

Bruna Cypreste Michell

**DOENÇA DE GUMBORO: INFLUÊNCIA DOS ANTICORPOS  
MATERNOS SOBRE AS VACINAÇÕES *IN OVO*, INJETÁVEL E NA  
ÁGUA DE BEBIDA E DESEMPENHO DE FRANGOS DE CORTE**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Medicina Veterinária.

Área de concentração: Medicina Veterinária Preventiva

Orientador: Prof. Dr. Nelson Rodrigo da Silva Martins

Co-orientador: Prof. Dr. Nelson Carneiro Baião

Belo Horizonte  
UFMG-Escola de Veterinária  
2007

M623d Michell, Bruna Cypreste 1982-

Doença de Gumboro: influência de anticorpos maternos sobre as vacinações in ovo, injetável e na água de bebida e desempenho de frangos de corte/ Bruna Cypreste

Michell. – 2007.

44 p. :il.

Orientador: Nelson Rodrigo da Silva Martins

Co-orientador: Nelson Carneiro Baião

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária

Inclui bibliografia

1. Frango de corte – Doenças – Teses. 2. Gumboro, Doença de – Vacinação - Teses. 3. Ave doméstica – Doenças – Teses. I. Martins, Nelson Rodrigo da Silva. II. Baião, Nelson Carneiro. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária. IV. Título.

## Folha de Assinatura



## AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus pela dádiva da vida.

Agradeço à minha família por todo apoio e compreensão nos momentos de dificuldade e pelo carinho e amor incondicionais.

Agradeço especialmente ao meu orientador, Prof. Dr. Nelson Rodrigo da Silva Martins, pela oportunidade, confiança e pelos ensinamentos adquiridos durante o curso de mestrado.

Agradeço com muito carinho ao co-orientador, Prof. Dr. Nelson Carneiro Baião, pelo apoio, confiança, exemplo profissional, dedicação e grandes esforços para a realização deste experimento.

Aos membros da comissão examinadora pela enriquecedora colaboração neste trabalho.

Aos professores Maurício Resende, José Sérgio de Resende e Roberto Becht Flatschart, por me ajudarem nos momentos de dificuldade, em especial ao Professor Rômulo Cerqueira Leite pelo preparo para a vida acadêmica.

A todos os membros do laboratório de virologia comparada (ICB) pelo apoio e colaboração, em especial à doutoranda Adriana Dias Gomes pelo carinho, paciência, dedicação e ensinamentos.

Aos meus colegas de pós Graduação: Felipe, Douglas, Rubens, Pedro, Júlia, Bruna, Mirian, dentre outros, em especial ao doutorando Leonardo Lara e à professora Gerusa pela enriquecedora colaboração nas análises estatísticas. Também a todos os alunos da graduação que participaram de alguma forma na realização deste experimento.

Agradeço também a todos os funcionários da Fazenda Experimental "Professor Hélio Barbosa", especialmente ao Sr. Geraldo Lourenço, Carlos e Juninho pela dedicação.

Às minhas amigas, Bárbara Lafetá e Raissa Rossi, por estarem sempre ao meu lado em todos os momentos e ao Bruno Reis pelo carinho e amor.

À Nadia pela colaboração na formatação da dissertação e pelos agradáveis momentos compartilhados.

À patrocinadora deste trabalho, empresa Rio Branco Alimentos S/A, e à empresa Rivelli Alimentos pela colaboração.

Ao Laudo Laboratório Avícola pela realização dos exames de sorologia.

Ao CNPq pela bolsa de estudos concedida.

A todos que, de forma direta ou indireta, colaboraram para a realização deste trabalho.

---

## SUMÁRIO

---

<b>RESUMO</b> .....	10
<b>ABSTRACT</b> .....	10
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	11
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	11
2.1. A doença de Gumboro .....	11
2.2. O agente .....	12
2.3. Histórico da doença de Gumboro no Brasil .....	13
2.4. Programas de vacinação .....	14
2.4.1. Importância dos anticorpos passivos .....	14
2.4.2. Influência dos anticorpos passivos sobre as vacinações .....	15
2.4.3. Vacinação <i>in ovo</i> para doença de Gumboro.....	17
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	19
3.1. Locais.....	19
3.2. Matrizes.....	19
3.3. Ovos.....	19
3.4. Incubação e vacinação dos pintos .....	19
3.5. Tratamentos .....	20
3.6. Programas de vacinações utilizados nas matrizes, <i>in ovo</i> , e nos pintos no primeiro ou no 15 <sup>o</sup> dia de idade .....	20
3.6.1. Programa de vacinação nas matrizes .....	20
3.6.2. Programa de vacinação <i>in ovo</i> .....	20
3.6.3. Programa de vacinação no primeiro ou no 15 <sup>o</sup> dia de idade .....	20
3.7. Metodologias de vacinação.....	20
3.7.1. Vacinação <i>in ovo</i> .....	20
3.7.2. Vacinação no 1 <sup>o</sup> dia de vida .....	21
3.7.3. Vacinação no 15 <sup>o</sup> dia de vida.....	21
3.8. Manejo dos frangos de corte.....	21
3.8.1. Rações.....	21
3.9. Avaliação sorológica .....	22
3.9.1. Imunidade humoral passiva .....	22
3.9.2. Imunidade humoral ativa.....	22
3.9.3. Testes de soroneutralização .....	22
3.10. Provas moleculares .....	23
3.10.1. Coleta de material .....	23
3.10.2. Extração do RNA.....	23
3.10.3. Oligonucleotídeos .....	23
3.10.4. Transcrição Reversa (TR) .....	24
3.10.5. Reação em cadeia da polimerase (PCR) .....	26
3.10.6. Eletroforese em gel de agarose .....	26
3.11. Delineamento experimental .....	26
3.12. Desempenho produtivo dos frangos .....	26
3.12.1. Parâmetros avaliados.....	27
3.12.1.1. Peso médio (PM).....	27
3.12.1.2. Consumo de ração (CR).....	27
3.12.1.3. Conversão alimentar (CA) .....	27
3.12.1.4. Taxa de mortalidade.....	27

3.12.1.5.	Taxa de viabilidade (Viab) .....	27
3.13.	Delineamento experimental .....	27
<b>4</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>27</b>
4.1.	Resposta sorológica .....	27
4.2.	Provas moleculares (RT/PCR) .....	33
4.2.1.	Resultados das provas de RT/PCR de acordo com os tratamentos.....	37
4.3.	Desempenho produtivo dos frangos de corte.....	37
4.3.1.	Desempenho dos pintos de corte de um a sete dias de idade.....	37
4.3.2.	Desempenho das aves um a 21 dias de idade .....	38
4.3.3.	Desempenho dos frangos de um a 40 dias de idade .....	40
<b>5.</b>	<b>CONCLUSÕES</b> .....	<b>41</b>
<b>6.</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>41</b>

---

#### LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Descrição dos tratamentos de acordo com o uso ou não da vacina oleosa na matriz e via e idade de vacinação dos pintos .....	20
Tabela 2	Níveis nutricionais das rações utilizadas no experimento .....	22
Tabela 3	Oligonucleotídeos, seqüência de bases, TM e localização no gene que codifica para a proteína VP1 do IBDV .....	24
Tabela 4	Programa de amplificação utilizado nas PCRs de parte do gene que codifica a proteína VP1 do IBDV .....	26
Tabela 5	Títulos médios de anticorpos neutralizantes das matrizes no momento da coleta de ovos .....	27
Tabela 6	Títulos médios de anticorpos neutralizantes dos pintos 24 horas após o nascimento.....	28
Tabela 7	Títulos médios de anticorpos neutralizantes das aves para DG aos 10, 25, 40 dias de idade de acordo com os tratamentos .....	28
Tabela 8	Resultados da RT/PCR de acordo com os tratamentos .....	37
Tabela 9	Desempenho dos pintos de corte de um a sete dias de idade de acordo com os tratamentos.....	38
Tabela10	Desempenho das aves de um a 21 dias de idade de acordo com os tratamentos .....	39
Tabela11	Desempenho dos frangos de um a 40 dias de idade de acordo com os tratamentos .....	40

---

#### LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Organização genômica do IBDV .....	13
Figura 2	Fluxograma representativo do protocolo para transcrição reversa com as enzimas SUPERISCRIP <sup>TM</sup> e ImPROM II.....	25
Figura 3	Títulos médios de anticorpos das aves de 1 a 40 dias de idade, vacinadas para DG <i>in ovo</i> , no 1 <sup>o</sup> ou no 15 <sup>o</sup> dia de vida, descendentes de matrizes vacinadas ou não vacinadas às 18 semanas .....	29
Figura 4	Análise do gel de agarose 1% corado com brometo de etídio contendo os produtos da RT/PCR (segmento do gene VP1 do IBDV (588 pb)) obtidos das amostras testadas.....	35
Figura 5	Análise do gel de poliacrilamida 6% corado pela prata contendo os produtos da RT/PCR (segmento do gene VP1 do IBDV (588 pb)) obtidos das amostras testadas .....	35

---

---

## LISTA DE ABREVIATURAS

---

A	Pintos vacinados no 1 <sup>o</sup> dia, descendentes de matrizes vacinadas
B	Pintos vacinados no 15 <sup>o</sup> dia de vida, descendentes de matrizes não vacinadas
C	Pintos vacinados no 15 <sup>o</sup> dia de vida, descendentes de matrizes vacinadas
D	Pintos vacinados no 1 <sup>o</sup> dia, descendentes de matrizes não vacinadas
E	Pintos vacinados <i>in ovo</i> , descendentes de matrizes não vacinadas
F	Pintos vacinados <i>in ovo</i> , descendentes de matrizes vacinadas
BC	Bolsa cloacal
cDNA	Ácido desoxirribonucléico complementar
DG	Doença de Gumboro
DMSO	Dimetil sulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucléico
ds-RNA	Ácido ribonucléico de fita dupla
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etileno diamino tetracético
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i> (ensaio imunoenzimático em fase sólida)
G11	Grupo molecular 11 do IBDV (Simbios)
IBDV	<i>Infectious bursal disease virus</i> (virus da doença infecciosa da bursa)
ID	<i>Infective dose</i> (dose infectante)
min	Minutos
mL	Mililitros
mM	Millimolar
pb	Pares de base
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> (reação em cadeia da polimerase)
PFU	Unidades formadoras de colônias
RFLP	<i>Restriction fragment length polymorphism</i>
RNA	Ácido ribonucléico
RT/PCR	Transcrição reversa/reação em cadeia da polimerase
SC	Subcutânea
SPF	Specific pathogen free (livre de patógenos específicos)
TA	Temperatura ambiente

TCID	<i>Tissue culture infective dose</i> (dose infectante em cultura de tecido)
TE	Tris-EDTA
TM	Temperature melting
TR	Transcrição reversa
UP	Ultrapura
Viab	Viabilidade
VP1	Região genômica da VP1
vvIBDV	<i>Very virulent IBDV</i> (IBDV muito virulento)
µl	Microlitros

---

## RESUMO

Este trabalho teve como objetivo avaliar a interferência dos anticorpos maternos em pintos de corte sobre as respostas às vacinações contra a doença de Gumboro (DG) realizadas *in ovo*, no 1<sup>o</sup> ou no 15<sup>o</sup> dia de idade. Para tanto, foram utilizados pintos descendentes de matrizes vacinadas, e não vacinadas, com vacina oleosa contra a DG, as 18 semanas de idade. As variáveis analisadas foram o desempenho dos frangos (fêmeas) de um a 40 dias de idade, a resposta imune humoral através do teste de soroneutralização e detecção do IBDV na BC por RT/PCR. O delineamento experimental utilizado foi inteiramente ao acaso com arranjo fatorial 2x3, dois grupos de matrizes quanto à vacinação oleosa (com ou sem), e três grupos de progênies quanto ao sistema de vacinação (*in ovo*, no 1<sup>o</sup> dia ou no 15<sup>o</sup> dia de vida), utilizando estirpe intermediária de IBDV. Foi demonstrado que o desempenho dos frangos aos 40 dias não é influenciado pela vacinação *in ovo* nem no 1<sup>o</sup> dia quando esta é realizada em pintos com altos ou baixos títulos de anticorpos passivos. Frangos vacinados *in ovo*, no 1<sup>o</sup> e no 15<sup>o</sup> dia de vida, descendentes de matrizes não vacinadas, apresentaram títulos médios de anticorpos superiores ( $p < 0,05$ ) aos de aves descendentes de matrizes vacinadas. Em contraste, as progênies de matrizes com altos títulos de anticorpos exibiram menor soroconversão e menor taxa de detecção do IBDV na BC. As maiores taxas de detecção do IBDV na BC, em decorrência das vacinações no 1<sup>o</sup> ou 15<sup>o</sup> dia de vida, nas aves descendentes de matrizes não vacinadas, indicaram que altos títulos de anticorpos passivos, no momento da vacinação, podem ser neutralizantes ao vírus vacinal. Conclui-se que frangos oriundos de matrizes não vacinadas com vacinas oleosas para DG apresentam melhor soroconversão, além dos resultados de desempenho aos 40 dias não diferirem.

Palavras-chave: Doença de Gumboro, anticorpos maternos, vacinação *in ovo*, desempenho, RT/PCR, soroneutralização.

## ABSTRACT

A comparison of vaccinating 18-day embryos (*in ovo*) or chicks at the 1<sup>st</sup> day or 15<sup>th</sup> day post hatch against infectious bursal disease (IBD) was performed. The experimental embryos and chicks were progeny of industrial broiler breeders with high (given IBD oil-emulsion vaccine) or low (not given IBD oil-emulsion vaccine) serum antibody titers against IBD virus (IBDV). Hatched progenies were female broilers derived of the same breeders generating the embryos. Chickens were evaluated for IBDV serum antibody assay (serum neutralization), vaccinal IBDV (RT/PCR) infection in the bursa of Fabricius (BF) and for the evaluation of performance at the 40<sup>th</sup> day of age. The experimental design constituted of a 2 x 3 factorial (two breeder groups: given or not inactivated oil-emulsion vaccine at the 18<sup>th</sup> week of age; three progeny broiler groups according to the date of given IBDV intermediate strain vaccine: at the 18<sup>th</sup> day of embryonic development, 1<sup>st</sup> or 15<sup>th</sup> day post hatch). The performance of chicks at the 40<sup>th</sup> day of age was not affected by *in ovo* or day-old vaccinations for any level (low or high) of passive antibodies. Broilers of low passive antibody titers, vaccinated *in ovo*, on the 1<sup>st</sup> or 15<sup>th</sup> day post hatch seroconverted to higher titers ( $p < 0,05$ ). Unvaccinated breeder progenies developed a higher circulating antibody response (serum neutralization) possibly due to a higher rate of vaccinal IBDV BF infection, as detected by RT/PCR. In contrast, breeders given IBD inactivated oil-emulsion vaccine produced progenies more resistant to vaccinal IBDV infection in the BF and with poorer IBDV antibody serum conversion, as the high passive antibody titers may have neutralized vaccinal IBDV (intermediate strain) infection of the bursa. Moreover, the vaccination of chicks with high passive antibody titers may be less efficient. In conclusion, the broiler chickens from non-vaccinated hens showed a better serum conversion, beyond of the performance results at 40 days of age did not differ between the treatments.

Keywords: Infectious bursal disease, maternal antibodies, *in ovo* vaccination, performance, RT/PCR, serum neutralization.

## 1. INTRODUÇÃO

A doença de Gumboro (DG) vem se consolidando como um dos mais importantes agentes causadores de imunossupressão nas criações avícolas.

Caracteriza-se por uma enfermidade aguda, altamente contagiosa, que acomete pintos em fase de crescimento. É uma doença cosmopolita, que tem causado problemas sanitários na avicultura industrial, devido à ocorrência de surtos que resultam em perdas econômicas consideráveis.

O controle da doença se resume em medidas de biossegurança aliadas aos programas de vacinação, que podem ser definidos de duas formas: o primeiro consiste na proteção de aves jovens através da imunidade passiva, em que a vacinação das reprodutoras, no período pré-postura com vacinas oleosas, tem o objetivo de induzir altos e uniformes títulos de anticorpos maternos, protegendo os pintos contra infecções precoces no campo. O segundo se baseia na vacinação da progênie com vacinas vivas, com o intuito de induzir adequada resposta imune ativa contra IBDVs de campo de alta virulência durante a fase de criação dos frangos.

