

Universidade Federal de Minas Gerais  
Conselho de Pós-Graduação  
Escola de Veterinária



AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE DE DIFERENTES LINHAGENS GENÉTICAS  
DE FRANGOS DE CORTE ÀS VACINAÇÕES CONTRA BRONQUITE INFECCIOSA ,  
DOENÇA DE NEWCASTLE E INOCULAÇÃO DE ERITRÓCITOS DE CARNEIRO

Rosilene de Mont'Alverne Neto

Belo Horizonte  
Minas Gerais  
1985

Rosilene de Mont'Alverne Neto

T636.08969  
41763  
1985



AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE DE DIFERENTES LINHAGENS GENÉTICAS  
DE FRANGOS DE CORTE ÀS VACINAÇÕES CONTRA BRONQUITE INFECCIOSA,  
DOENÇA DE NEWCASTLE E INOCULAÇÃO DE ERITRÓCITOS DE CARNEIRO

Tese apresentada à Escola de Veteri-  
nária da Universidade Federal de Mi-  
nas Gerais, como requisito parcial  
para a obtenção do grau de Mestre em  
Medicina Veterinária.

Área: Medicina Veterinária Preventiva.

U.F.M.G. - BIBLIOTECA UNIVERSITÁRIA



NÃO DANIFIQUE ESTA ETIQUETA

22/03/04

Belo Horizonte

Minas Gerais

1985



Mont'Alverne Neto, Rosilene de, 1956-

M757a Avaliação da resposta imune de diferentes linhagens genéticas de frangos de corte às vacinações contra bronquite infecciosa, doença de Newcastle e inoculação de eritrócitos de carneiro. Belo Horizonte, Escola de Veterinária da UFMG, 1985.

48p. ilustr.

Tese, Mestre em Medicina Veterinária.

1. Anticorpos inibidores da hemaglutinação - doença de Newcastle. 2. Bronquite infecciosa. 3. Resposta imune humoral. 4. Eritrócitos de carneiro. I. Título.

CDD - 636.508916079

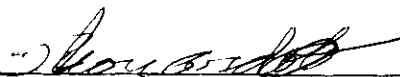
APROVADA EM: 28 / 02 / 85



---

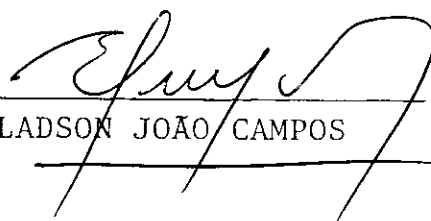
PROF. RONALDO REIS

- Orientador -



---

PROF. REGINO LEONARDO DE OLIVEIRA



---

PROF. EGLADSON JOÃO CAMPOS

---

À memória de minha saudo-  
síssima mãe LILIA.

Ao meu marido Raimundo, ao  
meu pai Major Neto e aos  
meus familiares, dedico es  
te trabalho.

O autor agradece a todos aqueles que, direta ou indiretamente, prestaram seu estímulo imprescindível e valiosa colaboração.

O presente trabalho contou com o apoio do Laboratório Nacional de Referência Animal (LANARA)/Divisão Técnica, que permitiu a utilização de suas instalações, além do auxílio financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Fundação de Estudo e Pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecnia (FEP-MVZ).

## RESUMO

Foram realizados dois experimentos com aves convencionais e em condições de campo, para avaliação de respostas imunes de frangos de corte de diferentes origens genéticas e verificação do desempenho referente ao ganho de peso das aves, para comparação com os parâmetros imunológicos estudados.

Experimento I - foram utilizadas as linhagens comerciais Pilch (B), Cobb (D), Hubbard (E), Cobb 58 (F), Arbor-Acress (G) e o cruzamento Peterson  $\sigma^7 \times \phi$  Hubbard (C). As aves foram vacinadas via ocular, aos 15 dias de idade, contra doença de Newcastle e Bronquite Infecciosa, e revacinadas por nebulização, aos 31 dias de idade. Os níveis dos anticorpos inibidores da hemaglutinação para os dois antígenos foram determinados no dia da primovacinação, no 14º dia após a primovacinação e 12º dia após a revacinação. Os pesos das aves foram obtidos aos 49 dias de idade. O grau da resposta imune secundária à vacinação contra a doença de Newcastle dependeu da origem genética das aves, tendo a linhagem Pilch apresentado o maior nível de anticorpos inibidores da hemaglutinação. Foi observada correlação fenotípica negativa entre peso corporal e produção de anticorpos para Newcastle na linhagem Pilch, que apresentou o menor peso corporal aos 49 dias de idade. Não foram obtidas diferenças significativas na produção de anticorpos inibidores da hemaglutinação para o vírus da Bronquite Infecciosa.

Experimento II - o nível de hemaglutininas para eritrócitos de carneiro foi determinado nas linhagens B, D, E, F e G. Aos 28 dias de idade as aves receberam, via intramuscular, 1,0 ml de uma suspensão a 10% de eritrócitos de carneiro em solução salina fisiológica. Os títulos médios de anticorpos hemaglutinantes totais, 2-mercaptoethanol sensíveis e 2-mercaptoethanol resistentes, em soros colhidos no 10º dia pós-inoculação, foram semelhantes entre si.

Dada a importância do assunto, sugerem-se novos estudos sobre as respostas imunes em aves de diferentes origens genéticas.

## SUMÁRIO

|                                                                     | Página |
|---------------------------------------------------------------------|--------|
| 1. INTRODUÇÃO.....                                                  | 1      |
| 2. REVISÃO DE LITERATURA.....                                       | 3      |
| 2.1. Doença de Newcastle.....                                       | 3      |
| 2.2. Bronquite infecciosa.....                                      | 5      |
| 2.3. Eritrócitos de carneiro.....                                   | 6      |
| 2.4. Parâmetros imunológicos X características produ-<br>tivas..... | 8      |
| 3. MATERIAL E MÉTODOS.....                                          | 11     |
| 3.1. Local.....                                                     | 11     |
| 3.2. Aves de experimentação.....                                    | 11     |
| 3.3. Experimento I.....                                             | 12     |
| 3.3.1. Esquema de vacinação.....                                    | 12     |
| 3.3.2. Preparo das amostras de soro.....                            | 12     |
| 3.3.3. Prova sorológica para NC.....                                | 13     |
| 3.3.3.1. Antígeno.....                                              | 13     |
| 3.3.3.2. Eritrócitos.....                                           | 14     |
| 3.3.3.3. Diluente.....                                              | 14     |
| 3.3.3.4. Hemaglutinação (HA).....                                   | 14     |
| 3.3.3.5. Inibição da hemaglutinação (IH).....                       | 15     |

|                                                                    | Página |
|--------------------------------------------------------------------|--------|
| 3.3.4. Prova sorológica para BI.....                               | 16     |
| 3.3.4.1. Antígeno.....                                             | 16     |
| 3.3.4.2. Eritrócitos.....                                          | 16     |
| 3.3.4.3. Diluente.....                                             | 17     |
| 3.3.4.4. Hemaglutinação (HA).....                                  | 17     |
| 3.3.4.5. Tratamento dos soros.....                                 | 17     |
| 3.3.4.6. Inibição da hemaglutinação (IH).....                      | 18     |
| 3.3.5. Pesagem das aves.....                                       | 18     |
| 3.4. Experimento II.....                                           | 19     |
| 3.4.1. Imunização.....                                             | 19     |
| 3.4.2. Preparo das amostras de plasma.....                         | 19     |
| 3.4.3. Teste de hemaglutinação.....                                | 19     |
| 3.4.4. Pesagem das aves.....                                       | 20     |
| 3.5. Delineamento experimental e análise estatística.....          | 20     |
| 4. RESULTADOS.....                                                 | 24     |
| 4.1. Experimento I.....                                            | 24     |
| 4.1.1. Resposta imune à vacinação contra a doença de NC.....       | 24     |
| 4.1.2. Resposta imune à vacinação contra a BI...                   | 24     |
| 4.1.3. Peso médio das aves.....                                    | 31     |
| 4.2. Experimento II.....                                           | 31     |
| 4.2.1. Resposta imune à inoculação de eritrócitos de carneiro..... | 31     |
| 4.2.2. Peso médio das aves.....                                    | 31     |
| 5. DISCUSSÃO.....                                                  | 37     |
| 5.1. Experimento I.....                                            | 37     |
| 5.1.1. Resposta imune para BI.....                                 | 37     |
| 5.1.2. Resposta imune para NC.....                                 | 38     |
| 5.1.3. Peso das aves.....                                          | 39     |

|                                    | Página |
|------------------------------------|--------|
| 5.2. Experimento II.....           | 40     |
| 6. CONCLUSÕES.....                 | 42     |
| 7. RÉFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 43     |

