

1 **Falhas vacinais relacionadas à Bronquite Infecciosa das Galinhas**

2 Cíntia Hiromi Okino, DVM, MSc., PhD
3 Analista da Embrapa Suínos e Aves
4

5 Iara Maria Trevisol, DVM, MSc.
6 Pesquisadora da Embrapa Suínos e Aves
7

8 A bronquite infecciosa (BI) é uma doença viral aguda e altamente
9 infectocontagiosa, que afeta primariamente o trato respiratório das galinhas, e
10 dependendo do tropismo da estirpe circulante, pode acometer o sistema
11 reprodutivo, ocasionando queda na produção e na qualidade de ovos, e/ou os
12 rins ocasionando doença renal grave.

13 Essa doença também é frequentemente apontada como fator
14 desencadeante de infecções bacterianas secundárias, como micoplasmoses e
15 colibaciloses (Matthijs et al., 2009; Dwars et al., 2009), responsáveis por um
16 grande número de condenações de carcaça durante o abate.

17 Uma análise econômica das perdas ocasionadas pela BI na Inglaterra,
18 estimou ser uma das doenças respiratórias mais importantes em aves
19 comerciais, responsável por perdas de aproximadamente 23 milhões de libras
20 anualmente (Jones, 2010). Embora, não existam dados publicados da
21 quantificação econômica das perdas no Brasil, a doença é considerada um dos
22 problemas mais relevantes na área de sanidade de aves.

23 Um programa de biossegurança adequado juntamente com sistemas de
24 criação de idade única são essenciais para medidas de controle, mas a
25 vacinação é normalmente necessária para aumentar a resistência das aves
26 contra infecções pelo vírus da BI (VBI) (De Wit et al., 2011). Apesar das
27 estratégias de vacinação de frangos no primeiro dia de idade e repetidas
28 vacinações no ciclo de vida das aves comerciais, o VBI tem causado
29 significativas perdas na produção, indicando falhas no processo de vacinação,
30 por manejo incorreto das vacinas, ou insuficiente proteção cruzada conferida
31 pelo sorotipo vacinal utilizado no Brasil contra novas variantes desse vírus.

32 As variantes do VBI podem ser definidas como mutantes de estirpes
33 parentais desse vírus que diferem das estirpes clássicas em termos de
34 genótipo, patótipo, antigenicidade e/ou imunogenicidade. Os mutantes do VBI
35 estão constantemente sujeitos à eliminação pela resposta imune do
36 hospedeiro. Somente as estirpes com elevada variação antigênica são capazes
37 de escapar da proteção conferida pelo sistema imune induzida pelas vacinas e
38 sobreviver na população de hospedeiros, levando ao desenvolvimento de
39 doença clínica (Montassier, 2010).

AVESUI 2015

40 A classificação de estirpes do VBI pode ser feita por testes que analisam
41 e classificam diferenças encontradas no genoma do vírus (genótipos) ou por
42 testes que avaliam a atividade biológica do vírus (protectotipos, sorotipos e
43 patotipos) (De Wit et al., 2011).

44 a. Genótipos: é baseada em variações na sequência de nucleotídeos do
45 genoma completo ou parcial (especialmente no gene S1) do vírus. De acordo
46 com o grau de homologia entre as sequências gênicas, é possível “prever” o
47 grau de proteção cruzada entre a estirpe vacinal e o novo isolado de VBI,
48 embora isso não necessariamente implique em modificações do sorotipo ou
49 protectotipo.

50 b. Sorotipos: é baseada na reatividade cruzada entre o vírus (o qual
51 queremos classificar) e anticorpos anti-VBI soro-específicos usando a técnica
52 de vírus-neutralização. Duas estirpes (A e B) são consideradas do mesmo
53 sorotipo quando os títulos necessários para neutralização entre heterólogos
54 (anti-soro A com vírus B, e anti-soro B com vírus A) diferem pelo menos 20
55 vezes dos títulos necessários para homólogos (anti-soro A com vírus A, e anti-
56 soro B com vírus B), em ambas direções.

57 c. Patotipos: é baseada na patogenicidade do vírus, ou seja, nos
58 órgãos/sistemas mais lesados pelo vírus, dependendo da estirpe viral. Embora
59 o VBI se replique em diferentes epitélios celulares, pode ou não causar lesão
60 no órgão. De acordo com essa classificação, as diferentes estirpes do VBI são
61 denominadas de acordo com o sistema/órgão acometido em: estirpes
62 respiratória, renal e reprodutiva. Embora, uma estirpe possa afetar mais de um
63 sistema.

