durante 2003-2009;
- 11/23: Mass; 10/23: D207; 1/23; Connecticut; 1/23: Arkansas.
- 6 amostras positivas para VBI oriundas de pombos sem sintomatologia:
- 05/06: Mass e 01/06: Connecticut.

❖ **2011:** Chacón, et al.: amostras isoladas entre 2003-2009:

- caracterizadas por VN e filogenia:
 - 7 anos formou 1 genótipo denominado BR-I;
 - está amplamente distribuído.
- Variabilidade (mutações e recombinações) é menor do que se imaginava?
- Nossas amostras variam menos?
- São semelhantes às amostras Argentinas.

❖ **2013:** Fernando, FS, et al. : testes de proteção para amostra variante:

- ciliostase, histopatologia, IHQ e PCR quantitativo;
- lesões mais severas nos rins que nas traqueias: nefrite com intensa inflamação, necrose e degeneração das células epiteliais;
- variante caracterizada como nefropatogênica;
- vacina H120 induziu proteção parcial contra a infecção nas traqueias e nos rins = prototipo *diferente* da Mass;
- salienta a importância de se determinar as características biológicas das variantes brasileiras, a fim de implementar medidas mais eficazes de controle da BI no país.

❖ **2013:** Fraga, A.P. et al.: emergência de novos genótipos de VBI:

- 60 diferentes granjas: 51 amostras positivas (PCR);
- 49 amostras apresentaram sequenciadas de boa qualidade;
- 11 amostras (22,4%): semelhantes à Mass;
- 34 amostras (69,4%): genótipo previamente caracterizado como BR-I;
- 04 amostras (8,2%) agruparam em um novo genótipo variante: BR-II.

❖ **2014:** Balestrin, E. et al.: avaliar a ocorrência de VBI em criações de aves comerciais das regiões sul (235 lotes), centro-oeste (94 lotes) e nordeste (103 lotes) com sinais clínicos de BI e determinar o tropismo dos principais genótipos circulantes para sistemas: respiratório, digestivo, urinário/reprodutor:

- janeiro de 2010 a dezembro de 2011;
- PCR e análise filogenética;
- frequência de positivos similar entre as 3 regiões;
- 3 genótipos:
 - 23 amostras (29,1%) Mass;
 - 52 amostras (65,8%) variante: BR-I;
 - 4 amostras (5,1%) variante: BR-II.
- frangos: respiratório e digestivo ++; respiratório +;
- matrizes: digestivo ++; respiratório e urinário +.
- alta frequência desta doença no país;
- proporção significativamente maior em frangos de corte (média 54,8%) do que em lotes de matrizes (28,8%), provavelmente porque os programas de biossegurança aplicada a granjas de matrizes são mais rigorosos.

No Brasil, há inúmeros estudos de análises genotípicas das amostras de VBI circulantes. Por outro lado, são extremamente escassos os dados de prototipos, embora a maioria dos artigos (❖) e resumos publicados sobre a doença ou seu agente, reporta a necessidade destes estudos para melhorar a caracterização da grande diversidade antigênica de VBI e implementar medidas mais eficazes de controle da BI no país.

Estudos de longos anos em andamento na Embrapa Suínos e Aves têm demonstrado que a vacina Massachusetts utilizada no Brasil, é capaz de proteger as aves mesmo frente a variantes genotípicas. Mas até o momento, apenas 5 das inúmeras variantes prototípicas atenderam os critérios internacionais de testes de eficácia de vacinas vivas utilizados (Trevisol et al, 2010; 2012 e 2014 – *no prelo*). Estas cinco amostras, pertencem ao mesmo prototipo, Massachusetts. Somam-se a estas, uma amostra reprodutiva (Pereira et. al., 2006) que também pertence ao prototipo Mass e uma amostra renal (Fernando, FS, et al, 2013) que apresentou proteção parcial frente a vacina sorotipo Mass, liberada para uso no Brasil.

Atualmente, está em andamento na Embrapa Suínos e Aves, um projeto para validar metodologias alternativas para melhor caracterizar patotipos e prototipos do VBI. Pretende-se padronizar metodologias providas de reprodutibilidade, fácil execução, e que forneçam um range numérico e com maior exatidão dos dados. Nesse contexto, alguns resultados preliminares desse projeto demonstraram correlação positiva significativa entre as novas metodologias desenvolvidas e os métodos convencionais (avaliação do movimento ciliar traqueal e avaliação histopatológica), a partir de ensaios de proteção cruzada entre vacina comercial atenuada (H120) e isolados de campo brasileiros do VBI. Dentre as metodologias desenvolvidas, está a quantificação da expressão de genes relacionados à atividade citotóxica (exemplo: CD8 β), à imunidade inata (exemplo: TLR7), à atividade antiviral (exemplo: IFN α). Estes marcadores vem apresentando correlação positiva com escores de lesão traqueal obtidos a partir da avaliação da atividade ciliar e de lesões microscópicas.