## LISTA DE TABELAS

|                                                                                                                                                                                                                   | Página |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------|
| TABELA I - Composição das dietas.....                                                                                                                                                                             | 21     |
| TABELA II - Modelo da análise de variância para os níveis de anticorpos inibidores da hemaglutinação para NC e peso das aves (experimento I).....                                                                 | 22     |
| TABELA III - Modelo da análise de variância para os níveis de anticorpos hemaglutinantes para eritrócitos de carneiro e peso das aves (experimento II).....                                                       | 22     |
| TABELA IV - Modelo da análise de variância para os níveis de anticorpos inibidores da hemaglutinação para BI.....                                                                                                 | 23     |
| TABELA V - Títulos médios de anticorpos inibidores da hemaglutinação para o vírus da doença de NC, em soros colhidos no dia da primovacinação, no 14º dia após a primovacinação e 12º dia após a revacinação..... | 25     |
| TABELA VI - Quadrado médio da análise de variância para                                                                                                                                                           |        |

|             |                                                                                                                                                                                                |    |
|-------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
|             | o nível de anticorpos maternos inibidores da hemaglutinação para o vírus da doença de NC.....                                                                                                  | 26 |
| TABELA VII  | - Quadrado médio da análise de variância para o nível de anticorpos inibidores da hemaglutinação para o vírus da doença de NC - resposta primária.....                                         | 26 |
| TABELA VIII | - Quadrado médio da análise de variância para o nível de anticorpos inibidores da hemaglutinação para o vírus da doença de NC - resposta secundária.....                                       | 27 |
| TABELA IX   | - Títulos médios de anticorpos inibidores da hemaglutinação para o vírus da BI, em soros colhidos no dia da primovacinação, no 14º dia após a primovacinação e 12º dia após a revacinação..... | 29 |
| TABELA X    | - Quadrado médio da análise de variância para o nível de anticorpos maternos inibidores da hemaglutinação para o vírus da BI.                                                                  | 29 |
| TABELA XI   | - Quadrado médio da análise de variância para o nível de anticorpos inibidores da hemaglutinação para o vírus da BI - resposta primária.....                                                   | 30 |
| TABELA XII  | - Quadrado médio da análise de variância para o nível de anticorpos inibidores da hemaglutinação para o vírus da BI - resposta secundária.....                                                 | 30 |
| TABELA XIII | - Peso médio dos frangos aos 49 dias de idade, em quilogramas - experimento I.....                                                                                                             | 32 |

## Página

|        |                                                                                                                                                                         |    |
|--------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| TABELA | XIV - Quadrado médio da análise de variância para peso dos frangos aos 49 dias de idade-experimento I.....                                                              | 32 |
| TABELA | XV - Títulos médios de anticorpos hemaglutinantes totais, 2-ME sensíveis e 2-ME resistentes, para eritrócitos de carneiro, em soros colhidos no 10º dia pós-inoculação. | 33 |
| TABELA | XVI - Quadrado médio da análise de variância para o nível de anticorpos hemaglutinantes totais para eritrócitos de carneiro, 10 dias pós-inoculação.....                | 34 |
| TABELA | XVII - Quadrado médio da análise de variância para o nível de anticorpos hemaglutinantes 2-ME sensíveis, 10 dias pós-inoculação...                                      | 34 |
| TABELA | XVIII - Quadrado médio da análise de variância para o nível de anticorpos hemaglutinantes 2-ME resistentes, 10 dias pós-inoculação.                                     | 35 |
| TABELA | XIX - Peso médio dos frangos aos 49 dias de idade, em quilogramas - experimento II.....                                                                                 | 35 |
| TABELA | XX - Quadrado médio da análise de variância para peso dos frangos aos 49 dias de idade-experimento II.....                                                              | 36 |

## 1. INTRODUÇÃO

A evolução dos sistemas de criação de galinhas para uma produção avícola intensiva, com conseqüente maior risco econômico, gerou demanda de um permanente controle sanitário dos lotes. Este controle sanitário tem sido feito através das seguintes medidas básicas: erradicação, vacinação, medicação e aumento da resistência genética às doenças. Apesar do crescente reconhecimento da importância dos problemas sanitários, disponibilidade de novas vacinas e drogas, melhores instalações, a galinha continua enfrentando o desafio de um ambiente adverso. Mesmo a introdução de uma vacina para proteger contra um novo patógeno gera dificuldades na reorganização dos atuais esquemas de vacinação.

A resistência genética é importante não somente para os casos em que não existem outras medidas efetivas de controle, mas também para as doenças cujas vacinas ou medicamentos são disponíveis e até mesmo para aquelas que tenham sido erradicadas. A vacinação permite mais reduzir do que eliminar as perdas por doença, sendo, portanto desejável completar esta proteção pela resistência genética; igualmente é de valor, mesmo se determinada doença tenha sido erradicada, visto que representa uma salvaguarda contra pesadas perdas, caso ocorra o reaparecimento da doença.

Entretanto, a falta de conhecimentos relativos aos

mecanismos de resistência aos agentes de doenças específicas tem inibido o seu desenvolvimento. A seleção para resistência às doenças em geral tem tido sucesso limitado e a seleção para resistência a doenças específicas tem sofrido competição com a seleção para características produtivas. O efeito da seleção para resistência a doenças específicas sobre a resistência a outras doenças e características de produção é, ainda, insuficientemente conhecido. Contudo, a seleção para resistência à leucose linfóide e à doença de Marek tem sido avaliada experimentalmente (BIGGS, 1983).

As vantagens imediatas da resistência genética, particularmente sua natureza permanente, ausência de stress associado à vacinação e emprego onde a vacinação não é possível, enfatizam a necessidade de mais pesquisas nesta área (ZIJPP, 1985).

O estudo aqui apresentado buscou, num trabalho com aves convencionais e em condições de campo, gerar alguma informação para esta área da pesquisa avícola. Mais especificamente, os objetivos deste trabalho foram os seguintes:

- . estudar o comportamento de diferentes linhagens de frangos de corte, em termos de resposta humoral, à vacinação contra a doença de Newcastle e a Bronquite Infecciosa.
- . avaliar a resposta primária de anticorpos à imunização com eritrócitos de carneiro nas diferentes linhagens.
- . verificar o desempenho referente ao ganho de peso das aves, e compará-lo com os parâmetros imunológicos estudados.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. Doença de Newcastle

Em dois anos sucessivos, COLE & HUTT (1961), inoculando aves de postura de 10 a 16 semanas de idade, com uma vacina a vírus vivo, elaborada com a amostra Roakin contra a doença de Newcastle, via membrana da asa, observaram diferenças significativas na mortalidade entre as linhas C e K e entre famílias paternas na linhagem K.

GORDON et alii (1971) trabalharam com duas sub-linhas selecionadas para resistência ou suscetibilidade ao desafio com vírus da doença de Newcastle. Análises de variância mostraram diferenças significativas entre as sub-linhas, mas a seleção continuada com base nos dados de progênie falhou em ampliar a diferença entre as sub-linhas, ou em aumentar a uniformidade da resposta ao vírus desafio. Herdabilidade para mortalidade durante nove dias pós-desafio a duas semanas de idade variou de 0,07 a 0,17, indicando um baixo nível de variância genética para resistência ou suscetibilidade à doença de Newcastle nessa população. Estas observações revelaram a necessidade de melhor critério para identificação de famílias com potenciais genéticos divergentes para resistência à doença de Newcastle.

• PELEG et alii (1976), estudando diferenças genéti-

cas na resposta imune ao vírus da doença de Newcastle, inocularam frangos com quatro semanas de idade, com vírus vivo atenuado ou vírus inativado. Sobrevivência pós-desafio foi estreitamente relacionada ao nível dos títulos inibidores da hemaglutinação. Herdabilidades baseadas nos componentes paternos da variância para vacinações com vírus atenuado e vírus inativado foram respectivamente 0,31 e 0,60. A correlação genética entre ambas foi 0,49.