64 d. Protectotipos: é baseado na evidência da proteção das aves
65 conferida por imunização prévia. É realizada através de experimentos “in vivo”.
66 Resumidamente, as galinhas SPF (“Specific Pathogen Free” – Livres de
67 patógenos específicos) são inoculadas/vacinadas com a estirpe A (que
68 geralmente é a estirpe encontrada na vacina “viva” comercialmente disponível);
69 após 3-4 semanas é realizada a segunda inoculação/desafio, com a estirpe B.
70 Após 5 dias as aves são sacrificadas e as traqueias são colhidas e avaliadas
71 pelo teste de ciliostase, onde é verificado o grau de estase ciliar. Se os cílios
72 apresentarem atividade ciliar normal, as aves são consideradas protegidas
73 devido à exposição prévia com a estirpe A. Nesse caso, as estirpes A e B
74 pertencem ao mesmo protectotipo. Outro método padrão utilizado é o
75 isolamento viral em ovos embrionados, onde, dependendo do percentual de
76 aves em que é feita a recuperação do vírus (isolamento viral) a partir das
77 traqueias, as aves são consideradas desprotegidas, e não pertencem ao
78 mesmo protectotipo.

79 Atualmente, a classificação de estirpes do VBI em genótipos é a mais
80 frequentemente utilizada em todo o mundo, inclusive no Brasil (Montassier et

81 al., 2006, 2008; Villarreal et al., 2007a, 2007b, 2010; Fraga et al., 2013), devido
82 à maior praticidade e rapidez, e vem substituindo os testes de sorotipagem e
83 protectotipagem. Mas até que ponto essa classificação traz informações para o
84 campo? A genotipagem é importante em estudos epidemiológicos, e pode ser
85 considerada um “indicativo” de ausência de proteção cruzada entre a estirpe
86 vacinal e a estirpe circulante no campo, pois pequenas alterações de
87 aminoácidos na proteína S1 podem resultar em alteração de sorotipos devido à
88 alteração de epítomos vírus-neutralizantes. Na prática, os resultados de
89 genotipagem não fornecem resposta definitiva sobre a eficácia da proteção
90 vacinal frente ao desafio no campo com estirpes circulantes. Em contrapartida,
91 os testes de protectotipagem podem responder de forma eficiente se há ou não
92 proteção conferida pela vacinação frente ao desafio.

93 Em relação à formulação de vacinas atenuadas contra BI, principal tipo
94 de vacina indutora de proteção frente ao desafio, sabe-se que alguns países
95 permitem somente a utilização do sorotipo Massachusetts (Mass), como a
96 estirpe H120, como é o caso do Brasil. Em contrapartida, outros países
97 também permitem o uso de outras estirpes, como por exemplo, nos Estados
98 Unidos, onde são licenciadas as estirpes Connecticut, Arkansas (Ark),
99 Delaware 072 e Georgia 98 além da Mass, ou ainda no Reino Unido onde a
100 estirpe 4/91 também é licenciada (OIE, 2013, De Wit et al., 2011).

101 O uso de múltiplos sorotipos em programas de vacinação contra BI é
102 justificado pelo aumento do espectro de proteção em resposta ao desafio,
103 frente à comprovada ausência de proteção cruzada entre determinadas
104 estirpes, demonstrada há muito tempo (Hofstad, 1961, 1981, Gelb et al., 1981).

105 No Brasil, alguns trabalhos têm avaliado a proteção conferida pelas
106 vacinas atenuadas comercialmente disponíveis (Mass), frente aos isolados de
107 campo brasileiros considerados variantes do VBI. O primeiro trabalho que
108 caracterizou protectotipos brasileiros (Di Fábio et al., 2000), demonstrou que
109 embora tenham sido encontrados sorotipos diferentes do Mass (4 isolados
110 avaliados), a vacina (H120) apresentou proteção completa contra 3 isolados e
111 proteção parcial contra 1 isolado.

112 Em 2006, um estudo que identificou um isolado de campo brasileiro foi
113 caracterizado como de patogenicidade principal para gônadas, e após o teste
114 de protectotipagem, foi verificado que a vacina atenuada H120 conferia
115 proteção contra o desafio por esse vírus (Pereira et al., 2006).

116 Outro isolado de campo brasileiro, genotipado como variante do VBI, foi
117 caracterizado como nefropatogênico, e após avaliação da proteção cruzada
118 conferida pela vacina H120, foi verificada proteção parcial (Fernando et al.,
119 2013).