A prática de vacinação das reprodutoras com vacinas inativadas no período pré-postura obteve sucesso no controle da DG até meados da década de 80, uma vez que os IBDVs de campo possuíam, em sua maioria, baixa ou média virulência. Porém, a emergência de estirpes de alta virulência (vvIBDV), capazes de ultrapassar a barreira de anticorpos maternos e causar a doença clínica, colocou em questionamento os programas de vacinação até então utilizados. Os vvIBDV descritos na Europa se disseminaram pelo mundo (com exceção dos EUA) e, a partir daí, os altos títulos de imunidade materna tornaram-se um entrave para o estabelecimento de um programa de vacinação eficaz, uma vez que a interferência dos anticorpos passivos sobre a vacinação precoce passou a ser questionada.

Existem poucas informações disponíveis na literatura sobre a vacinação *in ovo* para o controle da DG, e muitas delas com resultados contraditórios, necessitando-se de mais pesquisas na área para elucidar a questão.

Tendo em vista que episódios de DG tornaram-se cada vez mais freqüentes em plantéis comerciais oriundos de matrizes vacinadas, necessita-se de alternativas para a vacinação que permitam o aproveitamento da proteção passiva, bem como a geração precoce da imunidade ativa. O objetivo neste trabalho foi comparar as vias de aplicação vacinal *in ovo*, no primeiro ou no 15<sup>o</sup> dia de idade, em progênies descendentes de matrizes vacinadas, ou não vacinadas, com vacina oleosa contra a DG, avaliando-se as taxas de detecção do genoma do IBDV por RT-PCR e a resposta imune humoral (soroneutralização).

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. A doença de Gumboro

A DG foi descrita pela primeira vez em 1962, por Cosgrove, nos EUA, e o agente etiológico, o birnavírus da doença infecciosa bursal (IBDV), à época denominado "Agente Infeccioso Bursal", foi identificado por Winterfield e Hitchner no mesmo ano. As primeiras descrições da doença, realizadas nos EUA, relatavam um quadro de nefrite-nefrose e hemorragias associado a um quadro de imunossupressão como conseqüências da infecção (Ito et al., 2001).

No final da década de 60, foram descritas estirpes virulentas nos EUA e Inglaterra (estirpes IM/USA e 52/70 UK, respectivamente). Em meados da década de 70, introduziu-se no mercado a vacina viva atenuada em cultura de células (estirpe Lukert) administrada em pintos com um dia de idade (via subcutânea - SC), e via água de bebida às duas semanas de idade (Ito et al., 2001).

Na década de 80, passou-se a utilizar vacinas oleosas em reprodutoras, interrompendo-se a vacinação precoce dos pintos, com o objetivo de induzir altos títulos

de anticorpos maternos transferidos à progênie e protegê-la contra efeitos patogênicos e imunossupressores de uma exposição prematura aos vírus de campo. No início da década de 90, introduziram-se as vacinas vivas de virulência intermediária para vacinação de pintos de um dia com altos títulos de anticorpos passivos (títulos acima de 1500 no teste de soroneutralização), numa tentativa de provocar uma resposta imune precoce. Em 1985, foram descritos estirpes variantes capazes de infectar pintos com altos títulos de anticorpos maternos, provocando atrofia da bolsa cloacal (BC), devido à sua característica antigênica. Estas estirpes estão presentes em todo o território norte-americano, e são considerados hoje os tipos virais predominantes neste país (Ito et al., 2001).

O vírus da doença infecciosa bursal (IBDV – infectious bursal disease vírus) acomete principalmente pintos em sua fase de crescimento (nas primeiras duas semanas de idade), afetando a BC e causando um prejuízo no desenvolvimento e função da imunidade humoral (Allan et al., 1972), e depressão da resposta imune celular (Lucio e Hitchner, 1979 e Sivanandan e Maheswaran, 1981). Esta forma inaparente da doença é responsável por grandes perdas econômicas na produção avícola, devido ao fato de acarretar perda permanente da capacidade das aves afetadas de produzir adequadas respostas à vacinação e a patógenos oportunistas. Quando o IBDV acomete aves entre três e seis semanas de idade, pode desencadear o aparecimento da doença clínica, com período de incubação de dois a três dias, causando alta mortalidade e queda no desempenho produtivo (Ito et al., 2001).

A doença pode ser definida pelo quadro clínico de três formas:

- Forma clássica: primeira forma a ser descrita, é causada por estirpes clássicas do vírus, caracterizada por mortalidade de até 30% (quando acomete aves entre três e seis semanas de idade), queda no desempenho, severa inflamação e necrose da BC, que precede a atrofia bursal por

aproximadamente sete dias (Lukert e Hitchner, 1984).

- Forma subclínica: é encontrada principalmente nos EUA, sendo caracterizada pela baixa patogenicidade das estirpes variantes (Delaware A e E), que são capazes de resistir parcialmente à neutralização pelos anticorpos “clássicos” (Jackwood e Saif, 1987; Snyder, 1990).

- Forma aguda: é causada pelos vvIBDV, desencadeando a doença em sua forma clínica aguda, e, conseqüentemente, altas taxas de mortalidade nos lotes afetados (Chettle et al., 1989; Van der Berg et al., 1991; Eterradossi et al., 1992; Di Fábio et al., 1999b; Tsukamoto et al., 1999).

## 2.2. O agente

O IBDV é um vírus RNA de fita dupla (*ds*-RNA), pertencente à família *Birnaviridae*, gênero *Avibirnavirus*. O vírus não é envelopado, possui morfologia icosaédrica e seu capsídeo é formado por 32 capsômeros compostos de quatro polipeptídeos estruturais maiores (Dobos et al., 1979), possuindo aproximadamente 58-65 nm de diâmetro (Cheville, 1967). Existem dois sorotipos (1 e 2), com 30% de homologia antigênica. O sorotipo 1 é patogênico para galinhas, e tem sido isolado de patos e perus sem causar doença. O sorotipo 2 é normalmente encontrado em perus, mas eventualmente pode infectar patos e galinhas, é apatogênico e não causa imunossupressão em nenhuma das espécies citadas. Os IBDVs pertencentes ao sorotipo 1 podem ser classificados em dois subtipos (clássicos ou variantes), de acordo com sua patogenicidade. Os subtipos clássicos podem ser classificados como vírus de baixa ou moderada virulência, vírus virulentos ou vírus muito virulentos (vvIBDV). Já os subtipos variantes podem ser classificados como vírus de baixa ou moderada virulência (Ito et al., 2001). Seu genoma é composto de dois segmentos, um menor (2800pb) denominado de B e outro maior (3400 pb) denominado de A. As proteínas virais estruturais VP3, VP4 e VP5 são codificadas pelo segmento A, inclusive a proteína VP2, que está relacionada com a

indução de anticorpos neutralizantes. Anticorpos específicos para VP2 permitem a diferenciação dos sorotipos e subtipos virais. O segmento B é responsável pela codificação da proteína VP1, de 90 kDa,

denominada RNA polimerase viral, e desempenha importante função no encapsulamento das partículas virais (Van der Berg, 2000). A organização genômica do IBDV está representada na figura 1.

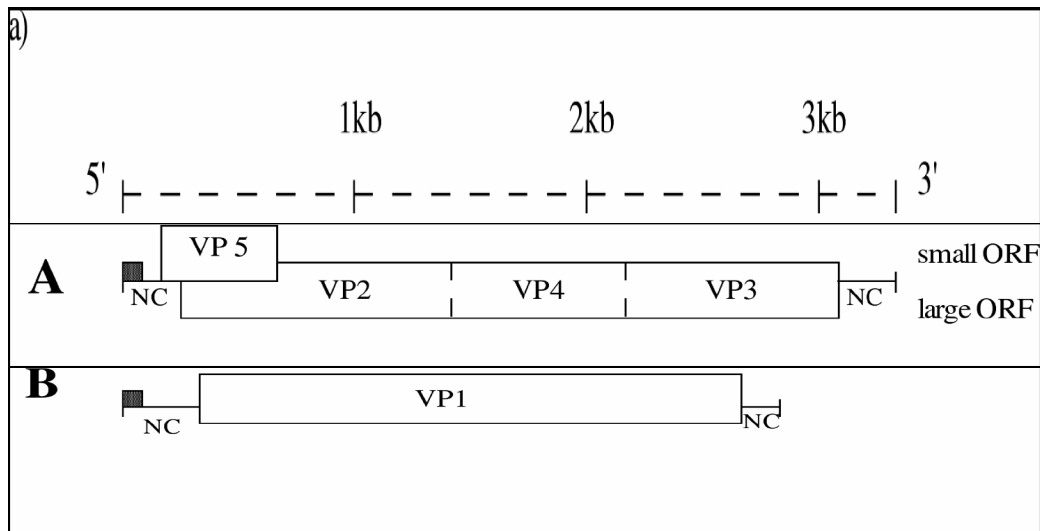


Figura 1. Organização genômica do IBDV.

O IBDV é muito estável, capaz de resistir a tratamentos com clorofórmio e éter. É inativado em pH 12, mas não em pH 2 e é capaz de resistir a 56°C por cinco horas. O vírus persiste no ambiente onde pintos infectados foram alojados por mais de 122 dias (Benton et al., 1967), mesmo após limpeza e desinfecção (Lukert e Hitchner., 1984).

### 2.3. Histórico da doença de Gumboro no Brasil

A doença foi descrita pela primeira vez por Nakano et al. (1972), e o primeiro relato de isolamento viral foi feito por Saukas (1978). A vacinação com estirpe atenuada em células (Lukert) passou a ser realizada no início da década de 80, e, em meados desta, ocorreu a introdução das vacinas oleosas nas reprodutoras, mantendo-se a utilização de vacinas suaves na progênie, introduzindo-se vacinas intermediárias para revacinações. Na década de 90, foram introduzidas as vacinas do tipo "forte" (CBM-forte) para revacinações, com objetivo de

imunizar aves com altos títulos de anticorpos passivos (Ito et al., 2001).

Os primeiros casos de alta mortalidade devido a DG no Brasil foram observados em meados de 1997 (Di Fábio et al., 1999 a,b). O surto foi causado por um vírus do grupo molecular 11 (amostra 2050/97 - Gm 11 - Simbios), semelhante vvIBDV descrito na Europa em 1989, e classificado como tal. Foram descritas também estirpes pertencentes ao grupo molecular 15, que apresentavam quadro subclínico de baixa patogenicidade (Ikuta et al., 2001). Desde então, vários tipos de vacinas intermediárias "plus" passaram a ser utilizadas em frangos de corte, tais como Bursine plus® (estirpe Lukert) e Nobilis Gumboro 228 E® (estirpe 228 E) para tentar controlar os surtos de Gumboro de alta virulência no país. Entre 2000 e 2001, diversas outras vacinas do tipo "forte" foram introduzidas no país, dentre elas podemos citar: Avimune F® e Gumbor-Vet forte® (estirpe Moulthrop G-603), Cevac IBD-L (estirpe Winterfield 2512) e Poulvac Bursa F (estirpe V877).

Diversas amostras já foram tipificadas por RT-PCR/RFLP, sendo mais prevalentes as dos grupos moleculares 15 (forma subclínica, controlada facilmente por vacinas tradicionais) e 11 (forma clínica aguda, não vem sendo corretamente controlada com os programas de vacinação atuais) (Ikuta et al., 2001). Ikuta et al. (1998) concluíram que as amostras isoladas de campo no Brasil apresentaram composição antigênica significativamente distinta das vacinas, cepas de referência e variantes norte americanas, dando origem a três novos grupos distintos. Gomes et al. (2005) estudaram o perfil antigênico de amostras vacinais e de campo isoladas em propriedades de Minas Gerais, e concluíram que as amostras de campo possuíam perfil de restrição diferente das amostras vacinais.

## **2.4. Programas de vacinação**

### **2.4.1. Importância dos anticorpos passivos**

Wyeth e Cullen (1976) determinaram que os anticorpos maternos pudessem prevenir infecções precoces pelos vírus clássicos, e que se a vacinação é realizada muito precocemente, os anticorpos maternos poderão não só intervir, como evitar uma imunização efetiva.

Lucio e Hichner (1979) estudaram em quais títulos de anticorpos passivos existe neutralização dos efeitos prejudiciais causados pelos vírus de campo e em qual momento estes títulos eram diferentes dos títulos necessários para prevenir imunossupressão causada pelos vvIBDV. Os autores concluíram que títulos médios abaixo de 800 no teste de soroneutralização não foram capazes de prevenir atrofia da BC quando o desafio foi realizado a partir de 10 dias de idade.

Para avaliar os efeitos da vacinação das matrizes sobre a proteção ao desafio da progênie, Goddart et al. (1994) trabalharam com reprodutoras vacinadas às 18-20 semanas com vacinas oleosas (matrizes com altos títulos de anticorpos) e vacinadas apenas com vacinas vivas na fase de recria (matrizes com baixos títulos). As matrizes vacinadas com vacina oleosa apresentaram

títulos de anticorpos, na fase do pico ou na fase final de produção, significativamente superiores aos de matrizes que receberam somente as vacinas vivas. Os pintos descendentes das matrizes vacinadas com vacina oleosa iniciaram sua fase de suscetibilidade ao desafio pelos vvIBDV aos 27 dias e se tornaram totalmente suscetíveis entre 37 e 40 dias de idade. Já pintos descendentes de matrizes não vacinadas iniciaram sua fase de suscetibilidade entre três e 10 dias e se tornaram totalmente suscetíveis entre 23 e 26 dias de idade. Estes resultados mostraram que existe uma grande variação nos títulos de anticorpos passivos na progênie.

Pintos de corte sem anticorpos para a DG, com títulos altos (725 no teste de precipitação em gel de Agar) ou baixos (111), foram submetidos ao desafio no 1<sup>o</sup>, 7<sup>o</sup> e 14<sup>o</sup> dia de vida. Os altos títulos de anticorpos passivos foram capazes de prevenir, quase que completamente, a imunossupressão (medida através dos títulos médios de anticorpos para Doença de Newcastle) e lesões teciduais na BC das aves desafiadas em todas as idades. As aves possuidoras de baixos títulos de anticorpos se mostraram parcialmente protegidas, e aves desprovidas de anticorpos passivos se mostraram totalmente suscetíveis (Wood et al., 1983).

Pintos de um dia de idade de mesma origem possuem variações nos títulos de anticorpos maternos (Snyder et al., 1985; Wyeth e Chettle, 1990; Van der Berg e Meulemans, 1991; Tsukamoto et al., 1995; Al Natour et al., 2004). Esta desuniformidade de anticorpos faz com que as aves se tornem suscetíveis à infecção pelo vírus vacinal em diferentes períodos (Wyeth et al., 1981; Naqi et al., 1982). No entanto, quando a vacinação precoce não é realizada, os vírus de campo podem infectar os pintos que apresentam baixos títulos de anticorpos maternos, resultando em altas cargas virais no ambiente de criação. Portanto, deixando-se lotes atingirem baixos níveis de anticorpos maternos, sem a devida indução de resposta ativa, produz-se aumento do desafio local de vírus de campo, o que irá

ocasionar uma competição desfavorável com o vírus vacinal (Van der Berg, 1991).

Maas et al. (2001) concluíram que os títulos mínimos de 512 no teste de soroneutralização, em frangos de corte de duas semanas de idade, são capazes de proteger contra sinais clínicos causados pelo desafio com cepas clássicas e muito virulentas (52/70 e D 6948 respectivamente). Porém, nem títulos superiores a 2048 foram capazes de impedir severa lesão da BC causada pelo desafio com as estirpes citadas, resultando em depleção severa dos linfócitos bursais.

De acordo com Al Natour et al. (2004), pintos descendentes de matrizes vacinadas com vacinas oleosas no período pré-postura, possuem maior resistência ao desafio com estirpe variante IN-IBDV, até 28 dias de idade, do que aves descendentes de matrizes com baixos títulos de anticorpos passivos (médias menores que 1500 nos pintos ao nascimento).