GROSS et alii (1980) trabalharam com uma linha de galinhas submetidas a seleção bidirecional para baixo ou alto nível de anticorpos avaliados cinco dias pós-inoculação intravenosa de 0,1 ml de suspensão a 0,25% de eritrócitos de carneiro. Em dois experimentos onde o desafio foi efetuado quatro semanas após a vacinação a um dia de idade com amostra B1, 0 em 18 (0%) da sub-linha de elevada resposta imune e 14 em 19 (84%) da sub-linha de baixa resposta morreram com sinais da doença de Newcastle. Também foram notadas diferenças nos títulos dos anticorpos inibidores da hemaglutinação, indicando que a produção de anticorpos subsequente à imunização com eritrócitos de carneiro pode representar um componente da resistência geral às doenças.

HELLER et alii (1981) compararam a resposta imune às vacinações para doença de Newcastle, boubas aviária e *Escherichia coli* entre uma linhagem de galinhas beduínas nativa do deserto do Sinai, uma linhagem de postura comercial e cruzamentos recíprocos destas. Não foram encontradas diferenças nos níveis de anticorpos para vacina atenuada ou inativada de Newcastle, na proporção de aves apresentando imunidade pós-vacinal para boubas aviária ou na cinética dos anticorpos pós-vacinais para Newcastle. Entretanto as galinhas beduínas revelaram significativamente maiores títulos no teste de hemaglutinação indireta para *E. coli*, no 4º e 7º dia pós-inoculação, ocasionados pelo maior aumento da taxa de anticorpos ocorrido entre o 1º e 4º dia.

Por outro lado, SOLLER et alii (1981) confirmaram as

diferenças entre famílias na resposta imune ao vírus da doença de Newcastle, verificadas anteriormente por PELEG et alii (1976) e demonstraram a presença de diferenças familiares, de comparável magnitude, na resposta imune à *Escherichia coli*. Contudo, seus resultados não forneceram evidências para uma correlação genética na resposta aos dois antígenos, quando administrados simultaneamente.

Procurando verificar se diferenças entre plantéis avícolas, nos níveis de hemaglutininas naturais para eritrócitos de carneiro, poderiam servir como uma indicação das diferenças na capacidade global da resposta imunológica, KUPER-RON & PELEG (1983) imunizaram frangos de corte aos 28 dias de idade com vírus da doença de Newcastle, soroalbumina bovina e gamaglobulina humana, e mediram a resposta de anticorpos aos três antígenos referidos. Não foram encontradas correlações entre os níveis de hemaglutininas naturais e os anticorpos experimentalmente induzidos, ou entre os níveis de anticorpos para doença de Newcastle e os anticorpos para soroalbumina bovina e gamaglobulina humana. Uma correlação altamente significativa ( $r=0,37$ ) foi encontrada entre os títulos de anticorpos para soroalbumina bovina e gamaglobulina humana.

TAKAHASHI et alii (1984) selecionaram duas linhas de codornas japonesas para alto e baixo nível de anticorpos, após duas injeções à 4ª e 6ª semanas de idade, frente a antígeno viral inativado da doença de Newcastle. Após sete gerações de seleção, o nível de anticorpos da linha de alta resposta foi 24% maior que na linha controle não selecionada, ao passo que o nível na linha de baixa resposta foi aproximadamente 37% menor que o da linha controle.

## 2.2. Bronquite infecciosa

FALLAH-MOGHADDAM et alii (1984), estudando os aspectos genéticos da resposta imune humoral das galinhas de seis diferentes grupos de seleção da linha Arkansas frente a diferentes classes de antígenos, a saber, vacinas de Newcastle e

Bronquite Infecciosa, antígeno de *Salmonella pullorum*, eritrócitos de carneiro e vírus da doença infecciosa da bolsa de Fabrício e do sarcoma de Rous, encontraram diferenças altamente significativas entre os grupos de seleção para os títulos de cada anticorpo, exceto para o vírus da doença infecciosa da bolsa de Fabrício. Estas diferenças foram observadas nos grupos de seleção, bem como em suas descendências. Os resultados sugeriram uma maior influência de respostas imunes específicas do que de uma resposta imune geral, nos títulos dos anticorpos.

### 2.3. Eritrócitos de carneiro

WHITE & NIELSEN (1975) verificaram que a inoculação intravenosa de uma suspensão a 50% de eritrócitos de carneiro ( $10^5$  a  $10^{11}$  células), em galinhas de 12 semanas, produziu um rápido aumento de hemaglutininas 19 S, alcançando um máximo no 6º dia, seguido por rápida queda, levando a baixos níveis de anticorpos em torno do 14º - 15º dia.

GROSS (1979), comparando o efeito de diversas doses de eritrócitos de carneiro na resposta de anticorpos em duas linhagens selecionadas para alta ou baixa resposta de corticosterona aos stress social, verificou que os maiores títulos foram obtidos com a inoculação de 5% ou 50% de células, com pouca diferença aparente entre as linhagens. Contudo, verificou ser mais fácil identificar as aves de maior ou menor imunocompetência pela inoculação de 0,5% de células. Os antígenos foram administrados intravenosamente a frangos de seis a sete semanas, em volumes de 0,1 ml.

Dois experimentos de seleção bidirecional para produção e persistência de anticorpos, em galinhas, para eritrócitos de carneiro, foram conduzidos por SIEGEL & GROSS (1980). A seleção em um par de linhas foi para alto e baixo nível de anticorpos cinco dias pós-inoculação intravenosa de 0,1 ml de suspensão a 0,25% do antígeno; em outro par de linhas para persistência e não-persistência dos anticorpos cinco e 21 dias

pós-inoculação do antígeno. A resposta à seleção mostrou a existência de variação genética para alto e baixo nível de anticorpos cinco dias pós-inoculação e para persistência dos títulos. Não obtiveram resposta à seleção para não-persistência dos títulos.

ZIJPP & LEENSTRA (1980) determinaram os títulos de aglutininas totais, 2-mercaptoethanol (2-ME) sensíveis e 2-ME resistentes, em 598 galinhas de linhagem leve com 6 semanas de idade, após injeção intramuscular de um ml de papa de eritrócitos de carneiro. O maior valor médio para os anticorpos totais foi observado no 7º dia pós-inoculação. As herdabilidades variaram de 0 a 0,5 para todos os parâmetros. Concluíram que a resposta à seleção para o título de aglutininas totais é, por conseguinte, não facilmente previsível.

Os efeitos de vacinações virais e imunização com eritrócitos de carneiro na resposta humoral de frangas de postura foram pesquisados por ZIJPP et alii (1982), que vacinaram contra doença de Marek, Newcastle, Bronquite Infecciosa e doença infecciosa da bolsa de Fabrício, às idades recomendadas na prática comercial. À 7ª semana de idade foram imunizadas por injeção intramuscular de um ml de papa de eritrócitos de carneiro. Observaram que os títulos de anticorpos inibidores da hemaglutinação para bronquite infecciosa não foram afetados pela vacinação ou pela imunização. Já os anticorpos inibidores da hemaglutinação para Newcastle foram significativamente elevados pela vacinação e imunização. A resposta de anticorpos aglutinantes para eritrócitos de carneiro também foi positivamente afetada pela vacinação, consistindo em aumento da taxa de anticorpos 2-ME sensíveis.

Procurando verificar os efeitos da origem genética, tipo e dose de antígeno na resposta imune das aves, ZIJPP (1983a) determinou o título de aglutininas totais e 2-ME resistentes em frangos de três origens genéticas, a saber, uma linhagem de corte, uma de postura e uma de médio peso. As aves foram inoculadas via intramuscular, aos 34 dias de idade,

com um ml de uma suspensão de eritrócitos de carneiro a 100, 10 ou 1% em salina fosfatada tamponada. Os títulos de anticorpos foram determinados nos dias zero, três, sete e 14 pós-injeção. Diferenças entre os grupos genéticos determinaram diferenças nos títulos de aglutininas totais. A posição das linhagens variou com o dia pós-injeção. A resposta imune celular à inoculação de fitohemaglutinina (FHA) foi avaliada aos 49 dias de idade, após injeção intradérmica na membrana da asa. A linhagem de corte apresentou a mais forte reação à FHA, seguida da linhagem de médio peso e da leve, sendo as diferenças significativas. Não foi observada correlação entre os títulos de aglutininas para eritrócitos de carneiro e a resposta à FHA. Os autores concluíram experimentalmente que a seleção para resposta imune geral pode significar a combinação de parâmetros de respostas humorais e mediadas por células.