AVESUI 2015

120 Ainda em relação aos testes de protectotipagem (utilizando-se a vacina
121 atenuada do sorotipo Mass do VBI), cinco isolados de campo brasileiros,
122 também genotipados como variantes do VBI, de patogenicidade
123 predominantemente respiratória, apresentaram proteção cruzada satisfatória
124 com estirpe vacinal (Trevisol 2010, 2012, 2014, 2014b).

125 Finalmente, mais quatro isolados de campo brasileiros, os quais a
126 homologia entre aminoácidos com M41 quanto ao gene S1 do VBI foi inferior a
127 72,8%, apresentaram bons níveis de proteção cruzada frente à imunização
128 com vacinas do sorotipo Mass (De Wit et al., 2014).

129 Em resumo, de acordo a metodologia preconizada pela Organização
130 Mundial de Saúde Animal (OIE) (OIE, 2013) para teste de eficácia vacinal
131 contra BI, que prevê o uso do reisolamento viral ou da avaliação de ciliostase
132 em amostras traqueais, de todos os resultados de estudos de protectotipagem
133 de isolados de campo brasileiros, 13 isolados (de um total de 15 isolados
134 avaliados) apresentaram proteção-cruzada adequada conferida pela vacina
135 Mass frente ao desafio, enquanto dois isolados apresentaram proteção parcial.

136 Nesse contexto, cabe-se questionar se os problemas relacionados às
137 falhas vacinais frente ao desafio pelo VBI observados no campo, no Brasil, são
138 de fato restritos a alterações antigênicas das estirpes circulantes que
139 impossibilitariam a proteção cruzada conferida pelo único sorotipo (Mass)
140 permitido na formulação de vacinas comerciais no país.

141 A administração da vacina atenuada contra a BI pode ser realizada de
142 três formas principais (Tabela 1), sendo que para todas elas é importante
143 considerar que a estabilidade da vacina diluída é mantida pelo curto período de
144 uma hora (Okino et al., 2015).

145 Tabela 1. Vias de administração da vacina atenuada contra BI, e principais
146 recomendações.

Via de administração da vacina	Principais recomendações
Água de beber	- Utilizar água sem cloro - Ajustar pH 6,0 – 7,5 - Jejum hídrico de 60-120 minutos
Óculo-nasal	- Esperar completa absorção da gota antes de soltar a ave - Evitar aquecer frasco da vacina (mãos)
“Spray” incubatório	- Ideal utilizar água fria - Ajustar gotas para 100-300 micras
“Spray” no campo	- Direcionar jato de “spray” para cabeça das aves

147

148 Nos Estados Unidos, os relatos de falhas de proteção referentes à
149 vacinação com sorotipo Ark DPI frente ao desafio por estirpes “Ark like”,

AVESUI 2015

150 inicialmente apontados serem devido ao aparecimento de “quasispecies”
151 dentro desse sorotipo, e conseqüente proteção cruzada insuficiente, foram
152 melhor avaliados, e foi demonstrado serem devido a falhas na aplicação da
153 vacina e não por alterações antigênicas (De Wit et al., 2011).

154 Ainda em relação à vacinação com sorotipo Ark da BI, um recente
155 estudo demonstrou que a via de administração e dose vacinal envolvidos
156 podem influenciar na eficácia da vacinação. Nesse estudo, foi demonstrado
157 que a vacinação via “spray” utilizada no incubatório não foi eficaz em conferir
158 proteção, por outro lado quando administrada via ocular a proteção foi obtida
159 de forma satisfatória. Além disso, duas doses da vacina administradas em 7 mL
160 a 20 aves apresentaram melhores índices de proteção quando comparado à
161 utilização de duas doses em 7mL a um grupo de 40 aves. Sugerindo que
162 combinação de via de administração, dose e volume de vacina são fatores
163 importantes na indução de proteção (Roh et al., 2013).

164 Em outro estudo, foi observado que a dose de vacina atenuada contra o
165 VBI administrada no primeiro dia de idade via óculo-nasal possui influência na
166 indução de respostas imunes locais e por conseqüência, no desencadeamento
167 de lesões ocasionadas pelo vírus de desafio. Ou seja, quanto maior a dose de
168 vacina administrada, melhores foram as respostas imunes humoral e celular
169 locais, melhor uniformidade do grupo, e menores os escores de lesões
170 microscópicas foram observadas na traqueia, após desafio com vírus
171 patogênico (Okino et al., 2013).