#### 2.4.2. Influência dos anticorpos passivos sobre as vacinações

Em relação à neutralização do vírus vacinal pelos anticorpos passivos, Naqi et al. (1982) trabalharam com matrizes não vacinadas e vacinadas às 18 semanas de idade com vacina oleosa, para avaliar a taxa de declínio dos anticorpos passivos na progênie, e sua interferência sobre a resposta às vacinas de patogenicidade suave e intermediária, aplicadas no dia do nascimento ou no 13<sup>o</sup> dia de vida. Avaliaram também a resposta ao desafio de aves descendentes de matrizes vacinadas e não vacinadas. A vacinação oleosa induziu a produção de altos títulos (títulos médios de 100000 no teste de soroneutralização) de anticorpos maternos durante todo o período de criação das matrizes. Pintos descendentes de matrizes vacinadas apresentaram perfil de anticorpos semelhante ao descrito nas matrizes, mostrando que a transferência de imunidade passiva apresenta perfil paralelo e constante. Os pintos vacinados ao nascimento, ou no 13<sup>o</sup> dia de vida, descendentes de matrizes vacinadas, não

apresentaram resposta imune ativa à vacinação independente da estirpe utilizada. Por outro lado, pintos descendentes de matrizes não vacinadas apresentaram resposta imune ativa, com produção de anticorpos, mostrando que altos níveis de anticorpos maternos foram capazes de neutralizar tanto as vacinas suaves quanto intermediárias.

Com o objetivo de avaliar a proteção dos anticorpos maternos ao o desafio com as cepas vvIBDV e a interferência dos anticorpos passivos sobre a vacinação no campo, Van der Berg e Meulemans (1991) trabalharam com pintos de corte descendentes de matrizes de corte com altos títulos de anticorpos (média de 1500 no teste de soroneutralização) vacinadas na fase de recria com vacinas vivas e no período pré-postura com a vacina oleosa, e matrizes com baixos títulos (média de 28 no teste de soroneutralização) vacinadas apenas na fase de recria com vacina viva. Os pintos das matrizes vacinadas e não vacinadas foram imunizados no 14<sup>o</sup> ou 21<sup>o</sup> ou 28<sup>o</sup> dias de idade com vacinas intermediárias (D78 ou SAL Bursine- 2) ou suave (PGB 98). Os resultados demonstraram que a vacinação de pintos até os 28 dias, com altos títulos de anticorpos maternos, foi ineficaz. Altos títulos de anticorpos passivos foram capazes de proteger contra mortalidade devido ao desafio com vvIBDV (estirpe 849VB), mas não foram capazes de impedir lesões à BC das aves desafiadas, mostrando que a doença pode se instalar em sua forma subclínica, mesmo em lotes com altos níveis de anticorpos passivos.

Outros trabalhos têm demonstrado também que a vacinação precoce (no 1<sup>o</sup> ou no 7<sup>o</sup> dia de idade) de pintos de corte com altos títulos de anticorpos passivos (média de títulos acima de 1000 no teste de soroneutralização), mesmo utilizando vacinas intermediárias, não induziu uma resposta imune ativa, confirmando que existe interferência dos altos títulos de anticorpos maternos sobre a vacinação precoce (Sharma, 1985; Wyeth e Chettle, 1990; Knoblich et al., 2000; Kumar et al., 2000; Tessari et al., 2000; Alam et al., 2002;

Ahmed et al., 2003; Ahmed e Akhter, 2003; Bolis et al., 2003 e Hair-Bejo et al., 2004).

Moraes et al. (2005) avaliaram a influência dos anticorpos maternos sobre a resposta à vacinação de pintos (com um dia de idade) desafiados com estirpe de campo de alta virulência isolada no Brasil e pertencente ao grupo molecular 11 (G 11). As aves vacinadas com vacina intermediária (Bursine 2) no primeiro dia de vida, descendentes de matrizes vacinadas, não apresentam resposta imune ativa à vacinação, demonstrando proteção contra os sinais clínicos causados pelo desafio, mas não contra os danos causados pelo vírus sobre os tecidos da BC.

Em relação à vacinação precoce em pintos descendentes de matrizes não vacinadas, Muskett et al. (1979) demonstraram que aves SPF, quando vacinadas precocemente, estavam completamente protegidas ao desafio com vvIBDV, enquanto que aves comerciais (altos títulos de anticorpos passivos) não apresentam proteção contra o referido desafio. Resultados semelhantes foram encontrados por Allan et al. (2002) e Rautenschlein et al. (2005), sendo que estes autores trabalharam com aves comerciais. De acordo com Van der Berg et al. (1991), quatro dias após a vacinação de aves SPF com vacina intermediária (estirpe D78), já se pode notar alta proteção contra desafio com vvIBDV (amostra 849VB), mostrando que, mesmo antes da produção de anticorpos neutralizantes, a vacinação é capaz de induzir adequada proteção.

Lukert (1994) demonstrou que alguns vírus vacinais de diferentes estirpes são capazes de residir na BC de pintos 14 dias após a vacinação, mesmo na presença de anticorpos maternos.

O monitoramento dos títulos de anticorpos maternos nos pintos, para prever qual o melhor momento para se realizar a vacinação, tem sido proposto por diversos autores (Van der Berg, 1991; Tsukamoto et al., 1995; Alam et al., 2002; Ahmed et al., 2003; Bolis et al., 2003; Rautenschlein et al., 2005). As vacinas fortes são capazes de

romper títulos mais elevados de anticorpos maternos do que as vacinas intermediárias, e ambas, maiores do que as vacinas suaves. Estas informações servem de orientação para a escolha do tipo de vacina a ser utilizada e qual a melhor idade para a vacinação (Di Fabio, 2001). Alguns autores recomendam que pintos descendentes de matrizes vacinadas com vacina oleosa sejam vacinados com vacinas intermediárias ou fortes a partir do 14<sup>o</sup>, 21<sup>o</sup> ou 28<sup>o</sup> dia de vida, dependendo dos títulos de anticorpos maternos encontrados nos pintos de um dia (Lucio e Hitchner, 1979; Van der Berg, 1991; Rautenschlein et al., 2005). Porém, mesmo as vacinas mais fortes só conseguem ultrapassar a barreira de anticorpos maternos quando os níveis se encontram abaixo dos níveis protetores (abaixo de 1000 no teste de soroneutralização) contra vvIBDV, abrindo portas para instalação da doença em aves suscetíveis (Sayd et al., 2004).

Alguns autores acreditam que ao se conhecer a origem do plantel e seu perfil sorológico, com títulos de anticorpos altos e uniformes, não é necessária a vacinação com um dia de idade (Van der Berg e Meulemans, 1991; Knoblich et al., 2000; Kumar, 2000; Ahmed e Akhter, 2003; Ahmed et al., 2003; Bolis et al., 2003). Na Bélgica, a vacina oleosa foi eliminada das reprodutoras para facilitar o uso de vacinas intermediárias na progênie, conseguindo assim uma significativa redução da doença (Van der Berg et al., 1996). No Brasil, a introdução de vacinas do tipo forte (1990-1996), associada ao uso de imunidade passiva elevada sem ainda ter tido notificação da presença de vvIBDV no país, precedeu a emergência deste em 1997, porém, esta estratégia vem sendo utilizada com intuito de promover resposta imune ativa, quando em presença de altos títulos de anticorpos passivos (Ito et al., 2001).

Bolis et al. (2003) demonstraram que a utilização de vacinas fortes (estirpe Moulthrop G603) ou intermediárias "plus" (estirpe 228 E) aos 14 dias de idade, em pintos com altos títulos de anticorpos passivos (média de títulos de 3500 no teste de soroneutralização, no nascimento), foi

eficiente na geração de resposta imune humoral e proteção ao desafio com estirpes brasileiras de alta virulência 2050/97. Trabalhos semelhantes foram realizados por Ahmed et al. (2003) e Ahmed e Akhter (2003).

Os autores citados a seguir questionam a utilização de vacinas intermediárias “plus” ou fortes, uma vez que estas estirpes possuem capacidade de permanecer no ambiente após diversas criadas (Tsukamoto et al., 1995), e possuem perfil de infecção muitas vezes semelhante às estirpes de campo virulentas (Lucio e Hitchner, 1979; Naqi et al., 1982; Bolis et al., 2003; Rautenschlein et al., 2005), podendo causar a doença em sua forma subclínica, principalmente em aves suscetíveis.

A vacinação de pintos de corte contra DG, aos 14 dias de idade (com estirpe de patogenicidade intermediária), com altos títulos de anticorpos maternos (acima de 1000 no teste de soroneutralização) prejudicou o ganho de peso dos frangos aos 42 dias de idade (Sahar et al., 2004). Talebi et al. (2005) também encontraram resultados semelhantes, porém, avaliando a utilização de vacinas contra Bronquite Infecciosa das Galinhas.

#### 2.4.3. Vacinação *in ovo* para doença de Gumboro

Numa tentativa de solucionar estas questões, países como EUA, Inglaterra, Holanda, Dinamarca, Brasil, dentre outros, estão passando a utilizar a vacinação *in ovo*. Vacinação *in ovo* contra a doença de Marek tem sido realizada com segurança e sucesso em várias partes do mundo, inclusive no Brasil (Sharma, 1985; Whitfill et al., 2002). Em relação à utilização de vacinas contra IBDV, alguns estudos têm sido realizados.

Sharma (1985) avaliou a eficácia e segurança da utilização de vacinas suaves (estirpes TC e BVM) e intermediárias (estirpes BV e 2512) em aves SPF e em aves comerciais (com altos títulos de anticorpos passivos). O autor verificou que a vacinação de aves SPF com estirpes

suaves, quando realizada no 18<sup>o</sup> dia de incubação, não afetou a eclodibilidade nem a viabilidade na primeira semana de vida, diferentemente das vacinas intermediárias. Os pintos SPF vacinados tanto *in ovo*, quanto no primeiro dia de vida com vacinas suaves, sofreram lesões de BC menos acentuadas do que aves vacinadas com vacinas intermediárias. Foi verificado também que os títulos de anticorpos dos pintos SPF pós-vacinação *in ovo*, com vacinas suaves, foram menores que de aves vacinadas no primeiro dia. Em relação à proteção ao desafio com estirpe virulenta (IM IBDV), os pintos comerciais (com altos níveis de anticorpos passivos) vacinados no primeiro dia com vacinas suaves, se mostraram menos protegidos ao desafio do que pintos vacinados *in ovo*. Apenas as aves que receberam vacina intermediária (estirpe 2512), tanto *in ovo*, quanto no primeiro dia tiveram boa proteção frente ao desafio. Além disto, o autor verificou também que a utilização de vacinas conjugadas (vírus da Doença de Marek associada a vírus da DG) não afetou a eficácia da vacina para ambos os agentes testados.

Utilizando vacinas conjugadas aplicadas em pintos SPF, Gagic et al. (1999) observaram que a vacina bivalente Marek/Gumboro foi capaz de induzir altos títulos de anticorpos para ambos os agentes testados (média de 3640 para DG no teste de ELISA) e oferecer proteção frente a desafio com vírus virulento (estirpe IM IBDV).

De acordo com Giambone et al. (2001), a vacinação de embriões SPF no 18<sup>o</sup> dia de incubação, com doses completas de vacinas intermediárias, prejudicou tanto a eclodibilidade, quanto a viabilidade das aves até a terceira semana de idade, além de ter induzido graves lesões nos tecidos da BC. Quando se diminuiu a dose da vacina pela metade, os efeitos prejudiciais sobre eclosão e viabilidade desapareceram, mas as lesões nos tecidos da BC permaneceram, sendo que pintos comerciais foram mais resistentes e se recuperaram mais rapidamente das lesões teciduais do que aves SPF. A vacinação *in ovo* produziu uma proteção significativa

contra desafio com estirpe virulenta clássica (APHIS) e variante (Delaware E). Também, Corley et al. (2001) observaram que a vacinação *in ovo* com estirpes de patogenicidade intermediária aumentaram a taxa de mortalidade na primeira semana de idade.

Segundo Coletti et al. (2001), a vacinação *in ovo*, tanto de aves SPF, quanto de aves comerciais com vacina intermediária (estirpe D78), não influenciou negativamente a eclodibilidade, nem a viabilidade das aves na primeira semana de idade. Além disto, a vacinação *in ovo* não foi capaz de induzir resposta imune ativa em aves comerciais, mostrando que altos títulos de anticorpos maternos (média de 3500 no teste de ELISA) podem neutralizar os vírus vacinais. De acordo com Corley et al. (2002), a utilização de vacinas intermediárias (estirpe 2512) *in ovo*, em aves comerciais, não foi capaz de induzir resposta imune humoral ativa, mesmo quando as aves vacinadas se mostravam positivas frente às provas de RT/PCR realizadas entre três e seis dias pós-vacinação.

Rautenschlein e Hasse (2005) verificaram que os pintos vacinados *in ovo* com vacinas intermediárias (Bursine-2) possuem recuperação das lesões nos tecidos da BC mais rápidas do que os pintos vacinados no 14<sup>o</sup> dia de vida, devido a um menor acúmulo de células T (CD4+ e CD8+) na BC pós-vacinação, avaliadas por imunohistoquímica. Corley et al. (2001) relatou que o aumento na concentração de células T na BC pós-infecção pelo IBDV está relacionado com o aumento na gravidade das lesões teciduais, proporcionando um retardo na recuperação destas lesões.

A partir do ano de 2000, uma nova vacina contendo um complexo vírus-anticorpo tem sido alvo de intensa pesquisa em todo o mundo. Esta se baseia na inoculação *in ovo*, ou no primeiro dia de vida, de anticorpos específicos para IBDV mesclados com uma “proporção adequada” de vírus vacinal. Esta combinação parece garantir a preservação do IBDV em presença de altos títulos de anticorpos passivos, uma vez que

relata-se a capacidade deste imuno-complexo em se alojar em sítios privilegiados do sistema imune, como as células dendríticas foliculares presentes nos centros germinativos dos órgãos imunes. De acordo com Corley et al. (2001), esta vacina (estirpe 2512 mesclada com adequados níveis de anticorpos - IBDV-ICX), quando administrada *in ovo* à aves SPF, causou menor mortalidade na primeira semana do que a vacina intermediária convencional testada (estirpe 2512). Além disto, IBDV-ICX apresentou capacidade de atrasar a replicação do vírus em órgãos alvo, porém, este atraso não foi capaz de prevenir um quadro de imunossupressão decorrente desta replicação, mesmo que tardia.

De acordo com Iván et al. (2001), a vacinação *in ovo* com vacina contendo imuno-complexo (Cevac transmune IBD vaccine: IBDV-BDA) foi causadora da depleção de folículos bursais das aves vacinadas, porém, aves comerciais apresentaram depleção bursal mais tardia, menos severa e durante menor tempo quando comparadas a aves SPF. A explicação dada pelos autores é de que os anticorpos passivos presentes nas aves comerciais poderiam ter neutralizado parcialmente o vírus vacinal, reduzindo a severidade das lesões encontradas nas BC destas aves. Os autores descreveram também o perfil sorológico de pintos comerciais vacinados no 18<sup>o</sup> dia de incubação com IBDV-BDA, mostrando que os títulos de anticorpos decresceram até 26 dias de idade, permaneceram indetectáveis até 34 dias, e, a partir daí, começaram a aumentar até atingir altos títulos aos 42 dias de idade.

Corley e Giambrone (2002) demonstraram que a vacina IBDV-ICX, quando administrada no 18<sup>o</sup> dia de incubação em aves SPF, resultou em menor imunossupressão da resposta imune celular, nas fases iniciais de infecção, do que a vacina intermediária convencional testada (estirpe 2512).

Coley et al. (2002) demonstraram que aves comerciais, descendentes de matrizes vacinadas, não foram capazes de montar

uma adequada resposta imune humoral frente à vacinação *in ovo*, tanto com vacina convencional (amostra 2512) quanto com vacina contendo imuno-complexo (IBDV-ICX).

Hassangadeh et al. (2006) compararam a vacinação *in ovo* e no primeiro dia, com vacina contendo imuno-complexo, e concluíram que tanto aves comerciais (altos títulos de anticorpos passivos) vacinadas *in ovo*, quanto aves comerciais vacinadas no primeiro dia, apresentaram títulos de anticorpos decrescentes até os 21 dias de idade. Porém, a partir de 21 dias, ambos os grupos apresentaram aumento significativo de anticorpos quando comparadas ao grupo controle (não vacinados).

### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1. Locais**

O experimento foi dividido em duas etapas. Uma para a avaliação dos efeitos da imunidade materna sobre as respostas imunológicas às vacinas contra a DG, e a outra para avaliar os efeitos das vacinas sobre o desempenho dos frangos.

Foram utilizadas matrizes pesadas da linhagem Avian Cobb da empresa Rio Branco Alimentos S/A, localizada no município de Pitangui – Minas Gerais (MG). Os ovos produzidos por estas matrizes foram incubados no incubatório comercial de propriedade da empresa Nogueira Rivelli Irmãos LTDA, localizado no município de Mateus Leme – Minas Gerais (MG).

A criação dos frangos de corte foi realizada na Fazenda Experimental “Prof. Hélio Barbosa” da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), no município de Igarapé. As análises de sorologia foram realizadas no laboratório de diagnóstico Laudo Laboratório Avícola, localizado na cidade de Uberlândia – MG.

As análises de RT/PCR foram realizadas no laboratório de Doença das Aves localizado no Departamento de Medicina Veterinária

Preventiva da Escola de Veterinária da UFMG e no Laboratório de Virologia Comparada (LVC) do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG.

#### **3.2. Matrizes**

Foram utilizadas 2800 matrizes pesadas com 18 semanas de idade, as quais foram divididas em dois grupos de 1400 aves cada. O grupo 1 foi constituído por matrizes que receberam a vacina tríplice oleosa contra DG, Newcastle e Bronquite Infeciosa às 18 semanas de idade, e o grupo 2 por matrizes que não receberam a vacina tríplice oleosa citada.

Ambos os grupos receberam vacina viva intermediária para DG com três e oito semanas de idade via água de bebida.

As matrizes foram alojadas em diferentes boxes de um mesmo galpão e criadas de acordo com as recomendações do manual da linhagem.

#### **3.3. Ovos**

Os ovos férteis foram coletados quando as matrizes atingiram 32 semanas de idade. Em dois de postura, foram coletados 4320 ovos, sendo 2160 ovos do grupo que recebeu a vacina oleosa e 2160 ovos do grupo somente vacinado com a vacina viva. O manejo, a seleção e a desinfecção destes ovos seguiram as recomendações da empresa.

#### **3.4. Incubação e vacinação dos pintos**

Os ovos foram incubados em uma empresa comercial, obedecendo as recomendações de rotina do incubatório.

Com 436 horas de incubação (18 dias e 4 horas), todos os ovos foram transferidos para a sala de vacinação *in ovo* onde os ovos de todos os tratamentos receberam vacinação para doença de Marek *in ovo*, com exceção dos ovos dos tratamentos E e F que receberam vacina bivalente para Marek/Gumboro. Após a vacinação todos os ovos foram transferidos para bandejas de

eclosão devidamente identificadas de acordo com os tratamentos e colocados na no nascedouro, onde permaneceram até completar o total de 498 horas. (20 dias e 18 horas).

Após o nascimento foi realizada a sexagem, sendo separados para o experimento apenas pintos fêmeas, os quais foram acomodados em caixas de papelão identificadas de acordo com os tratamentos. Os pintos dos tratamentos vacinados no

primeiro dia, descendentes de matrizes vacinadas e não vacinadas, foram vacinados via subcutânea contra a DG, imediatamente após a eclosão.

### 3.5. Tratamentos

Os tratamentos, definidos de acordo com o uso ou não da vacina oleosa na matriz e com a via e idade de vacinação dos pintos, encontram-se na tabela 1.

Tabela 1 – Descrição dos tratamentos de acordo com o uso ou não de vacina oleosa na matriz e via e idade de vacinação dos pintos

Sigla	Tratamentos
A	Pintos vacinados no primeiro dia, descendentes de matrizes vacinadas
B	Pintos vacinados no 15 <sup>o</sup> dia de vida, descendentes de matrizes não vacinadas
C	Pintos vacinados no 15 <sup>o</sup> dia de vida, descendentes de matrizes vacinadas
D	Pintos vacinados no primeiro dia, descendentes de matrizes não vacinadas
E	Pintos vacinados <i>in ovo</i> , descendentes de matrizes não vacinadas
F	Pintos vacinados <i>in ovo</i> , descendentes de matrizes vacinadas

### 3.6. Programas de vacinações utilizados nas matrizes, *in ovo* e nos pintos no primeiro ou 15<sup>o</sup> dia de idade

#### 3.6.1. Programas de vacinação nas matrizes:

3<sup>a</sup> semana de idade: Bursine-2 – vacina liofilizada, estirpe Lukert, intermediária, atenuada em cultivo celular, administrada via água de bebida.

8<sup>a</sup> semana de idade: Bursine-2 – vacina liofilizada, estirpe Lukert, intermediária, atenuada em cultivo celular, administrada via água de bebida.

18<sup>a</sup> semana de idade: Bigopest – vacina inativada contra Doença de Newcastle, Bronquite Infecciosa das Galinhas, e Doença de Gumboro (estirpe VMJO/USA), administrada via intramuscular.

#### 3.6.2. Programa de vacinação *in ovo*:

Herpesvírus de peru (HVT) associada a IBDV S706 (congelada) – vacina viva atenuada contra doença de Marek e doença de Gumboro (intermediária).

Título de HVT (informado pelo Laudo Laboratório Avícola): 9600 unidades formadoras de placa (PFU)/dose.

Título de IBDV S706 (informado pelo Laudo Laboratório Avícola): 10<sup>3,50</sup> TCID<sub>50</sub> dose.

Marek HVT (congelada) – vacina viva atenuada contra doença de Marek.

Título de HVT (informado pelo Laudo Laboratório Avícola): 12200 PFU/dose.

#### 3.6.3. Programas de vacinação no primeiro ou no 15<sup>o</sup> dia de idade:

BUR 706 (liofilizada) – vacina viva atenuada contra doença de Gumboro (intermediária).

Título de Gumboro (informado pelo Laudo Laboratório Avícola): 10<sup>4,10</sup> TCID<sub>50</sub> dose.

### 3.7. Metodologias de vacinação

#### 3.7.1. Vacinação *in ovo*

Para a vacinação *in ovo* aos 18 dias e quatro horas de incubação, foi empregado o

sistema Inovoinject® da Embrex. Este sistema permite a vacinação simultânea de até 160 ovos. O equipamento consiste em um sistema de múltiplas agulhas duplas, cujo perfurador perfura a casca e suas membranas em posição vertical, sobre o topo da câmara de ar, atingindo o líquido amniótico ou o músculo peitoral direito do embrião com a agulha de injeção interna, com o volume de 0,1 mL de vacina. Sensores múltiplos monitoram o fluxo de vacina, desinfetante e operação do sistema. Na vacinação, não foi utilizado antibiótico associado à vacina.

### 3.7.2. Vacinação no primeiro dia de vida

Para a vacinação no primeiro dia de vida, foi utilizado o sistema de vacinação manual *AccuVac* com o dispositivo *Twin Touch*®, que permite a vacinação manual de pintos de um dia no incubatório. Este sistema consiste em uma caixa de aço inoxidável contendo uma placa conjugada a seringa com volume de 0,2 mL de vacina, que é acionada por sistema de contato entre animal e máquina. Não foi utilizado antibiótico associado à vacina.

### 3.7.3. Vacinação no 15º dia de vida

A vacinação no 15º dia de vida via água de bebida, foi realizada da seguinte maneira: todas as aves foram submetidas a jejum hídrico prévio à vacinação de duas horas. O conteúdo do frasco da vacina liofilizada para DG (contendo 2000 doses) foi diluído em 68 litros de água sem cloro, contendo 136 gramas de leite em pó desnatado (2g de leite em pó/L de água). Em um período de 20 minutos, esta solução foi oferecida às aves diretamente no bebedouro pendular (um L de solução para 30 aves) e o tempo de consumo foi, em média, de 40 minutos. Após o total esvaziamento dos bebedouros, as aves retomaram seu acesso à água *ad libitum*.

## 3.8. Manejo dos frangos de corte

Os pintos foram alojados em galpões convencionais, dividido em boxes com área de 3m<sup>2</sup> cada. A densidade foi de 10

aves/m<sup>2</sup>. O aquecimento de um a 15 dias de idade foi feito com fornalhas a carvão. Foram utilizados bebedouros tipo copo de pressão até o 7º dia de idade, momento em que houve substituição para bebedouros pendulares automáticos, que permaneceram até o fim do experimento (um para cada box). Do primeiro ao 14º dias de idade foram usados comedouros tubulares com capacidade para 3 Kg de ração, e a partir do 15º dia estes foram substituídos pelos comedouros tubulares com capacidade para 20 Kg de ração, que permaneceram até o último dia de criação das aves.

O programa de luz utilizado durante o período de criação foi o seguinte: de um a cinco dias de idade com 24 horas de luz por dia, e de seis a 40 dias de idade somente luz natural. O período de criação foi de um a 40 dias de idade.

Com o objetivo de impedir passagem do vírus vacinal entre pintos vacinados (*in ovo* e com um dia) e não vacinados, as aves foram alojadas em galpões separados e distantes, sem acessos cruzados, havendo controle rigoroso de entrada de pessoas e equipamentos para e entre os galpões.

No galpão 1 foram alojados os pintos dos tratamentos B e C, os quais receberam a vacina contra DG via água de bebida, aos 15 dias de idade. No galpão 2 foram alojados os pintos dos tratamentos A, D, E e F, os quais foram vacinados para DG apenas no incubatório (*in ovo* ou logo após o nascimento).

### 3.8.1. Rações

Foram utilizados dois tipos de rações, na forma peletizada de acordo com as recomendações do manual da linhagem e as fases de criação, ou seja, fase inicial de um a 21 dias e de crescimento de 22 a 40 dias de idade. Os níveis nutricionais da dieta foram os mesmos utilizados pela empresa Rio Branco Alimentos S/A. Estes se encontram na tabela 2.

Tabela 2 - Níveis nutricionais das rações utilizados no experimento

Níveis nutricionais	Inicial	Crescimento
Proteína bruta (%)	22,06	20,35
Energia metabolizável (kcal/kg)	2950	3150
Cálcio (%)	0,92	0,90
Fósforo dispon. (%)	0,45	0,42
Lisina total (%)	1,26	1,19
Metionina total (%)	0,55	0,49
Metionina + cistina (%)	0,90	0,88
Sódio (%)	0,20	0,20

### 3.9. Avaliação sorológica

Para as avaliações sorológicas foram utilizadas 30 matrizes de corte e 240 pintos de corte fêmeas, distribuídos de acordo com os tratamentos.

#### 3.9.1. Imunidade humoral passiva

Com o objetivo de inferir a imunidade humoral passiva das progênes, avaliaram-se os títulos dos anticorpos das matrizes no momento da postura, por amostragem de sangue da veia braquial de 15 matrizes vacinadas e 15 matrizes não vacinadas às 18 semanas no segundo dia de coleta dos ovos.

Para avaliar os títulos de anticorpos maternos na progênie, foram coletadas amostras de sangue na veia jugular de 30 pintos descendentes de matrizes vacinadas, e 30 pintos descendentes de matrizes não vacinadas, um dia (24 horas) após o nascimento.

#### 3.9.2. Imunidade humoral ativa

Para avaliar a dinâmica da geração de anticorpos específicos para IBDV, foram coletadas amostras de sangue na veia braquial de 30 aves de cada tratamento (A, B, C, D, E e F) aos 10, 25 e 40 dias de idade para realização do teste de soroneutralização.

#### 3.9.3. Testes de soroneutralização

As amostras de soro coletadas e o soro controle foram pré-diluídos a 1:5 em meio de cultivo celular 199 sem bicarbonato de

sódio, contendo L-Glutamina, acrescido de antibióticos (sulfato de gentamicina, penicilina, sulfato de estreptomicina e anfotericina B). Após a diluição ambos foram transferidos para outra microplaca que não a placa teste e deixados em repouso por pelo menos 1 hora.

Na placa de teste foram adicionados 150 µL do mesmo meio de cultivo na 1ª fileira e demais respectivamente, e posteriormente as amostras foram diluídas na base 2 em placas de 96 wells. Foram adicionados a cada orifício 50 µL do IBDV (estirpe Mouthrop adaptada à célula). As placas permaneceram em repouso por uma hora à temperatura ambiente. Adicionou-se o bicarbonato à suspensão celular. Foram colocados 50µl da suspensão celular a todos os orifícios (com exceção da fileira 1). As microplacas foram incubadas em estufa de CO<sub>2</sub> a 37°C por 72 horas.

A leitura foi realizada em microscópio invertido (com aumento de 100X) marcando o título pelo número do orifício. O título de anticorpos de uma amostra é a recíproca da maior diluição onde houver 100% de neutralização, ou seja, onde não houve nenhum efeito citopático.

O teste foi validado pela média geométrica de todos os títulos obtidos com o soro controle (testado em todas as placas). A média obtida não deveria variar mais que 0,7 (log<sub>2</sub>) da média conhecida (padrão). Se houvesse variação maior que 0,7 o teste estaria inválido.

### 3.10. Provas moleculares (RT/PCR)

Para a avaliação por prova molecular (RT/PCR) foram utilizados 180 pintos distribuídos igualmente de acordo com os tratamentos, sendo identificados pelas siglas respectivas de cada tratamento e por uma numeração de 1 a 30 dentro de cada tratamento. Ou seja, amostras A1 até A30, para os pintos do tratamento A e assim respectivamente.

#### 3.10.1. Coleta de material

Para a amplificação e detecção do genoma do IBDV vacinal obtida por RT/PCR e eletroforese, respectivamente, determinouse a coleta de BC dos pintos 4 dias (96 horas) após a vacinação, uma vez que a BC é o sítio primário de replicação do IBDV. Para a realização das provas, foram coletadas BC de 30 aves de cada tratamento, numeradas de acordo com os respectivos tratamentos, como citado anteriormente. Para confirmar a ausência de desafio por IBDV no ambiente de criação das aves, um dia antes da vacinação aos 15 dias de idade, foram coletadas também BC de animais-controle, no galpão onde os frangos dos tratamentos B e C foram alojados. Este procedimento teve o objetivo adicional de detectar eventual escape do vírus vacinal entre os tratamentos.

Para a coleta das BC foram usadas tesouras autoclavadas, sendo uma tesoura para cada ave. A coleta foi realizada quatro dias (96 horas) após a vacinação para DG, em cada tratamento. As BC foram armazenadas em *ependorfs* individuais, devidamente identificados e acondicionados em temperatura de -20°C até o momento da realização dos exames.

#### 3.10.2. Extração do RNA

Para extração do RNA, foi escolhido o método utilizado por Gomes et al. (2005), da seguinte maneira: As BC foram submetidas

à trituração em gral e pistilos individuais estéreis, utilizando-se 1000µL de TNE (10mM Tris-HCl [pH 8,0], 100mM NaCl, 1mM ácido etilenediaminetetracético). Cerca de 250µL de cada amostra foram transferidos para um microtubo novo, aos quais foram adicionados, 750µL de Trizol LS (Invitrogen EUA), com completa homogeneização por agitação vigorosa, ficando em repouso por 10 minutos em TA, após o que foram centrifugadas (13000 X g/10 minutos/4°C) para separação de fases. Apenas o sobrenadante foi transferido para novo microtubo e adicionado a este 250µL de clorofórmio. Os tubos foram agitados vigorosamente por 15 segundos, incubados por 10 minutos em TA, e posteriormente centrifugados (13000 X/15 minutos a 4°C) para separação de fases. Neste procedimento o RNA fica solubilizado na fase aquosa superficial (branca) e o DNA e proteínas na fase orgânica (vermelha), sendo, por isto, o sobrenadante transferido cuidadosamente para novo microtubo, e a ele adicionado uma vez o volume de isopropanol, homogeneizando vagarosamente (inversão manual/ 10 vezes), ficando em repouso a -20°C por 12 horas. O RNA foi precipitado por centrifugação (13000 X/20 min/ 4°C) e o sobrenadante descartado. O sedimento (*pellet*) foi lavado por três vezes com etanol a 96% e centrifugado (13000 X g/5 min/ 4°C). Após secagem a 56°C por 15 minutos, o sedimento foi dissolvido em DMSO 90% e acondicionado a -20°C até o momento da transcrição reversa (TR).