ZIJPP et alii (1983) procederam à análise genética das respostas imunes, primária e secundária, em aves inoculadas aos 38 e 66 dias de idade, via intramuscular, com um ml de uma suspensão a 25% de eritrócitos de carneiro. Os títulos foram determinados nos dias zero, três, cinco, sete e 10 pós-injeção. Os maiores valores para os títulos de aglutininas totais foram observados nos dias sete ( $5,2 \log_2$ ) e cinco ( $7,0 \log_2$ ), para as respostas primária e secundária, respectivamente. A resposta primária foi caracterizada por um nível baixo de anticorpos 2-ME resistentes. Não foram observadas indicações de que a influência genética na resposta secundária seja menos forte que a influência genética na resposta primária.

#### 2.4. Parâmetros imunológicos X características produtivas

Segundo GAVORA & SPENCER (1978) o conhecimento das relações genéticas da resistência às doenças com as características economicamente importantes é essencial para seleção prática. Contudo, sua avaliação é difícil e estimativas das correlações genéticas em populações afetadas por doenças são

menos úteis, porque, nessas circunstâncias, é impossível determinar se as aves produzem menos porquanto afetadas por doenças ou porque têm um menor potencial genético para a característica medida. Uma maneira possível de se evitar este problema seria usar parte da população desafiada com o agente, para se medir a resistência é outra, em ambiente livre de doenças, para verificação das características produtivas. Por outro lado, essas estimativas são igualmente muito úteis para a determinação dos efeitos da seleção para características produtivas na resistência às doenças.

SIEGEL & GROSS (1980) observaram frangos significativamente mais pesados, a quatro semanas de idade, na linha selecionada para nível baixo de anticorpos, comparativamente aos animais das linhas controle e de alto nível de anticorpos. As linhas selecionadas para persistências de anticorpos não apresentaram diferenças nas características produtivas.

Analogamente, GROSS et alii (1980) verificaram, após infecção com *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*, redução do crescimento e perda de peso nas linhas selecionadas para baixo e alto nível de anticorpos para eritrócitos de carneiro, com mais severos efeitos na linha de alta resposta imune.

SIEGEL et alii (1982), pesquisando certas características produtivas nas 6ª, 7ª e 8ª gerações de uma linhagem de galinhas de postura, submetida a seleção bidirecional para níveis alto e baixo de anticorpos para eritrócitos de carneiro, verificaram que as fêmeas da linha de nível baixo de anticorpos eram significativamente mais pesadas aos 28 dias de idade. Este mesmo padrão apresentou-se aos 168 dias de idade, com as diferenças sendo significativas nas 6ª e 7ª gerações. Frangas da linhagem de nível baixo começaram sua produção a idade significativamente menores. Não foram encontradas diferenças, entre as linhas, no tocante ao peso dos ovos. Maior valor para densidade dos ovos foi significativamente encontrado na linha de nível baixo de anticorpos. Independente da idade, a duração da fertilidade foi significativamente menor na

linha selecionada para alto nível de anticorpos. Em todas as gerações, a mortalidade após 140 dias foi maior na linha de nível baixo de anticorpos, com a diferença sendo significativa para o período de 140 a 392 dias de idade, na 7ª geração.

Por outro lado, ZIJPP (1983a) considera que a resposta imune de anticorpos pode ser independente das diferenças de peso corporal, em grupos geneticamente semelhantes.

ZIJPP (1983b) pondera que, apesar das escassas informações com respeito às correlações entre resistência às doenças, parâmetros imunológicos e características economicamente importantes, a relação genética negativa entre peso corporal e resposta imune humoral pode levar a uma reconsideração das metas de seleção das linhagens de corte na moderna indústria avícola.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. Local

O trabalho, que constou de dois experimentos, foi realizado nas instalações da Fazenda Experimental "Professor Hélio Barbosa" da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais, situada no município de Igarapé e no Laboratório Nacional de Referência Animal LANARA, localizado na cidade de Pedro Leopoldo, MG, no período de setembro/1984 a fevereiro/1985.

#### 3.2. Aves de experimentação

Foram utilizados um cruzamento e cinco linhagens comerciais de frangos de corte, oriundos de plantéis submetidos ao seguinte programa básico de vacinação simultânea contra a doença de Newcastle (NC) e a Bronquite Infecciosa (BI):

- . 10-12 dias: vacina a vírus vivo, via ocular.
- . 34-45 dias: vacina a vírus vivo, nebulização.
- . 90-100 dias: vacina a vírus vivo, nebulização.
- . 20-22 semanas: vacina inativada oleosa, via intramuscular.

Os ovos férteis, procedentes de matrizes na faixa de 40-50 semanas de idade, foram incubados no mesmo dia, e os

pintos , após seleção e vacinação contra doença de Marek e bouba aviária, foram alojados em galpão, numa razão de 10 aves/ $m^2$ . De cada linhagem foram alojadas 500 aves (100 aves por repetição) em cinco diferentes boxes escolhidos ao acaso.

Precauções sanitárias, temperatura, luz e regime de nutrição foram de acordo com a prática comercial. As composições das dietas se encontram na TAB. I.

Foram utilizadas as linhagens PILCH, COBB, HUBBARD, COBB 58 e ARBOR-ACRES, codificadas respectivamente B, D, E, F e G e o cruzamento PETERSON ♂ x ♀ HUBBARD, denominado C.

### 3.3. Experimento I

Teve como objetivos verificar o ganho de peso das aves e determinar o nível de anticorpos inibidores da hemaglutinação para NC e BI.

#### 3.3.1. Esquema de vacinação

Aos 15 dias de idade, as aves receberam, via ocular,  $10^{3,5}$   $DIE_{50}$  do vírus da BI (amostra Massachussets H120\*) e  $10^{6,5}$   $DIE_{50}$  do vírus da doença de NC (amostra LaSota\*). Foram revacinadas, por nebulização\*\*, aos 31 dias de idade, com as mesmas amostras vacinais e doses.

#### 3.3.2. Preparo das amostras de soro

Foram utilizadas, para colheita de sangue, 10 aves/repetição, perfazendo um total de 50 soros/tratamento, a cada sangria. As aves foram sangradas na veia ulnar no dia da pri-

---

\* SALSBUY Laboratório Ltda, Campinas, São Paulo (Brasil)

\*\* Atomist Eletric Sprayer - model 1021

ROOT - LOWELL Corporation, Lowell, Michigan (EUA)

meira vacinação, 14 dias mais tarde e 12 dias após a segunda vacinação. As amostras de sangue foram conservadas por uma noite a 4°C e o soro separado por centrifugação e estocado a -20°C, de maneira que os testes de inibição da hemaglutinação (IH) de todas as amostras, frente a determinado antígeno, fossem feitos simultaneamente.

### 3.3.3. Prova sorológica para NC

#### 3.3.3.1. Antígeno

Foi utilizado antígeno inativado elaborado segundo BEARD et alii (1975), com título hemaglutinante de 1:3200. Ovos embrionados de 10 dias de incubação foram inoculados, via saco alantoideano com 0,1 ml de uma diluição  $10^{-4}$  de vacina comercial com título de  $10^8$  DIE<sub>50</sub>/ml (amostra LaSota). Após 72 horas de incubação a 37°C, os ovos foram esfriados por 16 horas a 4°C e o líquido alantoíde (LA) colhido. Formalina foi adicionada a uma concentração final de 0,1% e o LA assim tratado foi deixado a 37°C por 16 horas. Após inativação, o LA foi centrifugado a 250 g por 15 minutos em centrífuga IEC B-20 A\*, para remoção de fragmentos celulares. Polietilenoglicol\*\* (PEG) granular de peso molecular 6.000 e cloreto de sódio a concentrações finais, respectivamente, de 10% e 2% foram adicionados ao LA. A mistura foi submetida a agitação suave em agitador magnético até a dissolução do PEG e do NaCl. Após 2 horas a 4°C, o LA foi novamente clarificado por centrifugação a 250 g por 15 minutos em centrífuga mantida refrigerada. O líquido sobrenadante foi então transferido a outros frascos e submetido a uma adicional centrifugação a 3200 g por 90 minutos a 4°C. Após desprezar o sobrenadante, o depósito formado foi recuperado em

---

\* DAMON/IEC Division, Needham Hts., Massachussetts (EUA)

\*\* RIEDEL-de HAEN AG, Seelze, Hannover (Alemanha Ocidental)

um volume de solução salina fosfatada 0,05M (pH 7,2), equivalente a 1/20 do volume original de LA e submetido a sonicação\*, em três ciclos de 30 segundos e 60 watts, para dispersar qualquer grumo. O antígeno sonicado foi diluído em igual volume de solução salina fosfatada (pH 7,2) contendo 50% de glicerina e estoçado a 4°C.