A dificuldade para realizar leituras de anéis traqueais de inúmeras aves, em tempo real (até 4 horas após a colheita), a subjetividade dos graus de lesão, a necessidade de diminuir erros mantendo o mesmo técnico para realizar as leituras, tanto de atividade ciliar como de lesões microscópicas, torna os ensaios de eficácia de vacinas extremamente laboriosos.

A identificação e validação de marcadores de expressão gênica com correlação positiva com as provas “ouro” para determinação de eficácia de vacinas, poderá vir simplificar e de certa forma “automatizar” a interpretação dos ensaios de proteção *in vivo*.

Enquanto não encontramos um método mais “amigável” para patotipar e prototipar amostras de VBI, me permitam divagar um pouco e considerar que, do ponto de vista da diversidade de amostras e dos aspectos clínicos da doença, considerando aqui, apenas os casos do nosso país e aqueles que foram cientificamente comprovados, com isolamento do agente e reprodução da doença, muito pouca coisa mudou. E que, o que mudou, quebrou alguns paradigmas que talvez possam nos ajudar a sair desse labirinto. Por exemplo, os vários estudos de genotipagem e análises filogenéticas vêm mostrando que

as amostras brasileiras do VBI são *únicas*. Formam clusters que se destacam das demais amostras do mundo. E aqui, considerando os estudos em que há um número significativo de amostras em cada cluster. E ainda, a constatação de que a presença oficial de um único sorotipo vacinal, além de não favorecer recombinações por estar “bem estabelecido” no país, parece ter promovido algumas poucas alterações resultantes de recombinações/mutações coexistindo com as amostras *nativas*. Esta é uma informação que precisa ser considerada melhor considerada.

Se não foram os aspectos clínicos da doença que mudaram (continuamos com problemas respiratórios, renais e reprodutivos, desde o 3º Prêmio Dow) e não é a diversidade de amostras, talvez 3 grandes grupos de genótipos coexistam no Brasil: Mass, BR I e BR II; o que de fato mudou desde 1979, quando oficialmente o Brasil assumiu a ocorrência da bronquite infecciosa das galinhas no país e permitiu o uso da vacina sorotipo Massachusetts para auxiliar no controle desta enfermidade?

Possivelmente a esta resposta, estarão associadas informações importantes que também precisam ser consideradas, ao decidirmos hoje, sobre a melhor estratégia para controlar as manifestações clínicas e as perdas econômicas que a bronquite infecciosa das galinhas vem causando a avicultura brasileira, apesar da sua excelência e merecida posição de destaque no mundo.

Bibliografia consultada

Abreu, J.T. et al. 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 Diseases*, v.50, n.4, p.494-501, 2006.

Balestrin, E. et al. Infectious bronchitis virus in different avian physiological systems - field study in Brazilian poultry flocks. *Poultry Science*, 93:1922-1929. 2014.

Brentano, L. et al. Isolamento do vírus da bronquite infecciosa das aves de surtos da doença associada a lesões atípicas de miopatia peitoral. In: Conferência APINCO de Ciência e Tecnologia Avícolas, 2005, Santos. *Anais*. Santos: 2005. v.7, p.232. Suplemento.

Chacón, JL et al. Situação epidemiológica da bronquite infecciosa em granjas comerciais do Brasil. *Revista Brasileira de Ciência Avícola* 2007; suplemento 9:225.

Di Fabio, J. Bronquite infecciosa das galinhas: vacinar frangos? In: Conferência Apinco 92 de Ciência e Tecnologia Avícolas, Santos, SP. *Anais*. : FACTA,. 1992. p.151-163.

Di Fabio, J. et al. Characterization of infectious bronchitis viruses isolated from outbreaks of disease in commercial flocks in Brazil. *Avian Diseases*, v.44, 582-589, 2000.

Epiphanyo, E.O.B et al. Resultados preliminares da utilização de cultivos de anéis de traqueias para o estudo de estirpes brasileiras do vírus da BI. *Arq. Bras. Med.Vet. e Zoot.* Vol54, nº2, BH. 2002.

Felippe, PAN, et al. Genetic diversity of avian infectious bronchitis virus isolated from domestic chicken flocks and coronaviruses from feral pigeons in Brazil between 2003 and 2009. *Avian Diseases*, 54(4):1191-1196. 2010.

Fernando, FS, et al. Nephritis associated with a S1 variant Brazilian isolate of infectious bronchitis virus and vaccine protection test in experimentally infected chicken. *International Journal of Poultry Science* 12 (11): 639-646, 2013.