#### 3.10.3. Oligonucleotídeos

Dois pares de oligonucleotídeos iniciadores, desenhados por Gomes et al. (2005), foram utilizados com o intuito de amplificar regiões parciais do segmento B do genoma do IBDV que codificam para a proteína VP1 do IBDV, região considerada como conservada do vírus. Os iniciadores LVC 126 e LVC 127 dão origem a um segmento de 588 pb do gene que codifica para proteína VP1 (Tabela 3).

Tabela 3: Oligonucleotídios, seqüências de bases, TM e localização no gene que codifica para a proteína VP1 do IBDV.

Iniciador	Seqüência (5'→3')	Gene	Localização genômica	TM (°C)	Sentido
LVC 126	CACGTTAGTGGCTCCTCT	VP1	28-45 <sup>‡</sup>	67	+
LVC 127	AGTGGCGACCTCCTTCAT	VP1	599-616 <sup>‡</sup>	67	-

+: sentido; -: antisenso; ‡: posição em relação ao segmento B do genoma do IBDV (Gomes et al., 2005); TM: temperature melting.

Os oligonucleotídios iniciadores foram sintetizados pela empresa INVITROGEN Life Technollogies (São Paulo, Brasil), e armazenados a -20°C em sua forma reconstituída (em tampão TE).

#### 3.10.4. Transcrição reversa (TR)

Os ciclos de temperaturas utilizados na técnica de RT/PCR para as regiões parciais dos genes que codificam para a proteína VP1 do IBDV foram desenvolvidos em diferentes etapas, através do kit SUPERSRIPT™ one step RT/PCR with PLATINUM® *Taq* (INVITROGEN Life technologies) ou do kit ImPROM II™ Reverse Transcriptase (PROMEGA CORPORATION). Ao término de cada extração, foi realizada a dosagem de RNA total por espectrofotômetro (Gene Quant), e os valores obtidos foram utilizados para padronizar a transcrição reversa de cada amostra testada. Os ciclos utilizados na transcrição reversa encontram-se esquematizados na figura 2.

A transcrição reversa utilizando a enzima SUPERSRIPT™ procedeu-se da seguinte maneira: 1,5µL de RNA (cerca de 5µg/µL de RNA) foi incubado, como descrito anteriormente, para desnaturação. Ao microtubo contendo o RNA foi adicionado 1µL de dNTP mix (10mM), 1µL do oligo LVC

127 e 8µL de H<sub>2</sub>O UP. Após homogeneização, a solução foi incubada a 65°C por cinco minutos e em gelo por dois minutos. Posteriormente, foram adicionados à solução 2µL de tampão de TR 10X, 4µL de MgCl<sub>2</sub> (25mM), 2µL de DTT (0,1mM) e, por último, 0,5µL de enzima SUPERSRIPT™. A solução foi cuidadosamente homogeneizada e incubada a 42°C por 60 minutos. Para inativação da enzima a solução foi incubada a 70°C por 15 minutos e estocada a -20°C até o momento de sua utilização.

A transcrição reversa utilizando a enzima ImPROM II procedeu-se da seguinte forma: 1,5µL de RNA foi incubado, como descrito anteriormente, para desnaturação. Ao microtubo contendo o RNA foram adicionados 2µL do oligo LVC 127 e 1,5µL de H<sub>2</sub>O UP. Após homogeneização, a solução foi incubada a 70°C por cinco minutos e em gelo por dois minutos. Posteriormente, foram adicionados à solução 4µL de tampão de TR 5X, 2,4µL de MgCl<sub>2</sub> (25mM), 1µL de dNTP mix (10mM), 6,6µL de H<sub>2</sub>O UP e, por último, 1,0µL de enzima ImPROM II. A solução foi cuidadosamente homogeneizada e incubada a 25°C por cinco minutos e a 42°C por 60 minutos. Para inativação da enzima a solução foi incubada a 70°C por 15 minutos e estocada a -20°C até o momento de sua utilização para a reação de PCR.

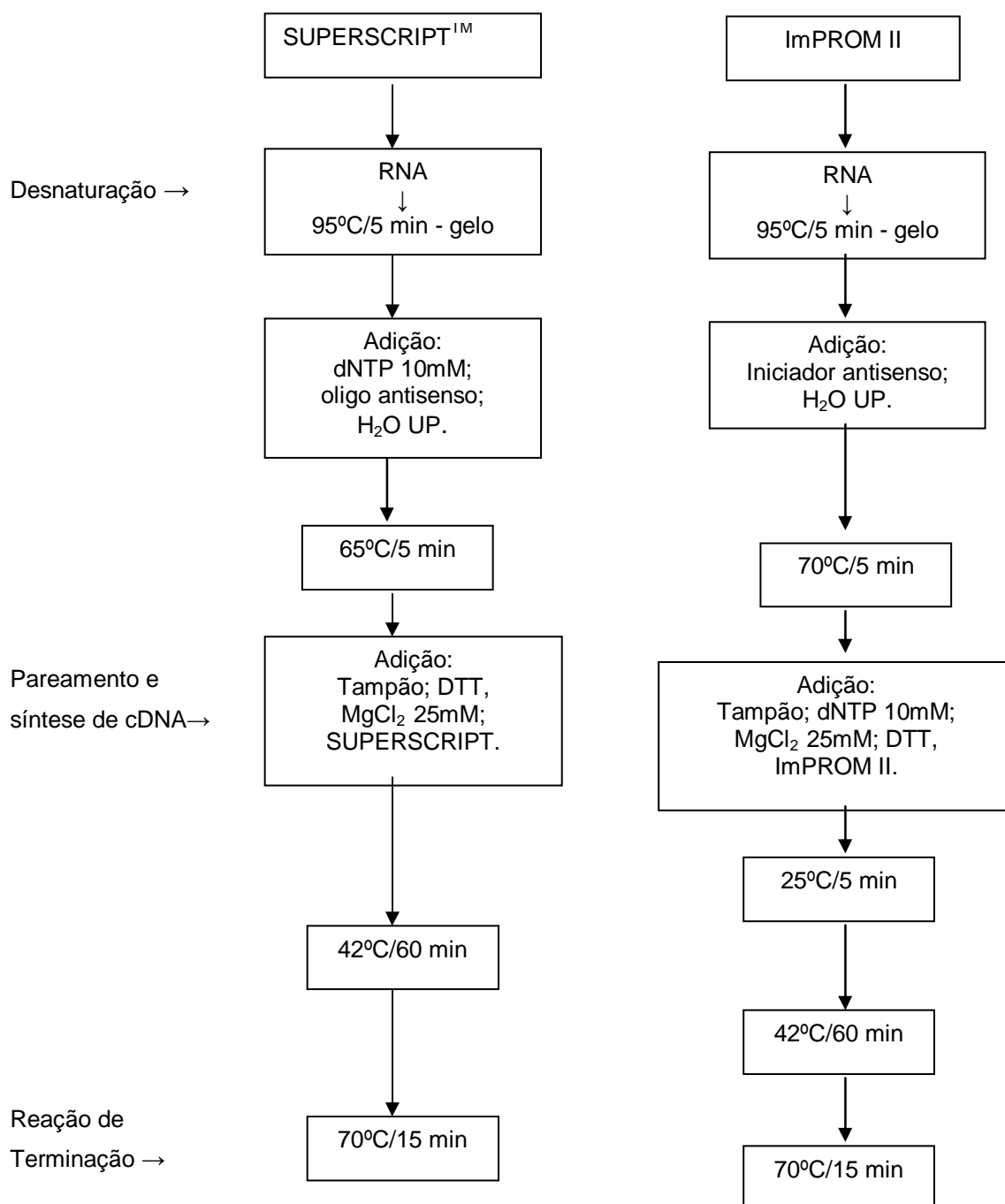


Figura 2. Fluxograma representativo do protocolo para transcrição reversa com as enzimas SUPERSCRIPT™ e ImPROM II.

### 3.10.5. Reação em cadeia da polimerase (PCR)

Para a PCR foi utilizado o ciclo estabelecido por Gomes et al. (2005). Inicialmente, foi utilizada uma amostra clínica de campo gentilmente cedida pelo LVC – UFMG, como controle positivo, para a padronização da PCR. Em seguida, algumas amostras utilizadas no experimento sabidamente positivas foram submetidas às provas de PCR com diferentes concentrações de cDNA para determinação da sensibilidade do teste e de um controle positivo. A partir daí, todas as outras amostras utilizadas no experimento foram submetidas à PCR de acordo com as concentrações estabelecidas por estas etapas. As reações foram conduzidas acondicionando-se as soluções em microtubos livres de RNase e DNase. A solução final, com volume de 25µL possuía 2,5µL de tampão PCR 10X, 0,75µL de MgCl<sub>2</sub> (50mM), 0,5µL dNTP mix (10mM), 1,0µL de oligo LVC 126, 1,0µL de oligo LVC 127, 0,25µL de *Taq* DNA polimerase, e 4,0µL de cDNA. Após homogeneização cuidadosa a solução final foi conduzida ao termociclador Minicycler™ (PTC-100, MJ. Research, EUA), conforme o programa definido por Gomes et al. (2005). O ciclo da reação de PCR utilizado encontra-se na tabela 4.

Tabela 4 – Programa de amplificação utilizado nas PCRs de parte do gene que codifica a proteína VP1 do IBDV

<b>Etapas da reação</b>	<b>Parâmetros utilizados</b>
Desnaturação	94°C/15 seg.
Pareamento	57°C/30 min.
Extensão	72°C/1 min.
Número de ciclos	30
Extensão final	72°C/5 min.

Gomes et al. (2005)

### 3.10.6. Eletroforese em gel de agarose

Após o ciclo de amplificação, à cada 13µL do produto amplificado foi adicionado 2µL de tampão de amostra (Blue/orange 6X Loading Dye (Promega, EUA)), e submetidos a eletroforese em gel de

agarose 1%, em tampão de corrida TBE 0,5 X (Tris-borato-EDTA). A corrida foi realizada em TA, com tempo médio de 40 minutos, em voltagem constante (100 V). Após a corrida, o gel foi corado com brometo de etídio (0,5µL/mg), por 20 minutos, em ambiente desprovido de luz, para a visualização dos fragmentos presentes no gel de agarose.

Para visualização dos fragmentos amplificados, utilizou-se transiluminador ultravioleta (254 nm – Pharmacia LKB MacroVue™, Amersham, EUA), e fotografado com câmera digital (Sony S40), e filtro laranja nº 15. Um marcador molecular *ladder* de 100 pb (INVITROGEN, Life Technologies, EUA), foi utilizado para determinação do tamanho dos produtos da PCR em cada corrida.

### 3.11. Delineamento experimental

Para avaliação sorológica e de biologia molecular (RT/PCR) o delineamento foi inteiramente ao acaso com arranjo fatorial 2x3, onde cada ave foi considerada uma repetição. Foram utilizadas 30 repetições por tratamento.

Todos os dados obtidos foram submetidos inicialmente aos testes de Lilliefor (normalidade) e Cochran e Bartlett (homogeneidade), e posteriormente, submetidos à análise de variância. As diferenças entre as médias foram analisadas pelo teste Kruskal-Wallis, Mann-Witney (para os dados de sorologia) ou  $\chi^2$  (para os dados da PCR).

### 3.12. Desempenho produtivo dos frangos de corte

Para a avaliação do desempenho produtivo dos frangos de corte foram utilizados 1080 pintos fêmeas, distribuídos de acordo com os tratamentos, sendo um grupo de 30 aves considerado uma repetição. Foram utilizadas seis repetições por tratamento.

### 3.12.1. Parâmetros avaliados

#### 3.12.1.1 Peso médio (PM):

Todas as aves foram pesadas aos 7, 21 e 40 dias de idade, obtendo-se o peso médio acumulado, nos períodos citados (descontando o peso ao alojamento).

#### 3.12.1.2. Consumo de ração (CR):

O consumo de ração foi calculado a partir da quantidade de ração oferecida na semana subtraídas as sobras de ração ao final da mesma semana (descontando-se o consumo de aves mortas), sendo os resultados apresentados de forma acumulada.

#### 3.12.1.3. Conversão alimentar (CA):

Obtida através do cálculo de consumo médio de ração e do ganho médio de peso acumulado, em cada fase de criação.

#### 3.12.1.4. Taxa de mortalidade:

Calculada baseando-se no controle diário de mortalidade e calculada a porcentagem em cada fase da criação.

#### 3.12.1.5. Taxa de viabilidade (Viab):

Calculada como 100 menos a porcentagem de aves mortas em cada fase da criação, sendo o valor acumulado, apresentado.

### 3.13. Delineamento experimental

Para avaliação de desempenho produtivo dos frangos de corte o delineamento utilizado foi inteiramente ao acaso com arranjo fatorial 2x3, sendo dois níveis de vacinação de matriz (vacinadas e não vacinadas com vacina oleosa às 18 semanas de idade) e três idades e vias de vacinação dos pintos (*in ovo*, no primeiro dia SC e no 15<sup>o</sup> dia de vida via água de bebida). Foram utilizadas seis repetições contendo 30 aves para cada tratamento.

Os resultados obtidos foram submetidos inicialmente aos testes de Lilliefor (normalidade) e Cochram e Bartlett (homogeneidade), e posteriormente

submetidos à análise de variância. As diferenças entre as médias foram analisadas pelo teste Student-Newman-Keuls (SNK) ou Fisher, para dados de distribuição normal, ou pelo teste de Kruskal-Wallis, para dados não normais (viabilidade).

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. Resposta sorológica

Os resultados de títulos médios de anticorpos das matrizes no momento da coleta dos ovos, e dos pintos, 24 horas após o nascimento, no teste de soroneutralização, encontram-se nas tabelas 5 e 6, respectivamente.

Tabela 5 – Título médio de anticorpos neutralizantes das matrizes no momento de coleta dos ovos

Matrizes	Títulos médios
Vacinadas	11434 <b>A</b>
Não vacinadas	810 <b>B</b>

Médias seguidas de letras desiguais maiúsculas diferem entre si pelo teste Mann-Whitney ( $p < 0,05$ ).

Podemos observar na tabela 5 que os títulos médios de anticorpos para DG no teste de soroneutralização, no momento da coleta de ovos, das matrizes vacinadas às 18 semanas com vacina oleosa foram superiores ( $p < 0,05$ ) aos títulos médios de matrizes não vacinadas. Estes resultados estão de acordo com os encontrados por Wood et al. (1983) e Van der Berg e Meulemans (1991) em que matrizes vacinadas com vacinas oleosas no período pré-postura, tiveram títulos de anticorpos superiores ( $p < 0,05$ ) aos de matrizes que receberam apenas vacinas vivas durante a fase de recria. Estes resultados sugerem que matrizes que recebem vacinação oleosa por volta da 18<sup>a</sup> semana, podem produzir pintos com altos títulos de anticorpos passivos (acima de 1500 no teste de soroneutralização) para DG no momento do nascimento.

Tabela 6 – Título médio de anticorpos neutralizantes dos pintos 24 horas após o nascimento

<b>Pintos</b>	<b>Títulos médios</b>
Descendentes de matrizes vacinadas	16816 <b>A</b>
Descendentes de matrizes não vacinadas	547 <b>B</b>

Médias seguidas de letras desiguais maiúsculas diferem entre si pelo teste Mann-whitney ( $p < 0,05$ ).

Na tabela 6 observa-se que os títulos médios de anticorpos passivos para DG no teste de soroneutralização, 24 horas após o nascimento, de pintos descendentes de matrizes vacinadas às 18 semanas de idade com vacina oleosa foram superiores ( $p < 0,05$ ) aos títulos médios de pintos descendentes de matrizes não vacinadas. Knoblich et al. (2000) encontraram

resultados semelhantes quando avaliaram os títulos de anticorpos ao nascimento, pelo teste de soro-neutralização, de pintos descendentes de matrizes vacinadas às 18 semanas com vacina oleosa para DG. Estes resultados confirmam a hipótese citada anteriormente, de que pintos descendentes de matrizes vacinadas às 18 semanas possuem altos títulos de anticorpos passivos para DG no momento do nascimento.