#### 3.3.3.2. Eritrócitos

Sangue de quatro frangos de quatro a seis semanas de idade, livres de anticorpos para NC e BI, foi colhido em solução de Alsever. Os eritrócitos foram lavados três vezes em solução salina fisiológica e diluídos para obter-se uma suspensão a 1%. Esta teve sua concentração aferida por centrifugação em tubo de Hopkins modificado\*\*. A suspensão a 1% foi estocada a 4°C por um período máximo de 48 horas.

#### 3.3.3.3. Diluente

Solução salina fisiológica foi utilizada como diluente.

#### 3.3.3.4. Hemaglutinação (HA)

O título hemaglutinante do antígeno viral foi determinado através da prova de HA em sistema de microtítulo, basicamente segundo técnica descrita por ALLAN et alii (1978). Os testes de titulação da HA e da inibição da hemaglutinação (IH) foram realizados em microplacas\*\*\* de 96 cavidades com fundo em "U", usando volumes constantes de 0,150 ml (150 µl).

---

\* Lab-Line ULTRATIP, model 9100

LAB-LINE INSTRUMENTS, Inc, Melrose Park, Illinois (EUA)

\*\* IVA, Buenos Aires (Argentina)

\*\*\* DYNATECH Laboratories Inc., Alexandria, Virginia (EUA)

A partir de uma diluição "de trabalho" de 1:10 do antígeno estoque, foram feitas, em tubos, diluições iniciais de 1:4, 1:5, 1:6 e 1:7. Com o uso de micropipetas\* padronizadas para liberação de 0,05 ml e microdiluidores\* calibrados para transferência de 0,05 ml, foram feitas diluições duplas a partir dessas diluições iniciais e um igual volume de diluente (equivalente ao volume do soro no teste de IH) foi adicionado. Um volume (0,05 ml) da suspensão de eritrócitos a 1% foi adicionado, a placa submetida a agitação\*\* por 15 segundos e deixada à temperatura do laboratório. Após um período de 30 a 45 minutos, a placa foi examinada, sendo o título hemaglutinante expresso como a recíproca da maior diluição que causou 50% de hemaglutinação, que corresponde a uma unidade hemaglutinante (UHA).

#### 3.3.3.5. Inibição da hemaglutinação (IH)

A presença de anticorpos inibidores da hemaglutinação para o vírus de NC foi determinada através da microtécnica de IH descrita por ALLAN et alii (1978). Utilizando micropipetas e microdiluidores de 0,05 ml, os soros foram diluídos em microplacas. A cada diluição foi adicionado um volume de 0,05 ml de antígeno viral contendo 4 UHA, sendo as placas agitadas por 15 segundos e deixadas por 15 minutos à temperatura do laboratório. Um volume da suspensão de eritrócitos a 1% foi adicionado a cada mistura soro-vírus, seguido de novo período de agitação. As placas foram examinadas após um período de 30 a 45 minutos à temperatura do laboratório, sendo os títulos inibidores da hemaglutinação lidos como a recíproca da maior diluição onde ocorreu 50% de inibição. Controles apropriados de soros positivo, negativo e eritrócitos foram mantidos nas mes-

---

\* DYNATECH Laboratories Inc., Alexandria, Virginia (EUA)

\*\* Microshaker II

DYNATHEC Laboratories Inc., Alexandria, Virginia (EUA)

mas condições. A concentração do antígeno (4 UHA) foi aferida por retrotitulação. Todos os títulos de IH foram adequadamente expressos em termos de  $\log_2$ .

### 3.3.4. Prova sorológica para BI

#### 3.3.4.1. Antígeno

Foi utilizado antígeno elaborado segundo KING (1982a), com título hemaglutinante de 1:128. Ovos embrionados de 10 dias de incubação foram inoculados, via saco alantoideano com 0,1 ml de uma diluição  $10^{-1}$  do vírus estoque, amostra M-41 de baixa passagem. Após 30-48 horas de incubação a 37°C, os ovos foram esfriados por 16 horas a 4°C e o líquido alantóide (LA) co<sub>l</sub>hido. Após clarificação por centrifugação a 1000 g por 45 minutos, em centrífuga refrigerada a 4°C, o LA foi concentrado por nova centrifugação a 39.000 g por 40 minutos. O material viral sedimentado foi recuperado em solução salina tamponada com HEPES\* (pH 6,5), em volume equivalente a 1/100 do volume original de LA. Fosfolipase C\*\* tipo 1, diluída a uma concentração de uma unidade/ml em solução salina HEPES tamponada, foi misturada em partes iguais com o vírus 100 X concentrado. A mistura vírus-enzima foi incubada a 37°C por duas horas. O antígeno foi esto<sub>c</sub>ado a 4°C.

#### 3.3.4.2. Eritrócitos

Foi utilizada suspensão a 1% em solução salina fosfatada 0,05 M (pH 7,2), de eritrócitos de frangos, preparada como no item 3.3.3.2.

---

\* INLAB, São Paulo, SP (Brasil)

\*\* SIGMA Chemical Co., St. Louis, Missouri (EUA)

#### 3.3.4.3. Diluente

Solução salina fosfatada 0,05 M (pH 7,2) foi utilizada como diluente.

#### 3.3.4.4. Hemaglutinação (HA)

O título hemaglutinante do antígeno viral foi determinado através da prova de HA em sistema de microtítulo, segundo técnica padronizada por ALEXANDER et alii (1983). Os testes de titulação da HA e da inibição da hemaglutinação (IH) foram realizados em microplacas de 96 cavidades com fundo em "U", usando volumes constantes de 0,075 ml (75 µl). Foram feitas, em tubos, diluições iniciais de 1:4, 1:5, 1:6 e 1:7. Com o uso de micropipetas padronizadas para liberação de 0,025 ml e microdiluidores calibrados para transferência de 0,025 ml, foram feitas diluições duplas a partir das diluições iniciais e um igual volume de diluente (equivalente ao volume do soro no teste de IH) foi adicionado. Um volume (0,025 ml) da suspensão de eritrócitos a 1% foi adicionado, a placa submetida a agitação por 15 segundos e deixada a 4°C por um período de 30 a 45 minutos. O título hemaglutinante foi expresso como a recíproca da maior diluição que causou 100% de hemaglutinação, que corresponde a uma UHA.

#### 3.3.4.5. Tratamento dos soros

Para melhor leitura da prova de IH, os soros foram previamente tratados com caolim\*, em microplacas de 96 cavidades de fundo chato, segundo metodologia descrita por KING (1982b). Foram adicionados 0,05 ml de soro e 0,150 ml de uma suspensão de caolim a 12,5% em diluente, a cada cavidade da placa, que foi coberta por tampa adesiva, agitada por 15 segundos e deixada

---

\* FISHER Scientific Co., Fair Lawn, New Jersey (EUA)

da à temperatura do laboratório por uma hora. O caolim foi sedimentado por centrifugação\* a 500 g por 15 minutos. O sobrenadante foi considerado como uma diluição a 1:4 do soro.

#### 3.3.4.6. Inibição da hemaglutinação (IH)

A presença de anticorpos inibidores da hemaglutinação para o vírus da BI foi determinada através da microtécnica de IH descrita por ALEXANDER et alii (1983). Utilizando micropipetas e microdiluidores de 0,025 ml, os soros previamente tratados foram diluídos em microplacas. A cada diluição foi adicionado um volume de 0,025 ml de antígeno viral contendo 4 UHA, sendo as placas agitadas por 15 segundos e deixadas por 15 minutos a 4°C. Um volume da suspensão de eritrócitos a 1% foi adicionado a cada mistura soro-vírus, seguido de novo período de agitação. As placas foram examinadas após um período de 30 a 45 minutos a 4°C, sendo os títulos inibidores da hemaglutinação lidos como a recíproca da maior diluição onde ocorreu 100% de inibição. Controles apropriados de soros positivo, negativo e eritrócitos foram mantidos nas mesmas condições. A concentração do antígeno (4 UHA) foi aferida por retrotitulação. Todos os títulos de IH foram adequadamente expressos em termos de  $\log_2$ . Devido ao elevado custo do antígeno de BI, apenas os soros dos tratamentos B, C e F - foram analisados na oportunidade.