Fraga, A.P. et al. Emergence of a new genotype of avian infectious bronchitis virus in Brazil. *Avian Diseases* 57:225–232, 2013.

Hipólito O, Silva JLM, Hsiung HM, Ito NMK. Bronquite infecciosa das galinhas: a doença no Brasil. Trabalho agraciado com o III Prêmio Dow de Veterinária, 1980. 72p.

Jaenisch, F. R.; Trevisol, I. M.; Esteves, P. A. Sanidade avícola contribui para o crescimento da produção de aves (capítulo 14). In: Souza, J. C. P. V. B.; Talamini, D. J. D.; Scheuerman, G. N.; Schmid, G. S. (Ed.). *Sonho, desafio e tecnologia: 35 anos de contribuições da Embrapa Suínos e Aves*. Concórdia: Embrapa Suínos e Aves, 2011. p. 353-372.

Mendonça, JFP et al. Bronquite infecciosa das galinhas: conhecimentos atuais, cepas e vacinas no Brasil. *Ciência Rural*, v.39, n8, p2529-2566. 2009

Montassier, M.F.S. et al. 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.

Montassier, H.J. Molecular epidemiology and evolution of avian infectious bronchitis virus. Workshop: Infectious Bronchitis (IB) in the Brazilian Poultry Industry. *Brazilian Journal of Poultry Science*. v.12 / n.2 / 87-96. 2010.

Pena, L.J. et al. BIG – artigo de revisão. *Arq. Int. Biol. SP*, v72,n3,p397-404, 2005.

Pereira, N.A. et al. Uma nova estirpe brasileira do vírus da bronquite infecciosa causadora de lesões gonadais e a proteção cruzada induzida pela vacina comercial atenuada. *19ª RAIB. Biológico, São Paulo*, v.68, Suplemento, p.152-156, 2006.

Silva, EN. Infectious Bronchitis in Brazilian Chickens: Current Observations of Field Service Personnel. Workshop: Infectious Bronchitis (IB) in the Brazilian Poultry Industry. *Brazilian Journal of Poultry Science*. v.12 / n.3 / 197 – 203. 2010.

Souza, MB, Martins NRS & Resende JS . Afinidades antigênicas de amostras do vírus da bronquite infecciosa das galinhas com amostra Massachusetts M41. *Arq. Bras. Med.Vet. e Zoot.* Vol53, nº2, BH. 2001

Souza C.M., et al. Production of monoclonal antibodies against conserved components of infectious bronchitis virus. *Arq. Bras. Med.Vet. e Zoot.* Vol53, nº5, BH. 2001.

Trevisol, IM et al. Teste de proteção vacinal para uma amostra de bronquite infecciosa isolada de caso de miopatia frente amostra de vacina comercial H120. Revista Brasileira de Ciência Avícola 2006; suplemento 8: 240.

Trevisol, IM et al. Avaliação de proteção vacinal para amostras *variantes* de bronquite infecciosa das galinhas frente a amostra vacinal H120. CD Room - Anais do Prêmio Lamas – 2010.

Trevisol, IM et al. *In vivo* assay of vaccine protection to Brazilian variant strains of infectious bronchitis virus. World Poultry Congress, Salvador/Bahia, August, CR-Room, Book of Abstracts. 2012.

Trevisol, IM et al. Proteção vacinal contra desafio com “variante” de bronquite infecciosa das galinhas. Prêmio Lamas, Conferência Facta 2014 -- Atibaia, SP, *no prelo*.

Villarreal, LYB. et al. Molecular Orchitis in Roosters with Reduced Fertility Associated with Avian Infectious Bronchitis Virus and Avian Metapneumovirus Infections. Avian Diseases, 51:900–904, 2007.

Villarreal, LYB. et al. Molecular Characterization of Infectious Bronchitis Virus Strains Isolated from the Enteric Contents of Brazilian Laying Hens and Broilers Avian Diseases, 51:974–978, 2007.

Wentz, I. Comparison between two cell systems for the growth of different isolates of infectious bronchitis virus. In: 5º ENCONTRO NACIONAL DE VIROLOGIA, 1990, São Lourenço, Minas Gerais. Resumos: Sociedade Brasileira de Virologia, p. 118 .

Wentz, I.; Brito, M.A.V.P. Determinação de relação antigênica entre seis amostras de vírus da Bronquite Infecciosa. In: Congresso Brasileiro de Microbiologia, 16., Simposio Nacional de Fermentação, Anais. Santos. 1991, v.22, n.3 (Supl 1). p.194.

Wentz, I . Bronquite infecciosa. Que cepa vacinal usar? In: Conferencia APINCO 92 de Ciencia e Tecnologia Avicolas, Santos, SP. Anais, p.165-167, 1992.