Os resultados dos títulos médios de anticorpos dos frangos de corte, ao teste de soroneutralização para o vírus da DG aos 10, 25 e 40 dias de idade encontram-se na tabela 7.

Os resultados de sorologia das aves de um, 10, 25 e 40 dias de idade de acordo com os tratamentos, estão esquematizados na figura 3.

Tabela 7 – Títulos médios de anticorpos neutralizantes das aves para DG aos 10, 25 e 40 dias de idade de acordo com os tratamentos

<b>Títulos</b>	<b>Pintos</b>	<b>Matriz</b>	
		<b>Vac</b>	<b>N vac</b>
Aos 10 dias	Vac <i>in ovo</i>	784 <b>A a</b>	206 <b>A b</b>
	Vac 1º dia	841 <b>A a</b>	111 <b>A b</b>
	Vac 15º dia	1313 <b>A a</b>	19 <b>A b</b>
Aos 25 dias	Vac <i>in ovo</i>	60 <b>A b</b>	2366 <b>A a</b>
	Vac 1º dia	107 <b>A a</b>	2159 <b>AB a</b>
	Vac 15º dia	35 <b>A b</b>	1003 <b>B a</b>
Aos 40 dias	Vac <i>in ovo</i>	201 <b>A b</b>	10223 <b>A a</b>
	Vac 1º dia	432 <b>A b</b>	4799 <b>A a</b>
	Vac 15º dia	5,7 <b>A b</b>	6189 <b>A a</b>

Médias seguidas de letras desiguais minúsculas na linha e maiúsculas na coluna diferem entre si pelo teste Kruskal-Wallis ( $p < 0,05$ ).

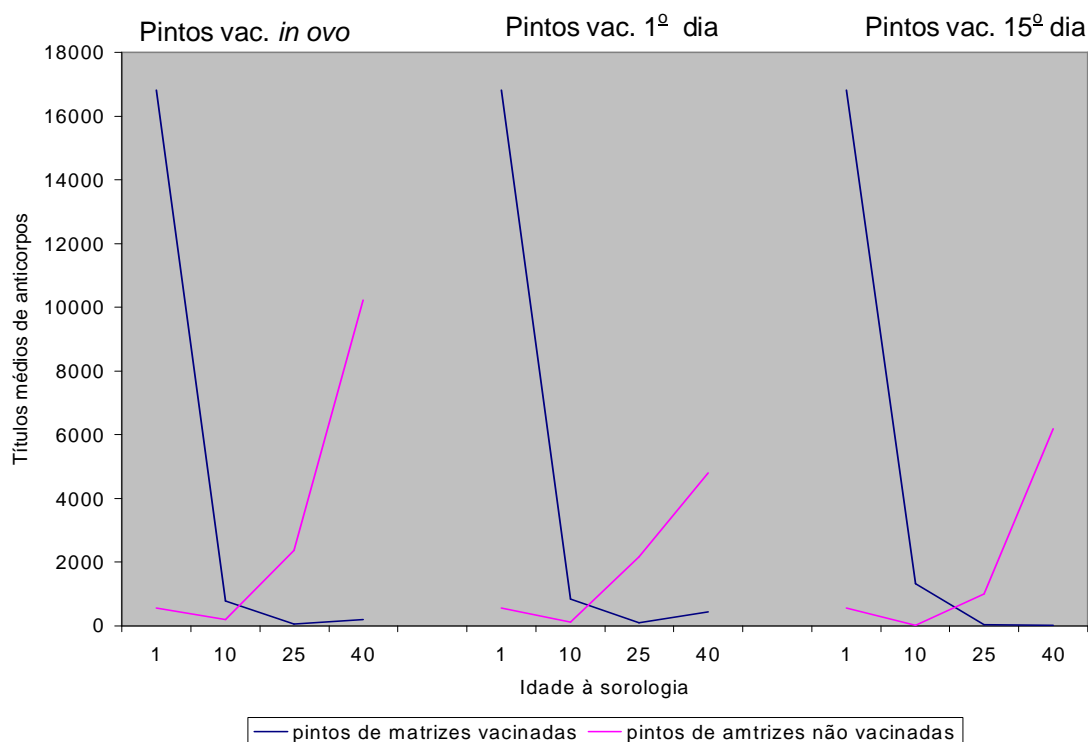


Figura 3. Títulos médios de anticorpos das aves de 1 a 40 dias de idade, vacinadas para DG *in ovo*, no 1º ou no 15º dia de vida, descendentes de matrizes vacinadas ou não às 18 semanas de idade.

Podemos observar na tabela 7 e na figura 3 que aos 10 dias de idade independente da idade de vacinação dos pintos, as aves descendentes de matrizes vacinadas às 18 semanas apresentaram títulos médios de anticorpos para DG, no teste de soroneutralização, superior aos demais tratamentos ( $p < 0,05$ ). Estes resultados podem ser explicados pelo fato de que aos 10 dias de idade, aves descendentes de matrizes vacinadas possuíam títulos de anticorpos passivos altos (Tab. 7 e Fig. 3), diferentemente do grupo de aves descendentes de matrizes não vacinadas.

Corley et al. (2002) encontraram resultados semelhantes quando avaliaram os títulos médios de anticorpos, 10 dias pós-vacinação, com vacina intermediária, em aves vacinadas *in ovo*. Aves com altos títulos de anticorpos maternos (acima de

2000 no teste de ELISA), quando vacinadas *in ovo*, apresentaram perfil de anticorpos decrescentes.

Knoblich et al. (2000) e Tessari et al. (2000) avaliaram os títulos médios de anticorpos em aves vacinadas no primeiro dia de vida, descendentes de matrizes vacinadas, e encontraram títulos médios de anticorpos, no teste soroneutralização, semelhantes aos títulos de pintos não vacinados. Ahmed e Akhter (2003) e Moraes et al. (2005), também encontraram resultados semelhantes, onde pintos descendentes de matrizes com altos títulos de anticorpos maternos para DG (acima de 2000 no teste de ELISA), vacinados no primeiro dia de vida, apresentaram títulos no teste de ELISA para DG decrescentes.



Aos 25 dias de idade, observa-se na tabela 7 que houve interação entre vacinação ou não da matriz às 18 semanas, e da idade à vacinação da progênie. No grupo de aves descendentes de matrizes não vacinadas, a vacinação *in ovo* se mostrou benéfica em relação à vacinação no primeiro ou no 15º dia de vida. Frangos oriundos de matrizes não vacinadas com vacina oleosa apresentaram melhor soroconversão, possivelmente por haver menor neutralização do vírus vacinal. Para matrizes vacinadas, os títulos de anticorpos passivos mais altos provavelmente interferiram na soroconversão da progênie. Na figura 3, observamos que pintos de matrizes vacinadas apresentaram títulos de anticorpos decrescentes, enquanto que pintos descendentes de matrizes não vacinadas apresentaram títulos de anticorpos crescentes, aos 25 dias de idade.

Sharma (1985) encontrou resultados diferentes aos deste experimento, em que aves com baixos títulos de anticorpos passivos, vacinadas *in ovo*, apresentaram títulos inferiores aos de aves vacinadas ao nascimento por via subcutânea. Neste mesmo trabalho, o autor concluiu que frangos de corte, descendentes de matrizes vacinadas às 18 semanas, quando vacinados *in ovo*, se mostraram mais protegidos ao desafio com vvIBDV, do que aves vacinadas ao nascimento, mostrando que a interferência dos anticorpos passivos sobre a vacinação é mais intensa no primeiro dia de vida do que na fase embrionária. Corley et al. (2002) também detectaram títulos de anticorpos decrescentes em aves comerciais vacinadas *in ovo* com vacina intermediária (estirpe 2512), demonstrando que aves descendentes de matrizes vacinadas não possuem capacidade de desenvolver resposta imune humoral devido à neutralização do vírus vacinal pelos anticorpos passivos.

Van der Berg e Meulemans (1991) avaliaram os títulos de anticorpos no teste de soroneutralização em frangos de corte vacinados aos 14 dias de idade, descendentes de matrizes vacinadas com vacina oleosa para DG no período pré-

postura (títulos médios de anticorpos de 1500 no teste de soroneutralização), e em frangos descendentes de matrizes não vacinadas (títulos médios de anticorpos de 28). Em ambas as situações os títulos de anticorpos dos frangos de corte apresentaram perfis decrescentes até 40 dias de idade (comportamento semelhante ao encontrado neste experimento). Neste mesmo trabalho realizado pelos autores citados, o desafio das aves, que foram vacinadas no 14º com vvIBDV aos 38 dias, mostrou que os anticorpos maternos interferiram na vacinação.

Podemos observar na tabela 7 que o grupo de aves vacinadas *in ovo*, ou aos 15 dias de idade, descendentes de matrizes não vacinadas, apresentaram melhores títulos para DG aos 25 dias de idade quando comparados às aves dos demais tratamentos, descendentes de matrizes vacinadas ( $p < 0,05$ ). Podemos observar ainda na mesma tabela, que a vacinação no primeiro dia de vida, na ausência de anticorpos passivos, resultou em títulos semelhantes estatisticamente aos encontrados no grupo de aves que receberam vacina no primeiro dia em presença de anticorpos. Porém, numericamente, a diferença encontrada é bastante considerável, uma vez que aves com títulos médios de anticorpos inferiores a 1000, no teste de ELISA, se mostraram suscetíveis à doença causada por vvIBDV (Tsukamoto et al, 1995). Alan et al. (2002) encontraram resultados semelhantes, em que a vacinação precoce de pintos com altos títulos de anticorpos passivos (média no teste de ELISA de 6294) não resultaram em resposta imune à vacina, porém, a vacinação de pintos descendentes de matrizes não vacinadas resultou em boa resposta imune ativa.

Em relação às aves vacinadas no 15º dia de vida, Ahmed e Akhter (2003) encontraram aumento progressivo nos títulos de anticorpos de aves vacinadas, via água de bebida, com vacina intermediária (Bursine 2), aos 14 dias de idade, descendentes de matrizes vacinadas, com posterior proteção ao desafio realizado aos 29 dias. Estes resultados contraditórios podem ser

explicados pela provável diferença encontrada nos títulos de anticorpos passivos no primeiro dia de idade de aves descendentes de matrizes vacinadas, uma vez que os títulos de anticorpos maternos podem variar de acordo com o programa e o tipo de vacina utilizada pela empresa (Wyeth et al., 1981; Alan et al., 2002).

Rauteschlein et al. (2005) encontraram resultados semelhantes aos do presente experimento, em que a vacinação de aves aos 14 dias de idade, que possuem altos títulos de anticorpos maternos (títulos médios de 10000 no teste de soroneutralização), com vacinas intermediárias, não resultou em produção de anticorpos no 21<sup>o</sup> dia de vida. Quando as aves foram vacinadas com vacina intermediária “plus”, também não houve soroconversão, aos 21 dias de idade no teste de soroneutralização. Já pintos com baixos títulos de anticorpos maternos (abaixo de 100 no teste de soroneutralização), vacinados aos 14 dias de idade, tanto com vacinas intermediárias quanto com vacinas intermediária “plus”, apresentaram aumento significativo de anticorpos ( $p < 0,05$ ) aos 21 dias de idade quando comparadas às aves não vacinadas.

A utilização de vacinas contendo estirpes de patogenicidade elevada (vacinas forte e intermediária “plus”) foi avaliada por diversos autores (Lucio e Hitchner, 1979; Muskett et al., 1979; Bolis et al., 2003 e Rauteschlein et al., 2005), e todos os trabalhos mostraram que estas vacinas foram capazes de induzir severas lesões na BC, comparáveis às estirpes de campo de alta virulência. Musket et al. (1979) avaliaram também a persistência destas estirpes vacinais no ambiente de criação e concluíram que o uso destas vacinas na avicultura industrial pode resultar no aparecimento da DG na sua forma subclínica, uma vez que altos títulos de anticorpos maternos não foram capazes de evitar os efeitos prejudiciais dos vírus sobre a BC, mas foram capazes de neutralizar os vírus vacinais utilizados nas vacinações.

Na tabela 7, podemos observar que aos 40 dias de idade o grupo de aves descendentes de matrizes não vacinadas apresentou títulos superiores ( $p < 0,05$ ) ao grupo de aves descendentes de matrizes vacinadas. Notamos também na figura 3 que aos 40 dias de idade, todos os grupos de aves descendentes de matrizes não vacinadas apresentaram títulos de anticorpos crescentes, chegando a altos títulos (acima de 2000) diferentemente do grupo de aves descendentes de matrizes vacinadas. Estes resultados demonstram que o primeiro grupo citado foi capaz de desenvolver adequada resposta imune humoral, enquanto que as aves descendentes de reprodutoras vacinadas não foram. Estes resultados podem ser explicados pela provável neutralização do vírus vacinal pelos anticorpos passivos no momento da vacinação.

Naqi et al. (1982), Knoblich et al. (2000), Kumar et al. (2000), Bolis et al. (2003) e Ahmed et al. (2003) encontraram resultados semelhantes quando avaliaram os títulos médios de anticorpos no teste de soroneutralização, de aves vacinadas no primeiro dia de idade, descendentes de matrizes vacinadas. Em todos os trabalhos não foram observadas respostas imunes ativas após 28 dias de idade, confirmando a hipótese de neutralização do vírus vacinal pelos altos títulos de anticorpos passivos no momento do nascimento. Naqi et al. (1982) avaliaram também os títulos de anticorpos de aves vacinadas no segundo dia de vida com vacinas intermediárias, descendentes de matrizes não vacinadas, e encontraram resultados diferentes dos deste experimento, em que a produção de anticorpos destas aves apresentou um perfil de crescimento muito lento, (mostrando que mesmo em baixos títulos abaixo de 100 no teste de soroneutralização), os anticorpos maternos atrasaram e diminuíram a produção de resposta imune humoral nas aves vacinadas.

Em relação à vacinação *in ovo*, os resultados encontrados se assemelham aos de Coletti et al. (2001), em que os títulos de anticorpos de aves vacinadas *in ovo* descendentes de matrizes vacinadas,

apresentaram perfis decrescentes, semelhante ao observado neste experimento, demonstrando que, mesmo a vacinação *in ovo*, quando realizada em aves com altos títulos de anticorpos passivos (títulos médios de 3250), tem sua eficácia comprometida.

Kumar et al. (2000), Bolis et al. (2003) e Ahmed et al. (2003) observaram que os títulos de aves vacinadas no décimo ou no 14<sup>o</sup> dia de vida, com vacinas de patogenicidade intermediária, intermediária plus ou forte, apresentaram perfil crescente, chegando a altos títulos aos 42 dias de idade (acima de 2000). Isto porque os títulos de anticorpos dos pintos ao nascimento eram menores numericamente (média de 3500) do que os encontrados neste experimento.

Ahmed e Akhter (2003) encontraram altos títulos médios de anticorpos aos 35 dias em aves vacinadas aos 14 dias de idade, descendentes de matrizes vacinadas, diferentemente do encontrado neste experimento. Porém, aves vacinadas no primeiro dia de vida, descendentes de matrizes vacinadas, não se mostraram protegidas frente ao desafio realizado aos

16 dias, mostrando que a vacina utilizada no primeiro dia, quando aplicada em presença de altos títulos de anticorpos passivos, tem sua eficácia comprometida.

#### **4.2. Provas moleculares (RT/PCR)**

O RNA obtido através do método de extração pelo Trizol foi realizado com sucesso, confirmado pelos resultados finais de RT/PCR visualizados no gel de agarose a 1% corado com brometo de etídio. Os resultados obtidos na PCR com amplificação específica esperada (588pb/VP1) confirmam a realização com êxito da transcrição reversa com o protocolo utilizado. A PCR permitiu a detecção de parte do gene que codifica para proteína VP1 do IBDV, nas amostras de BC das aves vacinadas com a estirpe S 706. A PCR realizada com o intuito de obter um segmento de 588 pb da região parcial do gene que codifica para a proteína VP1, foi realizada com sucesso. Utilizando o gel de agarose 1% corado com brometo de etídio, ou o gel de poliacrilamida a 6% corado pela prata foi possível visualizar o segmento da amplificação das amostras de BC, visualizados nas figuras 4 e 5, respectivamente.