#### 3.3.5. Pesagem das aves

O peso das aves foi obtido ao final do experimento. Aos 49 dias de idade todas as aves de cada repetição foram pesadas e calculado o peso médio/ave.

---

\*\* Centrifuge carrier 001-010 - 5102

DYNATHEC Laboratories Inc., Alexandria, Virginia (EUA)

### 3.4. Experimento II

Teve como objetivos verificar o ganho de peso das aves e determinar o nível de hemaglutininas para eritrócitos de carneiro. Foram utilizadas as linhagens B, D, E, F e G.

#### 3.4.1. Imunização

Aos 28 dias de idade, 10 aves de cada repetição, totalizando 50 aves/linhagem, receberam, via intramuscular, 1,0ml de uma suspensão a 10% de eritrócitos de carneiro em solução salina fisiológica. A dose foi injetada em duas porções iguais, uma em cada coxa. Os eritrócitos de carneiro foram obtidos, em uma solução de heparina\*, de seis diferentes animais, lavados três vezes em salina fisiológica e a suspensão teve sua concentração ajustada por centrifugação em tubo de Hopkins modificado.

#### 3.4.2. Preparo das amostras de plasma

As aves foram sangradas na veia ulnar no dia da imunização e no 10º dia pós-inoculação. Antes da colheita do sangue, as seringas foram umedecidas com uma solução de heparina para evitar a coagulação. As amostras foram conservadas por uma noite a 4°C e o plasma separado por centrifugação e estocado a -20°C.

#### 3.4.3. Teste de hemaglutinação

A presença de anticorpos hemaglutinantes para eritrócitos de carneiro foi determinada, em sistema de microtítulo, segundo técnica descrita por ZIJPP & LEENSTRA (1980). O título total de anticorpos hemaglutinantes foi obtido por duplas diluições do plasma em solução salina fosfatada 0,05 M (pH 7,2),

---

\* GLAXO do Brasil S.A., Rio de Janeiro, RJ (Brasil)

em microplacas com fundo em "U", utilizando micropipetas e microdiluidores de 0,05 ml e consecutiva adição de um volume (0,05ml) de suspensão a 2% de eritrócitos de carneiro em diluente. Anticorpos resistentes ao 2-mercaptoethanol (2-ME) foram determinados, de maneira similar, em amostra de plasma previamente tratado, por incubação a 37°C por 30 minutos, com igual volume de uma solução a 0,2M de 2-ME\* em solução salina fosfatada. As leituras dos testes foram feitas após um tempo de reação de 45-60 minutos. Os títulos de anticorpos total e 2-mercaptoethanol resistentes (2-ME<sub>r</sub>) foram expressos como log<sub>2</sub> da recíproca da maior diluição onde ocorreu 100% de aglutinação. A redução do título total, devido ao tratamento pelo 2-ME, foi classificada como anticorpo 2-ME sensível (2-ME<sub>s</sub>).

#### 3.4.4. Pesagem das aves

Foi adotado o mesmo procedimento do item 3.3.5.

#### 3.5. Delineamento experimental e análise estatística

O delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado, com cinco repetições por tratamento e 10 aves por repetição.

Como é usual em análises deste tipo de dados, os níveis de anticorpos foram expressos como a recíproca da diluição do soro considerada como leitura final e transformados na notação log<sub>2</sub>. Todas análises subsequentes foram efetuadas com os níveis de anticorpos assim referidos. Os resultados foram submetidos à análise de variância (TAB. II, III e IV), conforme SNEDECOR & COCHRAN (1967). Para a análise das diferenças entre tratamento foi utilizado o teste de Duncan (GOMES, 1976).

---

\* BDH Chemicals Ltd., Poole, Inglaterra

TABELA I - Composição das dietas

| Ingredientes           | Inicial | Final  |
|------------------------|---------|--------|
|                        | %       | %      |
| Milho                  | 55,00   | 58,00  |
| Soja                   | 38,05   | 33,05  |
| Óleo de vísceras       | 3,00    | 5,00   |
| Fosfato bicálcico      | 2,00    | 2,00   |
| Calcário               | 1,10    | 1,10   |
| Sal                    | 0,35    | 0,35   |
| Premix*                | 0,50    | 0,50   |
| Total                  | 100,00  | 100,00 |
| Proteína bruta (%)     | 22,2    | 20,1   |
| Energia (Kcal EM/kg)   | 3010,3  | 3174,7 |
| Cálcio (%)             | 1,02    | 1,01   |
| Fósforo digestível (%) | 0,47    | 0,47   |

\* Vitaminas, minerais, metionina, coccidicida

TABELA II - Modelo da análise de variância para os níveis de anticorpos inibidores da hemaglutinação para NC e peso das aves (experimento I)

| Fontes de variação | Graus de liberdade |
|--------------------|--------------------|
| Total              | 29                 |
| Tratamentos        | 5                  |
| Resíduo            | 24                 |

TABELA III - Modelo da análise de variância para os níveis de anticorpos hemaglutinantes para eritrócitos de carneiro e peso das aves (experimento II)

| Fontes de variação | Graus de liberdade |
|--------------------|--------------------|
| Total              | 19                 |
| Tratamentos        | 4                  |
| Resíduo            | 15                 |

TABELA IV - Modelo da análise de variância para os níveis de anticorpos inibidores da hemaglutinação para BI

| Fontes de variação | Graus de liberdade |
|--------------------|--------------------|
| Total              | 14                 |
| Tratamentos        | 2                  |
| Resíduo            | 12                 |

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Experimento I

#### 4.1.1. Resposta imune à vacinação contra a doença de NC

Os títulos médios dos anticorpos inibidores da hemaglutinação, expressos em termos de  $\log_2$ , encontram-se na TAB. V. As seis linhagens estudadas apresentaram diferenças significativas nos níveis de anticorpos inibidores da hemaglutinação de origem materna, ou seja, imunidade passiva (TAB. VI). Os títulos médios da resposta imune à primovacinação foram semelhantes entre si (TAB. VII). Contudo, a linhagem B apresentou uma resposta imune secundária maior do que as demais linhagens, sendo esta diferença significativa (TAB. VIII). o GRAF. 1 elucida melhor as tendências observadas.

#### 4.1.2. Resposta imune à vacinação contra a BI

Os títulos médios dos anticorpos inibidores da hemaglutinação, expressos em termos de  $\log_2$ , encontram-se na TAB. IX. Foram observadas diferenças significativas nos níveis de anticorpos de origem materna e na resposta primária ao vírus da BI (TAB. X e XI). Entretanto, as médias obtidas na resposta secundária foram semelhantes entre si (TAB. XII).



TABELA V - Títulos médios de anticorpos inibidores da hemaglutinação para o vírus da doença de NC, em soros colhidos no dia da primovacinação, no 14º dia após a primovacinação e 12º dia após a revacinação

| Tratamento | Títulos médios de anticorpos ( $\log_2$ )* |                   |                     |
|------------|--------------------------------------------|-------------------|---------------------|
|            | Anticorpos maternos                        | Resposta primária | Resposta secundária |
| B          | 1,52 <sub>c</sub>                          | 2,84 <sub>a</sub> | 3,49 <sub>a</sub>   |
| C          | 1,44 <sub>c</sub>                          | 2,76 <sub>a</sub> | 2,10 <sub>b</sub>   |
| D          | 2,37 <sub>b</sub>                          | 2,79 <sub>a</sub> | 1,98 <sub>b</sub>   |
| E          | 0,75 <sub>d</sub>                          | 3,18 <sub>a</sub> | 2,40 <sub>b</sub>   |
| F          | 3,36 <sub>a</sub>                          | 2,88 <sub>a</sub> | 2,30 <sub>b</sub>   |
| G          | 2,51 <sub>b</sub>                          | 2,71 <sub>a</sub> | 2,28 <sub>b</sub>   |

\* Médias com letras distintas, em uma mesma coluna, diferem significativamente ao nível de 5% de probabilidade.