172 Dado todo o exposto, em casos de presença de desafio de BI no campo,
173 é importante considerar uma série de fatores antes de apontar as alterações
174 antigênicas como causa única de falhas vacinais, como por exemplo: via de
175 administração, dose, título, data de expiração, armazenamento, uniformidade
176 da vacinação no lote e boas práticas de manejo.

177

178 Referências:

179 De Wit, J.J.; Brandão, P.; Koopman, R.; Villarreal, L.Y.B. Report of genotyping,
180 pathotyping and protectotyping of IBV strains from Brazil. In: 8th International
181 Symposium on Avian Corona- and Pneumoviruses and complicating pathogens,
182 2014, Rauschholzhausen. Proceedings... Giessen, 2014.

183 De wit, J.J.; Cook, J.K.A.; Heijden, H.M.J.F. Infectious bronchitis virus variants:
184 a review of the history current situation and control measures. Avian Pathol.,
185 v.40 (3), p. 223-235, 2011.

186 Di Fabio, J.; Rossini, L.J.; Orbell, S.J.; Paul, G.; Huggins, M.B.; Malo; A.; Silva,
187 B.G.; Cook, J. K. Characterization of infectious bronchitis viruses isolated from

AVESUI 2015

- 188 outbreaks of disease in commercial flocks in Brazil. *Avian Dis.*, v. 44(3), p. 582-
189 589, 2000.
- 190 Dwars, R.M.; Matthijs, M.G.R.; Daemen, A.J.J.M.; van Eck, J.H.H.; Ververde, L.;
191 Landman, W.J.M. Progression of lesions in the respiratory tract of broilers after
192 single infection with *Escherichia coli* compared to superinfection with *E.coli* after
193 infection with infectious bronchitis virus. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, v.127,
194 p.65-76, 2009.
- 195 Fernando, F.S.; Montassier, M.F.S.; Silva, K.R.; Okino, C.H.; Oliveira, E.S.;
196 Fernandes, C.C.; Bandarra, M.B.; Gonçalves, M.C.M.; Borzi, M.M.; Santos,
197 R.M.; Vasconcelos, R.O.; Alessi, A.C.; Montassier, H.J. Nephritis associated
198 with S1 variant brazilian isolate of infectious bronchitis virus and vaccine
199 protection test in experimentally infected chickens. *Int. J. Poul. Sci.*, v.12(11),
200 p.639-646, 2013.
- 201 Fraga, A.P.; Balestrin, E.; Ikuta, N.; Fonseca, A.S.; Spilki, F.R.; Canal, C.W.;
202 Lungee, V.R. Emergence of a new genotype of Avian Infectious Bronchitis virus
203 in Brazil. *Avian Dis.*, v.57, p.225-232, 2013.
- 204 Gelb, J.; Perkins, B.E.; Rosenberger, J.K.; Allen, P.H. Serologic and cross-
205 protection studies with several infectious bronchitis virus isolates from
206 Delmarva-reared broiler chickens. *Avian Dis.*, v.25, p. 655-666, 1981.
- 207 Hofstad, M.S. Antigenic and immunological studies on several isolates of avian
208 infectious bronchitis virus. *Avian Dis.*, v.5, p.102-107, 1961.
- 209 Hofstad, M.S. Cross-immunity in chickens using seven isolates of avian
210 infectious bronchitis virus. *Avian Dis.*, v.25, p.650-654, 1981.
- 211 Jones, R. C. Viral respiratory diseases (ILT, aMPV infections, IB): are they ever
212 under control? *British Poul Sc.*, v.51, n.1, p.1 – 11, 2010.
- 213 Matthijs, M.G.R.; Ariaans, M.P.; Dwars, R.M.; van Eck, J.H.H.; Bouma, A.;
214 Stegeman, A.; Ververde, L. Course of infection and immune responses in the
215 respiratory tract of IBV infected broilers after superinfection with *E.coli*. *Vet.*
216 *Immunol. Immunopathol.*, v.127, p.77-84, 2009.
- 217 Montassier, H.J. Molecular epidemiology and evolution of avian infectious
218 bronchitis virus. *Brazilian Journal of Poultry Science.*, v.12 (2), p.87-96, 2010.
- 219 Montassier, M.F.S.; Montassier, H.J.; Brentano, L.; Richtzenhain, L.J. Genetic
220 grouping of avian infectious bronchitis virus isolated in Brazil, based on RT-
221 PCR/RFLP analysis of the S1 gene. *Pesquisa Veterinária Brasileira.* v. 28, n.3,
222 p.190-194, 2008.
- 223 Montassier, M.F.S.; Brentano, L.; Richtzenhain, L.J.; Montassier, H.J. Genetic
224 diversity on S1 glycoprotein of Avian Infectious Bronchitis virus strains isolated