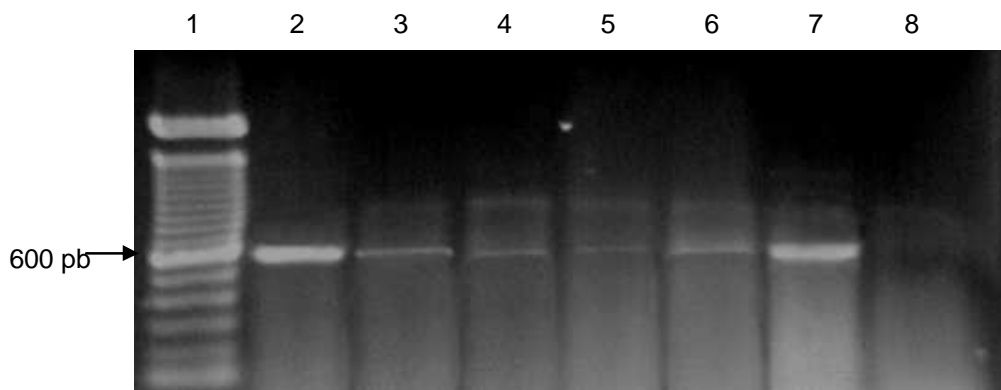


Figura 4: Análise do gel de agarose 1% corado com brometo de etídio contendo os produtos da RT/PCR (segmento do gene VP1 do IBDV (588 pb)) obtidos das amostras testadas. Canaleta 1: padrão de tamanho molecular *ladder* 100 pb; canaleta 2: amostra E13 (controle positivo); canaleta 3: amostra E14, canaleta 4: amostra E16; canaleta 5: amostra E18; canaleta 6: amostra E20; canaleta 7: amostra E21; canaleta 8: controle negativo.

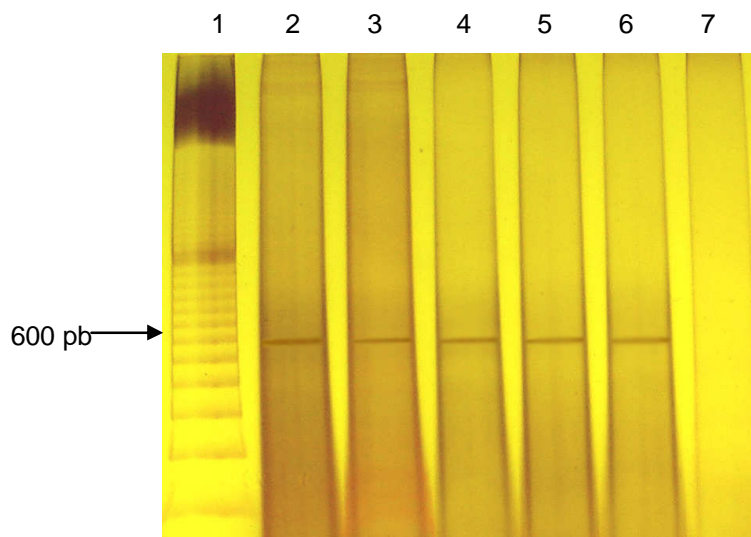


Figura 5: Análise do gel de poliacrilamida 6% corado pela prata contendo os produtos da RT/PCR (segmento do gene VP1 do IBDV (588 pb)) obtidos das amostras testadas. Canaleta 1: padrão de tamanho molecular *ladder* 100 pb; canaleta 2: amostra E13 (controle positivo); canaleta 3: amostra E17, canaleta 4: amostra E19; canaleta 5: amostra E22; canaleta 6: amostra E25; canaleta 7: controle negativo.



Não foi possível detectar o genoma do IBDV em todos os materiais coletados de aves-controle (dez aves), confirmando a ausência do vírus no ambiente de criação durante a fase experimental, no período pré-vacinação. Demonstrou-se também que não houve escape do vírus vacinal do galpão 2 (local de alojamento das aves vacinadas apenas no incubatório) para o galpão 1 (local de alojamento das aves vacinadas apenas aos 15 dias de idade).

#### 4.2.1. Resultados das provas de RT/PCR de acordo com os tratamentos

Os resultados referentes às provas de RT/PCR realizadas 96 horas após a vacinação de acordo com os tratamentos, encontram-se na tabela 8.

Tabela 8 – Resultados da RT/PCR de acordo com os tratamentos

Pintos	Matriz			
	N vac		Vac	
	Pos (esperado)*	Neg	Pos (esperado)*	Neg
Vac <i>in ovo</i>	27 (22,0) <b>A a</b>	3	17 (22,0) <b>A a</b>	12
Vac 1º dia	26 (18,5) <b>A a</b>	4	11 (18,5) <b>AB b</b>	19
Vac 15º dia	23 (14,5) <b>A a</b>	5	6 (14,5) <b>B b</b>	21

\*Número de animais positivos (frequência esperada)

Médias seguidas de letras desiguais minúsculas na linha e maiúsculas na coluna diferem entre si pelo teste  $\chi^2$  ( $p < 0,05$ );

Podemos observar na tabela 8 que o número de aves positivas na PCR, descendentes de matrizes não vacinadas, foram maiores em relação ao de aves descendentes de matrizes vacinadas ( $p < 0,05$ ), com exceção da vacinação *in ovo*. Estes resultados podem ser explicados pela provável neutralização do vírus vacinal pelos anticorpos passivos no grupo de aves vacinadas com um ou 15 dias de idade, descendentes de matrizes vacinadas. Dentro do grupo de aves descendentes de matrizes vacinadas, a vacinação *in ovo* se mostrou mais eficaz do que os demais tratamentos ( $p < 0,05$ ). Este resultado provavelmente ocorreu porque a vacinação *in ovo* foi aplicada aos 18 dias de incubação, fase em que os embriões ainda não absorveram todo o conteúdo do saco vitelino, e, conseqüentemente, possuíam menores títulos de anticorpos passivos na circulação sanguínea, no momento da vacinação, do que as aves dos demais tratamentos.

Knoblich et al. (2000) encontraram resultados diferentes ao deste experimento. Os autores não conseguiram detectar, através do exame de RT/PCR, utilizando

iniciadores que codificam para a proteína VP2 do IBDV, o genoma viral após a vacinação com um dia de vida em aves descendentes de matrizes vacinadas às 18 semanas.

Coletti et al. (2001) e Corley et al. (2002) encontraram resultados semelhantes em relação à detecção da infecção vacinal pelo RT/PCR, utilizando, porém, iniciadores que codificam para a proteína VP2 do IBDV, quatro dias após a vacinação *in ovo* para IBDV, em aves descendentes de matrizes vacinadas (aves comerciais) e de matrizes não vacinadas (aves SPF).

### 4.3. Desempenho produtivo dos frangos de corte

#### 4.3.1. Desempenho dos pintos de corte no período de um a sete dias de idade

Os resultados referentes ao consumo de ração, peso médio, conversão alimentar e viabilidade média dos pintos no período de um a sete dias de idade encontram-se na tabela 9.

Tabela 9 – Desempenho dos pintos de corte de um a sete dias de idade de acordo com os tratamentos

Variável	Pintos	Matriz		Média	CV
		Vac	N vac		
CR (g)	Vac <i>in ovo</i>	143	129	136	9,40
	Vac 1º dia	132	124	128	
	Vac 15º dia	130	125	127	
	Média	135	126		
PM (g)	Vac <i>in ovo</i>	128	115	121 <b>A</b>	7,06
	Vac 1º dia	118	112	115 <b>A</b>	
	Vac 15º dia	117	112	117 <b>A</b>	
	Média	121 <b>a</b>	114 <b>b</b>		
CA (g/g)	Vac <i>in ovo</i>	1,123	1,119	1,121	4,10
	Vac 1º dia	1,112	1,103	1,113	
	Vac 15º dia	1,103	1,074	1,088	
	Média	1,116	1,099		
Viab (%)	Vac <i>in ovo</i>	99,33	98,88	99,11	-
	Vac 1º dia	100,00	98,33	99,17	
	Vac 15º dia	99,33	98,64	98,99	
	Média	99,55	98,62		

Letras desiguais minúsculas na mesma linha e maiúsculas na coluna diferem entre si ( $p < 0,05$ ) pelo SNK ou pelo teste Kruskal-Wallis (viabilidade).

Conforme demonstrado na tabela 9, observamos que as vacinações *in ovo*, no primeiro ou aos 15 dias, não afetaram o consumo de ração, a conversão alimentar e a viabilidade média dos pintos no período de um a sete de idade, em progênes de matrizes vacinadas ou não às 18 semanas.

Notamos na tabela 9 que os pintos descendentes de matrizes vacinadas apresentaram peso médio aos 7 dias de idade superior aos dos demais tratamentos ( $p < 0,05$ ). Este resultado provavelmente ocorreu devido ao fato de que os pintos descendentes de matrizes vacinadas possuíam títulos de anticorpos passivos suficientes para neutralizar prováveis efeitos prejudiciais do vírus vacinal (aplicado *in ovo*

ou no primeiro dia de vida) sobre o ganho de peso dos pintos.

A vacinação *in ovo* ou no primeiro dia para DG não afetou negativamente a viabilidade média dos pintos de corte no período de um a sete dias (Tab. 9). Estes resultados se assemelham aos encontrados Gagic et al. (1999).

#### 4.3.2. Desempenho das aves no período de um a 21 dias de idade

Os resultados de consumo médio total de ração, peso médio, conversão alimentar e viabilidade média das aves no período de um a 21 dias de idade encontram-se na tabela 10.

Tabela 10 – Desempenho das aves de um a 21 dias de idade de acordo com os tratamentos

Variável	Pintos	Matriz		Média	CV
		Vac	N vac		
CR (g)	Vac <i>in ovo</i>	1107	1093	1100 <b>A</b>	3,84
	Vac 1º dia	1116	1093	1104 <b>A</b>	
	Vac 15º dia	1065	1031	1048 <b>B</b>	
	Média	1095 <b>a</b>	1072 <b>a</b>		
PM (g)	Vac <i>in ovo</i>	803	770	787 <b>A</b>	3,32
	Vac 1º dia	787	761	774 <b>AB</b>	
	Vac 15º dia	766	749	757 <b>B</b>	
	Média	785 <b>a</b>	760 <b>b</b>		
CA (g/g)	Vac <i>in ovo</i>	1,379 <b>A a</b>	1,418 <b>B b</b>	1,399	1,96
	Vac 1º dia	1,418 <b>A a</b>	1,435 <b>B a</b>	1,427	
	Vac 15º dia	1,390 <b>A a</b>	1,364 <b>A a</b>	1,377	
	Média	1,396	1,406		
Viab (%)	Vac <i>in ovo</i>	99,33	96,99	98,16	-
	Vac 1º dia	100,00	98,33	99,17	
	Vac 15º dia	97,33	97,98	97,66	
	Média	98,89	97,77		

Letras desiguais minúsculas na mesma linha e maiúsculas na coluna diferem entre si ( $p < 0,05$ ) pelo SNK ou pelo teste Kruskal-Wallis (viabilidade).

De acordo com os resultados apresentados na tabela 10, podemos observar que pintos vacinados *in ovo* ou no primeiro dia de idade, independentemente da vacinação ou não da matriz às 18 semanas, apresentaram maior consumo de ração de um a 21 dias de idade do que as aves dos demais tratamentos ( $p < 0,05$ ). A infecção com o vírus vacinal aos 15 dias pode ter prejudicado o consumo de ração destas aves neste período. As infecções vacinais resultam em perdas percentuais de desempenho também com outras vacinas vivas, como, por exemplo, vacinas contra bronquite infecciosa das galinhas (Talebi et al., 2005).

Notamos também que os pintos descendentes de matrizes vacinadas às 18 semanas apresentaram maior peso médio do que os demais tratamentos, independente da idade ou do método de vacinação ( $p < 0,05$ ). Em relação às progênie de matrizes vacinadas, o desempenho melhor parece estar relacionado à maior proteção passiva, talvez controlando especificamente a infecção pelo vírus vacinal. Porém, pintos vacinados *in ovo* apresentaram maior peso médio aos 21 dias de idade quando comparados aos pintos vacinados aos 15 dias, independente

da vacinação ou não da matriz às 18 semanas de idade. Estes resultados indicam que aos 21 dias de idade, a vacinação de pintos com 15 dias pode afetar negativamente o ganho de peso, e consequentemente o peso médio aos 21 dias, podendo estar relacionado a uma maior repercussão da infecção vacinal.

Em relação à conversão alimentar das aves de um a 21 dias de idade foi encontrado efeito de interação, vacinação ou não da matriz, e da idade à vacinação da progênie (Tabela 10). A não vacinação da matriz às 18 semanas prejudicou a conversão alimentar do grupo de pintos vacinados *in ovo* ( $p < 0,05$ ). Para a progênie de matrizes não vacinadas às 18 semanas, os pintos vacinados aos 15 dias apresentaram melhores taxas de conversão alimentar do que as aves dos demais tratamentos ( $p < 0,05$ ).

Podemos observar na tabela 10 que não foram encontradas diferenças significativas para viabilidade média das aves no período de um a 21 dias de idade, indicando que a vacinação ou não da matriz e a idade de vacinação dos pintos não influenciaram a taxa de viabilidade das aves no período analisado. Estes resultados são diferentes

dos encontrados por Giambone et al. (2001) que demonstrou que aves SPF apresentaram taxa de viabilidade aos 21 dias, inferior à das aves comerciais (com altos títulos de anticorpos passivos) quando vacinadas aos 18 dias de incubação com vacinas intermediárias para DG. Provavelmente, porque as aves SPF são mais sensíveis à infecção pelo vírus do que frangos de corte.

#### 4.3.3. Desempenho dos frangos no período de um a 40 dias de idade

Os resultados de consumo médio total de ração, peso médio, conversão alimentar e viabilidade média dos frangos no período de um a 40 dias de idade encontram-se na tabela 11.

Tabela 11 – Desempenho dos frangos de um a 40 dias de idade de acordo com os tratamentos

Variável	Pintos	Matriz		Média	CV
		Vac	N vac		
CR (g)	Vac <i>in ovo</i>	3867	3785	3827 <b>A</b>	2,47
	Vac 1º dia	3812	3795	3804 <b>A</b>	
	Vac 15º dia	3706	3690	3698 <b>B</b>	
	Média	3795 <b>a</b>	3757 <b>a</b>		
PM (g)	Vac <i>in ovo</i>	2306	2259	2283	2,42
	Vac 1º dia	2280	2247	2264	
	Vac 15º dia	2244	2247	2246	
	Média	2276	2251		
CA (g/g)	Vac <i>in ovo</i>	1,678	1,676	1,677 <b>B</b>	1,60
	Vac 1º dia	1,672	1,689	1,681 <b>B</b>	
	Vac 15º dia	1,651	1,642	1,647 <b>A</b>	
	Média	1,667 <b>a</b>	1,669 <b>a</b>		
Viab (%)	Vac <i>in ovo</i>	98,00	96,66	97,33	-
	Vac 1º dia	99,44	97,50	98,47	
	Vac 15º dia	97,33	97,97	97,65	
	Média	98,26	97,98		

Letras desiguais minúsculas na mesma linha e maiúsculas na coluna diferem entre si ( $p < 0,05$ ) pelo SNK ou pelo teste Kruskal-Wallis (viabilidade).

Na tabela 11 pode-se observar que, independente da vacinação ou não da matriz às 18 semanas de idade, pintos vacinados *in ovo* ou no primeiro dia de vida apresentaram maior consumo de ração do que as aves dos demais tratamentos ( $p < 0,05$ ). Segundo Hair-Bejo et al. (2004) é possível haver um ganho de peso compensatório em pintos de corte prejudicados em seu desempenho produtivo pela vacinação no primeiro dia de vida com vacinas intermediárias para DG.

Podemos notar na tabela 11 que o grupo de aves vacinado aos 15 dias de idade para DG apresentou melhor de conversão alimentar do que os frangos dos demais tratamentos ( $p < 0,05$ ). Como as aves vacinadas aos 15 dias apresentaram menor consumo de ração ( $p < 0,05$ ) e peso médio

das aves dos demais tratamentos, uma melhor taxa de conversão alimentar é esperada.