TABELA VI - Quadrado médio da análise de variância para o nível de anticorpos maternos inibidores da hemaglutinação para o vírus da doença de NC

| Fontes de variação | Graus de liberdade | Quadrado médio |
|--------------------|--------------------|----------------|
| Total              | 29                 |                |
| Tratamentos        | 5                  | 4,34*          |
| Resíduo            | 24                 | 0,18           |

\* Significativo ao nível de 5% de probabilidade

TABELA VII - Quadrado médio da análise de variância para o nível de anticorpos inibidores da hemaglutinação para o vírus da doença de NC - resposta primária

| Fontes de variação | Graus de liberdade | Quadrado médio |
|--------------------|--------------------|----------------|
| Total              | 29                 |                |
| Tratamentos        | 5                  | 0,14           |
| Resíduo            | 24                 | 0,12           |

TABELA VIII - Quadrado médio da análise de variância para o nível de anticorpos inibidores da hemaglutinação para o vírus da doença de NC - resposta secundária

| Fontes de variação | Graus de liberdade | Quadrado médio |
|--------------------|--------------------|----------------|
| Total              | 29                 |                |
| Tratamentos        | 5                  | 1,47*          |
| Resíduo            | 24                 | 0,22           |

\* Significativo ao nível de 5% de probabilidade

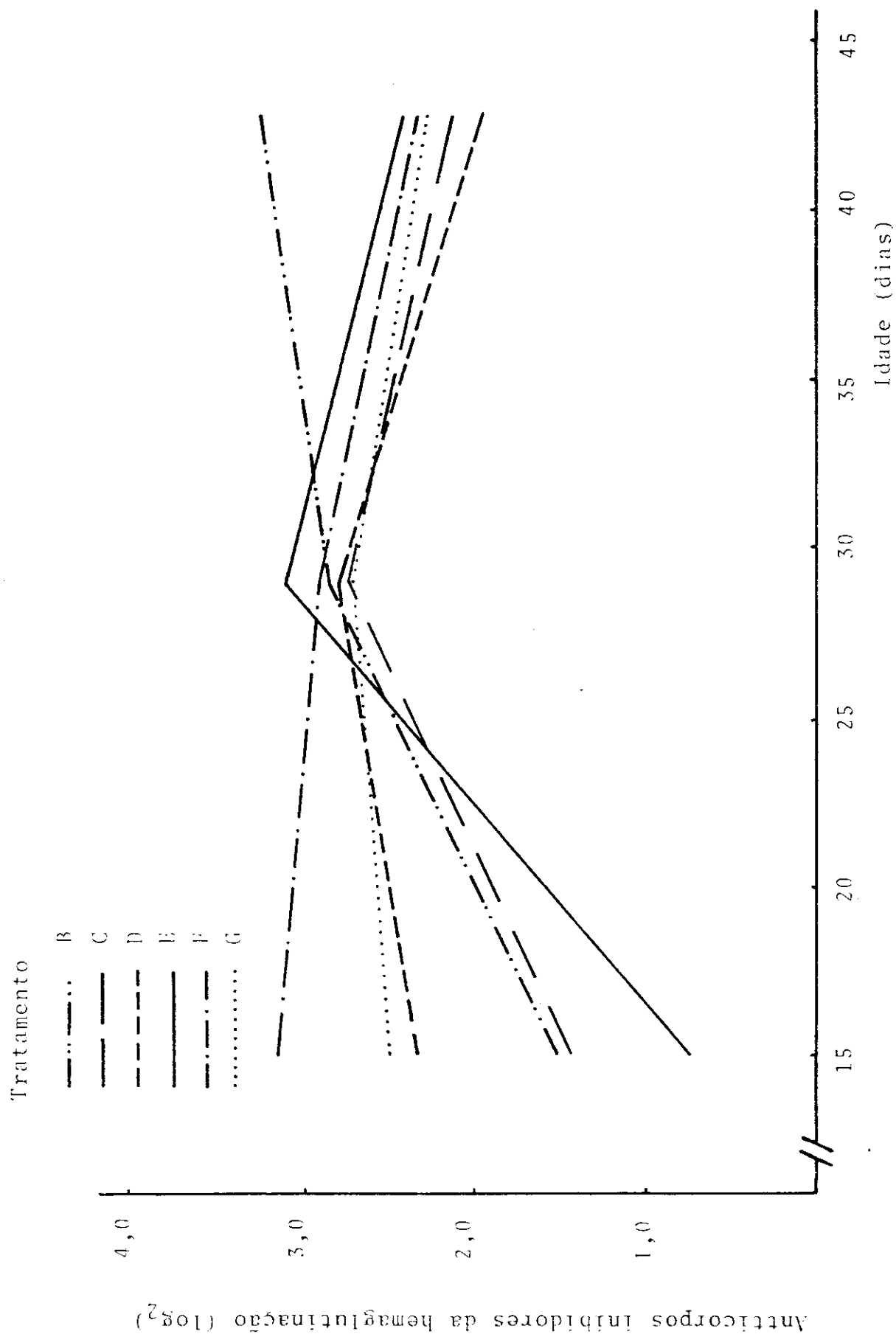


GRÁFICO 1 - Títulos médios de anticorpos inibidores da hemaglutinação para doença de Newcastle, nas cinco linhagens e no cruzamento estudados

TABELA IX - Títulos médios de anticorpos inibidores da hemaglutinação para o vírus da BI, em soros colhidos no dia da primovacinação, no 14º dia após a primovacinação e 12º dia após a revacinação

| Tratamento | Títulos médios de anticorpos ( $\log_2$ )* |                   |                     |
|------------|--------------------------------------------|-------------------|---------------------|
|            | Anticorpos maternos                        | Resposta primária | Resposta secundária |
| B          | 3,84b                                      | 2,72ab            | 2,50a               |
| C          | 4,12a                                      | 2,58b             | 2,44a               |
| F          | 4,24a                                      | 2,86a             | 2,30a               |

\* Médias com letras distintas, em uma mesma coluna, diferem significativamente

TABELA X - Quadrado médio da análise de variância para o nível de anticorpos maternos inibidores da hemaglutinação para o vírus da BI

| Fontes de variação | Graus de liberdade | Quadrado médio |
|--------------------|--------------------|----------------|
| Total              | 14                 |                |
| Tratamentos        | 2                  | 0,21*          |
| Resíduo            | 12                 | 0,03           |

\* Significativo ao nível de 5% de probabilidade

TABELA XI - Quadrado médio da análise de variância para o nível de anticorpos inibidores da hemaglutinação para o vírus da BI - resposta primária

| Fontes de variação | Graus de liberdade | Quadrado médio |
|--------------------|--------------------|----------------|
| Total              | 14                 |                |
| Tratamentos        | 2                  | 0,10*          |
| Resíduo            | 12                 | 0,03           |

\* Significativo ao nível de 5% de probabilidade

TABELA XII - Quadrado médio da análise de variância para o nível de anticorpos inibidores da hemaglutinação para o vírus da BI - resposta secundária

| Fontes de variação | Graus de liberdade | Quadrado médio |
|--------------------|--------------------|----------------|
| Total              | 14                 |                |
| Tratamento         | 2                  | 0,06           |
| Resíduo            | 12                 | 0,04           |

#### 4.1.3. Peso médio das aves

Os pesos corporais, obtidos aos 49 dias de idade, são apresentados na TAB. XIII e a análise de variância na TAB. XIV. As aves mais leves foram da linhagem B. Não houve diferenças significativas entre as aves dos tratamentos C, E e G, ou entre as linhagens D e E ou, ainda, entre as linhagens D e F.

#### 4.2. Experimento II

##### 4.2.1. Resposta imune à inoculação de eritrócitos de carneiro

Hemaglutininas naturais, pesquisadas nos soros colhidos no dia da imunização, estavam presentes em algumas aves, com o título médio para todas as linhagens de 0,45 ( $\log_2$ ). Considerando que virtualmente todos os títulos para os anticorpos 2-ME resistentes apresentariam valor 0 (ZIJPP & LEENSTRA, 1980), não procedemos sua pesquisa.

Na TAB. XV são apresentados os títulos médios da resposta de anticorpos no 10º dia pós-inoculação de eritrócitos de carneiro. As diferentes linhagens apresentaram resultados estatisticamente semelhantes entre si (TAB. XVI, XVII e XVIII).