AVESUI 2015

- 225 in Brazil between 1988-2000. In: V. International Symposium on Avian Corona-
226 and Pneumoviruses and complicating pathogens, 2006, Rauschholzhausen,
227 Germany. Proceedings of V International Symposium on Avian Corona- and
228 pneumoviruses and complicating pathogens. Giessen, Germany: VVB
229 Lauferswiler Verlag, 2006. v. 1. p. 119-131
- 230 OIE. Avian infectious bronchitis. In: OIE Terrestrial Manual 2013.
- 231 Okino, C.H.; Alessi, A.C.; Montassier, M.F.S ; Rosa, A.J.M.; Wang, X.;
232 Montassier, H.J. Humoral and cell-mediated immune response to different
233 doses of attenuated vaccine against avian infectious bronchitis virus. *Viral*
234 *Immunology*, v. 26, p. 259-267, 2013.
- 235 Okino, C.H.; Montassier, M.F.S.; França, M.S.; Shivaprasad, H.L.; Montassier,
236 H.J.; Santos, I.L.; Rech, R.R. Main challenges in poultry farming: Infectious
237 Bronchitis. 1ed. Zaragoza: Servet editorial – Grupo Asis Biomedica, S.L., 2014.
238 83 p.
- 239 Pereira, N.A.; Alessi, A.C.; Okino, C.H.; Montassier, M.F.S.; Santos, I.L.;
240 Montassier, H.J.; Richtzenhain, L.J. Uma nova estirpe brasileira do vírus da
241 bronquite infecciosa causadora de lesões gonadais e a proteção cruzada
242 induzida pela vacina comercial atenuada. *O Biológico – Suplementos*, v.68,
243 2006.
- 244 Roh, H.J.; Hilt, D.A.; Williams, S.M.; Jackwood, M.W. Evaluation of Infectious
245 Bronchitis virus Arkansas-type vaccine failure in commercial broilers. *Avian*
246 *Diseases.*, v.57, p.248-259, 2013.
- 247 Trevisol, I.M.; Okino, C.H.; Mores, M.A.M.; Mattos, G.L.M.; Brentano, L.;
248 Esteves, P.A. Proteção vacinal contra desafio com “variante” de bronquite
249 infecciosa das galinhas. In: Prêmio Lamas - Conferência Facta, 2014, Atibaia,
250 Anais... Campinas, 2014.
- 251 Trevisol, I.M.; Esteves, P.A.; Brentano, L.; Jaenisch, F.R.F.; Munhoz, L.;
252 Ritterbusch, G.A. In vivo assay of vaccine protection to Brazilian variant strains
253 of infectious bronchitis virus. In: World Poultry Congress, 2012, Salvador,
254 Anais... Salvador, 2012.
- 255 Trevisol, I.M.; Jaenish, F.R.; Silva, V.S.; Brentano, L.; Klein, T.A.P.; Esteves,
256 P.A. Avaliação de proteção vacinal para amostras variantes de bronquite
257 infecciosa das galinhas frente a amostra vacinal H120. In: Prêmio Lamas –
258 Conferência Facta, 2010, Campinas, Anais... Campinas, 2010.
- 259 Villarreal, L.Y.B.; Sandri, T.L.; Souza, S.P.; Richtzenhain, L.J. De Wit, J.J.;
260 Brandao, P.E. Molecular epidemiology of avian infectious bronchitis in Brazil
261 from 2007 to 2008 in breeders, broilers, and layers. *Avian dis.*, v. 54, p.894–
262 898, 2010.

AVESUI 2015

- 263 Villarreal, L.Y.B.; Brandão, P.E.; Chacón, J.L.; Assayag, M.S.; Maiorka, P.C.;
264 Raffi, P.; Saidenberg, A.B.S.; Jones, R.C.; Ferreira, A.J.P. Orchitis in Roosters
265 with Reduced Fertility Associated with Avian Infectious Bronchitis Virus and
266 Avian Metapneumovirus Infections. *Avian Diseases*, v. 51, p. 900, 2007.
- 267 Villarreal, L.Y.B. ; Brandão, P.E. ; Chacón, J.L. ; Saidenberg, A.B.S. ; Assayag,
268 M.S. ; Jones, R.C. ; Ferreira, A.J.P. . Molecular Characterization of Infectious
269 Bronchitis Virus Strains Isolated from the Enteric Contents of Brazilian Laying
270 Hens and Broilers. *Avian Diseases*, v. 51, p. 974, 2007.