Independente da vacinação ou não da matriz com vacina oleosa, a idade à vacinação da progênie não afetou a viabilidade e o peso médio aos 40 dias de idade (Tab. 11). Estes resultados diferem dos encontrados por Sahar et al. (2004), que avaliaram o efeito da vacinação com estirpe de patogenicidade intermediária aos 14 dias de idade em frangos de corte com altos títulos de anticorpos maternos e encontraram efeitos prejudiciais da vacinação sobre o ganho de peso dos frangos aos 42 dias de idade.

## 5. CONCLUSÕES

A vacinação de matrizes de corte (32 semanas de idade) no período pré-postura, com vacinas oleosas para DG influencia negativamente a conversão sorológica das progêneses vacinadas *in ovo*, no primeiro dia (SC) ou aos 15 dias de idade via água de bebida. Nas condições em que foi realizado este experimento, ou seja, com adequada biossegurança, a vacinação oleosa das reprodutoras de corte para DG pode ser eliminada da rotina das granjas com objetivo de promover melhor resposta imune ativa, decorrentes de vacinações na progênie.

A vacinação *in ovo* ou no primeiro dia de vida, em aves descendentes de matrizes vacinadas ou não vacinadas com vacina oleosa para DG às 18 semanas de idade, não afeta o consumo de ração, o peso médio, a conversão alimentar e a viabilidade de frangos de corte fêmeas aos 40 dias de idade.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AHMED, Z.; AKHTER, S. Role of maternal antibodies in protection against infectious bursal disease in commercial broiler. **International Journal of Poultry Science**, v.2, n.4, p.251-255, 2003.
- AHMED, Z.; INAYAT, S.; NAEEM, K.; MALIK, S. A. Comparative immune response pattern of commercial infectious bursal disease vaccines against field isolates in Pakistan. **International Journal of Poultry Science**, v.2, n.6, p.449-453, 2003.
- ALAM, J.; RAHMAN, M. M.; SIL, B. K. et al. Effect of maternally derived antibody on vaccination against infectious bursal disease (Gumboro) with live vaccine in broiler. **International Journal of Poultry Science**, v.1, n.4, p.98-101, 2002.
- ALLAN, W. H.; FARAGHER, J. T.; CULLEN, G. A. Immunossuppression by the infectious bursal agent in chickens immunized against Newcastle disease. **Veterinary Record**, v.90, n.18, p.511-512, 1972.
- AL-NATOUR, M. Q.; WARD, L. A.; SAIF, Y. M. et al. Effect of different levels of maternally derived antibodies on protection against infectious bursal disease virus. **Avian Diseases**, v.48, n.1, p.177-182, 2004.
- BENTON, W. J.; COVER, M. S.; ROSENBERGER, J. K. et al. Physicochemical properties of the infectious bursal disease agent (IBA). **Avian Diseases**, v.11, n.3, p.438-445, 1967.
- BOLIS, D. A.; PAGANINI, F. J.; SIMON, V. A. et al. Gumboro disease: evaluation of serological and anatomopathological responses in vaccinated broiler chickens challenged with very virulent virus strain. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, v.5, n.2, p.137-146, 2003.
- CHETTLE, N. J.; STUART, J. C.; WYETH, P. J. Outbreaks of virulent infectious bursal disease in East Anglia. **Veterinary Record**, v.125, n.10, p.271-272, 1989.
- CHEVILLE, N. F. Studies on pathogenesis of Gumboro disease in the bursa of Fabricius, spleen and thymus of chicken. **American Journal of Pathology**, v.51, n.4, p.527-551, 1967.
- COLETTI, M.; DEL ROSSI, E.; FRANCIOSINI, M. P. et al. Efficacy and safety of an infectious bursal disease virus intermediate vaccine *in ovo*. **Avian Diseases**, v.45, n.4, p.1036-1043, 2001.
- CORLEY, M. M.; GIAMBRONE, J. J.; DORMITORIO, T. Detection of infectious bursal disease vaccine virus in lymphoid tissues after *in ovo* vaccination of specific-pathogen-free embryos. **Avian Diseases**, v.45, n.4, p.897-905, 2001.
- CORLEY, M. M.; GIAMBRONE, J. J.; DORMITORIO, T. Evaluation of immune response and detection of infectious bursal disease virus by Reverse Transcriptase - Polimerase Chain reaction and Enzyme-Linked Immunosorbent Assay after *in ovo* vaccination in commercial broilers. **Avian Diseases**, v.46, n.4, p.803-809, 2002.

- CORLEY, M. M.; GIAMBRONE, J. J. Immunosuppression in specific-pathogen-free broilers administered infectious bursal disease virus vaccines by *in ovo* route. **Avian Diseases**, v.46, n.4, p.810-815, 2002.
- DI FABIO, J.; ROSSINI, L. I.; ENTERRADOSSI, N. et al. European – like infectious bursal disease viruses in Brasil. **Veterinary Record**, v.145, n.7, p.203-204, 1999a.
- DI FABIO, J.; ROSSINI, L. I.; ENTERRADOSSI, N. et al. Very virulent IBD spreads to South America. **World Poultry**, v.15, n.9, p.88-91, 1999 b.
- DI FABIO, J. Diagnóstico sorológico da doença de Gumboro. In: SIMPÓSIO DA DOENÇA DE GUMBORO, 2., 2001, Santos, SP: APINCO, 2001. p.80-91.
- DOBOS, P.; HILL, B. J.; HALLET, R. et al. Biophysical and biochemical characterization of five animal viruses with bisegmented double-stranded RNA genomes. **Journal of Virology**, v.32, n.2, p.593-605, 1979.
- ENTERRADOSSI, N.; PICAULT, J. P.; DORUIN, P.; GUITTET, M. et al. Pathogenicity and preliminary antigenic characterization of six infectious bursal disease virus strains isolated in France from acute outbreaks. **Journal of Veterinary Medicine**, v.39, n.9, p.683-691, 1992.
- GAGIC, M.; St HILL, C. A.; SHARMA, J. M. *In ovo* vaccination of specific-pathogen-free chickens with vaccines containing multiple agents. **Avian Diseases**, v.43, n.2, p.293-301, 1999.
- GIAMBRONE, J. J.; DORMITORIO, T. I.; BROWN, T. Safety and efficacy of *in ovo* administration of infectious bursal disease viral vaccines. **Avian Diseases**, v.45, n.1, p.144-148, 2001.
- GODDARD, R. D.; WYETH, P. J.; VARNEY, W. C. Vaccination of commercial layer chicks against infectious bursal disease with maternally derived antibodies. **Veterinary Record**, v. 135, n.12, p. 273-274, 1994.
- GOMES, A. D.; ABREU, J. T.; REDONDO, R. A. F. et al. Genotyping of IBDV strains by restriction fragment length polymorphism of the VP1, VP2 and VP3 genes. **Avian Diseases**, v.49, n.4, p.500-506, 2005.
- HAIR-BEJO, M.; NG, M. G.; NG, H, Y. Day old vaccination against infectious bursal disease in broiler chickens. **International Journal of Poultry Science**, v.3, n.2, p.124-128, 2004.
- HASSANGADEH, M.; FARD, M. H. B.; TOOLUO, A. Evaluation of the immunogenicity of immune complex infectious bursal disease vaccine delivered by *in ovo* to embryonated eggs or subcutaneously to day old chickens. **International Journal of Poultry Science**, v.5, n.1, p.70-74, 2006.
- IKUTA, N.; ATTRACHE, J. EI.; VILLEGAS, P. et al. Molecular characterization of Brazilian infectious bursal disease virus. **Avian Diseases**, v.45, n.2, p.297-206, 2001.
- IKUTA, N.; FONSECA, A. S. K.; LUNGE, V. R. et al. Estudo da composição antigênica de variantes do vírus da doença de Gumboro (IBDV). In: Trabalhos de Pesquisa, Prêmio José Maria Lamas da Silva, **Conferência APINCO 98**, v.1, p.48, 1998.
- IVÁN, J.; NAGY, N.; MAGYAR, A. et al. Functional restoration of the bursa of Fabricius following *in ovo* infectious bursal disease vaccination. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.79, n.3-4, p.235-248, 2001.
- ITO, N. M. K.; MIYAJI, C. I.; LIMA, E. A. et al. **Doença de Gumboro: revisão de literatura, avanços em biotecnologia e novos conhecimentos**, 76p, 2001.

- JACKWOOD, D. J.; SAIF, Y. M. Antigenic diversity of infectious bursal disease virus. **Avian Diseases**, v.31, n.4, p.766-770, 1987.
- KNOBLICH, H. V.; SOMMER, S. E.; JACKWOOD, D. J. Antibody titers to IBDV in broiler chicks after vaccination at one day of age with IBDV and Marek,s Disease virus. **Avian Diseases**, v.44, n.4, p.874-884, 2000.
- KUMAR, K.; SINGH, K. C. P.; PRASAD, C. B. Immune responses to intermediate strain IBD vaccine at different levels of maternal antibody in broiler chickens. **Tropical Animal Health and Production**, v.32, n.6, p.357-360, 2000.
- LUCIO, B.; HITCHNER, S. B. Immunosuppression and active response induced by infectious bursal disease virus in chickens with passive antibodies. **Avian Diseases**, v.24, n.1, p189-196, 1979.
- LUKERT , P. D.; HITCHNER, S. B. Infectious bursal disease. In: **Diseases of Poultry**, 8<sup>th</sup> Edition, p.566-576, 1984.
- LUKERT, P. D. Using live vaccines in the presence of maternal antibody. **World Poultry Special – Gumboro**, p. 12-13, December 1994.
- MAAS, R. A.; VENEMA, S.; OEI, H. L.. et al. Efficacy of inactivated infectious bursal disease (IBD) vaccines: comparison of serology with protection of progeny chickens against IBD virus strains of varying virulence. **Avian Pathology**, v.30, n.4, p.345-354, 2001.
- MORAES, H. L. S.; SALLE, C. T. P.; NASCIMENTO, V. P. et al. Infectious bursal disease: evaluation of maternal immunity and protection by vaccination of one-day old chicks against challenge with a very virulent virus isolate. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, v.7, n.1, p.51-57, 2005.
- MUSKETT, J. C.; REED, N. E.; THORNTON, D. H. Comparison of two infectious bursal disease vaccine strains: efficacy and potential hazards in susceptible and maternally immune birds. **Veterinary Record**, v.104, n.15, p.332-334, 1979.
- NAKANO, M. et al. Ocorrência da Doença de Gumboro no Brasil. Diagnóstico anátomo-patológico, **Biológico**, v.38, p.60-61, 1972.
- NAQI, S. A.; MARQUEZ.; SAHIN, N. Maternal antibody and its effect on infectious bursal disease immunization. **Avian Diseases**, v.27, n.3, p.623-631, 1982.
- RAUTENSCHLEIN, S.; HASSE, S. Differences in the immunopathogenesis of infectious bursal disease virus (IBDV) following *in ovo* and post-hatch vaccination of chickens. **Veterinary Immunopathology and Immunopathology**, v.106, n.1-2, p.139-150, 2005.
- RAUTENSCHLEIN, S.; KRAEMER, Ch.; VANMARCKE, J.; MONTIEL, E. Protective efficacy of intermediate and intermediate plus infectious bursal disease virus (IBDV) vaccines against very virulent IBDV in commercial broilers. **Avian Diseases**, v.49, n.2, p.231-237, 2005.
- SAHAR, M. O.; ALI, A. S.; ARMAN, E. A. Residual pathogenic effects of infectious bursal disease vaccines containing intermediate and hot strains of the virus in broiler chickens. **International Journal of Poultry Science**, v.3, n.6, p.415-418, 2004
- SAUKAS, T. N. **Caracterização de amostra do vírus da doença infecciosa bursal (doença de Gumboro) isolada no Brasil**, 1998. 88 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Rural do Rio de Janeiro, RJ.
- SAYD, S.; MUÑOZ, R. Medicina preventiva em poedeiras e frangos de corte: a importância da sorologia, anticorpos maternos e fórmula de Deventer. **Avicultura Profissional**, v.22, n.3, p.18-20, 2004.

- SHARMA, J. M. Embryo vaccination with infectious bursal disease virus alone or in combination with Marek's disease vaccine. **Avian Diseases**, v.29, n.4, p.1155-1169, 1985.
- SIVANANDAN, V.; MAHESWARAN, S. K. Immune profile of infectious bursal disease. III. Effect of infectious bursal disease virus on the lymphocyte response to phytomitogens and on mixed lymphocyte reaction of chickens. **Avian Diseases**, v.25, n.1, p.112-120, 1981.
- SNYDER, D. B. Changes in the field status of infectious bursal disease virus – Guest Editorial. **Avian Pathology**, v.19, p.419-423, 1990.
- SNYDER, D. B.; MARQUARDT, W. W.; MALLINSON, E. T. et al. Rapid serological profiling by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. IV. Association of infectious bursal disease serology with broiler performance. **Avian Diseases**, v.30, n.1, p.139-148, 1985.
- TALEBI, A.; POURBAKHSH, S. A.; DOROSTKAR, K. Effects of vaccination routes against IB on performance and immune response of broiler chickens. **International Journal of Poultry Science**, v.4, p.795-798, 2005.
- TESSARI, E. N. C.; CARDOSO, A. L. S. P.; CASTRO, A. G. M. et al. Avaliação sorológica comparativa entre dois esquemas de vacinação contra D.I.B. (Doença Infecciosa da Bursa). **Arquivo Instituto Biológico**, v.67, n.2, p.161-165, 2000.
- TSUKAMOTO, K.; KOJIMA, C.; KOMORI, Y. Protection of chickens against very virulent infectious bursal disease virus (IBDV) and Marek disease virus (MDV) with a recombinant MDV expressing IBDV VP2. **Virology**, v.257, n.2, p.352-62, 1999.
- TSUKAMOTO, K.; TANIMURA, N.; KAKITA, S. I. et al. Efficacy of three live vaccines against highly virulent infectious bursal disease virus in chickens with or without maternal antibodies. **Avian Diseases**, v.39, n.2, p.218-229, 1995.
- VAN DER BERG, T. P.; GOZNE, M.; MEULEMANS, G. Acute infectious bursal disease in poultry: Isolation and characterization of a highly virulent strain. **Avian Pathology**, v.20, p.133-143, 1991.
- VAN DER BERG, T. P.; MEULEMANS, G. Acute infectious bursal disease in poultry: protection afforded by maternally deviated antibodies and interference with live vaccination. **Avian Pathology**, v.20, p.409-421, 1991.
- VAN DER BERG, T. P.; MEULEMANS, G. Acute infectious bursal disease in poultry: Immunological and molecular basis of antigenicity of a highly virulent strain. **Avian Pathology**, v.25, p.751-768, 1996.
- VAN DER BERG, T. P. Acute infectious bursal disease in poultry: a review. **Avian Pathology**, v. 29, n.3, p. 175-194, 2000.
- WHITFILL, C.; AVAKIAN, A; HADDAD, E. et al. Vacunas con el complejo virus-anticuerpo: presente y futuro. **Avicultura Profesional**, v. 20, p. 17-22, 2002.
- WOOD, G. W.; MUSKETT, J. C.; THORNTON, D. H. Use of inactivated oil emulsion infectious bursal disease vaccines in breeder chickens to prevent immunosuppression in progeny chicks. **Research in Veterinary Science**, v.35, n.1, p.114-115, 1983.
- WYETH, P. J.; CHETTLE, N. J. Use of infectious bursal disease vaccines in chicks with maternally derived antibodies. **The Veterinary Record**, v.126, n.23, p.577-578, 1990.
- WYETH, P. J.; CULLEN, G. A. Maternally derived antibody – effect on the susceptibility to infectious bursal disease. **Avian Pathology**, v.5, p.253-260, 1976.
- WYETH, P. J.; O'BRIEN, J. D. P.; CULLEN, G. A. Improved performance of progeny of broiler parent chickens vaccinated with infectious bursal disease oil-emulsion vaccine. **Avian Diseases**, v.25, n.1, p.228-241, 1981.