##### 4.2.2. Peso médio das aves

Os pesos corporais, obtidos aos 49 dias de idade, são apresentados na TAB. XIX e a análise de variância na TAB. XX. As aves mais leves foram da linhagem B e as mais pesadas da linhagem E, sendo a diferença significativa. Não houve diferença significativa entre as linhagens D, F e G, que apresentaram pesos quase iguais.

TABELA XIII - Peso médio dos frangos aos 49 dias de idade, em quilogramas - experimento I

| Tratamento | Peso médio*         |
|------------|---------------------|
| B          | 1,989 <sub>d</sub>  |
| C          | 2,154 <sub>a</sub>  |
| D          | 2,085 <sub>bc</sub> |
| E          | 2,121 <sub>ab</sub> |
| F          | 2,053 <sub>c</sub>  |
| G          | 2,128 <sub>a</sub>  |

\* Médias com letras distintas diferem significativamente ao nível de 5% de probabilidade

TABELA XIV - Quadrado médio da análise de variância para peso dos frangos aos 49 dias de idade - experimento I

| Fontes de variação | Graus de liberdade | Quadrado médio |
|--------------------|--------------------|----------------|
| Total              | 29                 |                |
| Tratamentos        | 5                  | 0,018*         |
| Resíduo            | 24                 | 0,001          |

\* Significativo ao nível de 5% de probabilidade

TABELA XV - Títulos médios de anticorpos hemaglutinantes totais, 2-ME sensíveis e 2-ME resistentes, para eritrócitos de carneiro, em soros colhidos no 10º dia pós-inoculação

| Tratamento | Títulos médios de anticorpos ( $\log_2$ ) |                   |                   |
|------------|-------------------------------------------|-------------------|-------------------|
|            | Totais                                    | 2-ME <sub>s</sub> | 2-ME <sub>r</sub> |
| B          | 2,90                                      | 2,36              | 0,54              |
| D          | 2,28                                      | 1,80              | 0,48              |
| E          | 2,78                                      | 2,08              | 0,70              |
| F          | 2,78                                      | 2,14              | 0,64              |
| G          | 2,40                                      | 1,90              | 0,50              |

TABELA XVI - Quadrado médio da análise de variância para o nível de anticorpos hemaglutinantes totais para eritrócitos de carneiro, 10 dias pós-inoculação

| Fontes de variação | Graus de liberdade | Quadrado médio |
|--------------------|--------------------|----------------|
| Total              | 24                 |                |
| Tratamentos        | 4                  | 0,37           |
| Resíduo            | 20                 | 0,32           |

TABELA XVII - Quadrado médio da análise de variância para o nível de anticorpos hemaglutinantes 2-ME sensíveis, 10 dias pós-inoculação

| Fontes de variação | Graus de liberdade | Quadrado médio |
|--------------------|--------------------|----------------|
| Total              | 24                 |                |
| Tratamentos        | 4                  | 0,24           |
| Resíduo            | 20                 | 0,25           |

TABELA XVIII - Quadrado médio da análise de variância para o nível de anticorpos hemaglutinantes 2-ME resistentes, 10 dias pós-inoculação

| Fontes de variação | Graus de liberdade | Quadrado médio |
|--------------------|--------------------|----------------|
| Total              | 24                 |                |
| Tratamentos        | 4                  | 0,05           |
| Resíduo            | 20                 | 0,05           |

TABELA XIX - Peso médio dos frangos aos 49 dias de idade, em quilogramas - experimento II

| Tratamento | Peso médio*        |
|------------|--------------------|
| B          | 1,865 <sub>c</sub> |
| D          | 1,975 <sub>b</sub> |
| E          | 2,080 <sub>a</sub> |
| F          | 2,008 <sub>b</sub> |
| G          | 1,990 <sub>b</sub> |

\*Médias com letras distintas diferem significativamente ao nível de 5% de probabilidade.

TABELA XX - Quadrado médio da análise de variância para peso dos frangos aos 49 dias de idade - experimento II

| Fontes de variação | Graus de liberdade | Quadrado médio |
|--------------------|--------------------|----------------|
| Total              | 24                 |                |
| Tratamentos        | 4                  | 0,030*         |
| Resíduo            | 20                 | 0,001          |

\* Significativo ao nível de 5% de probabilidade.

## 5. DISCUSSÃO

### 5.1. Experimento I

#### 5.1.1. Resposta imune para BI

Segundo GELB & KILLIAN (1984), é importante reconhecer os fatores que podem influenciar a extensão da resposta de anticorpos ao vírus da BI, medida por teste de inibição da hemaglutinação ou teste de vírus-neutralização. Esses incluem a virulência viral afetada pelo número de passagens em embrião de galina, idade da ave quando da vacinação e o nível de anticorpos maternos, em aves precocemente inoculadas.

Os títulos dos anticorpos inibidores da hemaglutinação para o vírus da BI (TAB. IX) não apresentaram aumento após as vacinações com a amostra H120, que apresenta um alto grau de adaptação a embrião de galinha. Esses resultados concordam com os achados por GOUCH & ALEXANDER (1979), TIMMS & BRACEWELL (1981) e ZIJPP et alii (1982).

Com referência à idade da primovacinação, ANDRADE et alii (1983) consideram que a vacinação à 2ª semana de vida pode resultar em uma resposta imune satisfatória, porquanto os anticorpos de origem materna já baixaram a níveis tais que diminuem a possibilidade da interferência na infecção pelo vírus vacinal da BI. Por outro lado, DAVELAAR & KOUWENHOVEN (1977)

sugeriram que as aves, a esta idade, já apresentariam maturidade imunológica suficiente para resistir aos efeitos patogênicos do vírus vacinal.

GELB & KILLIAN (1984) ponderam que o teste de IH para BI é um método adequado para diagnóstico e rápida sorotipagem de amostras isoladas do campo. Da mesma maneira, pode ser útil na avaliação de anticorpos em soros de aves convencionalmente criadas; contudo, deve ser objeto de uma interpretação cuidadosa, considerando-se os vários fatores que afetam a complexa resposta imune ao vírus da BI.

Analogamente, GOUCH & ALEXANDER (1979) e DARBYSHIRE (1982) advertem que os títulos inibidores da hemaglutinação não são necessariamente relacionados ao nível de proteção da traquéia contra desafio.

TIMMS & BRACEWELL (1981) reforçam a opinião que títulos baixos de IH, observados na resposta primária à vacinação com vacinas vivas, não devem ser necessariamente interpretados como falta de proteção.

No entanto, outras provas, tais como o reisolamento de vírus desafio, a partir da traquéia e a observação da atividade do epitélio ciliar traqueal, talvez proporcionem melhores resultados na avaliação da resposta imune de diferentes grupos genéticos ao vírus da BI.

#### 5.1.2. Resposta imune para NC

Objetivando uma adequada imunização de pintos contra doença de NC, é essencial a observação de certos requisitos, ou seja, tipo de vacina, idade dos pintos à vacinação, intervalo entre vacinações e nível de anticorpos maternos.

A despeito da utilização, nos plantéis reprodutores, do mesmo programa básico de vacinação para a doença de NC, foram observadas diferenças significativas nos níveis de anticorpos maternos inibidores da hemaglutinação (variação de 0,75 a 3,36 - TAB. V).

Um volume considerável de trabalhos têm sido publicados mostrando que a imunidade congênita passiva pode preve-

nir ou adversamente afetar a resposta sorológica de pintos à vacinação contra a doença de NC (BENNEJEAN et alii, 1978; HOLMES, 1979; EIDSON et alii, 1982; GIAMBRONE, 1983).

Os resultados da resposta primária de anticorpos foram semelhantes entre si, com o maior título observado na linhagem E, que apresentou, aos 15 dias de idade, o menor nível de anticorpos maternos. As linhagens não apresentaram altos títulos de anticorpos, o que concorda com o princípio da neutralização de partículas virais pela imunidade passiva residual, a qual previne uma efetiva resposta vacinal. Por outro lado, UHR & MÖLLER (1968) afirmam que o efeito regulador do anticorpo na resposta imune secundária é marcadamente menos efetivo que a supressão da formação primária de anticorpos.

A linhagem B se destacou das demais por sua significativa produção de anticorpos na resposta imune secundária. Essa diferença pode ser atribuída a fatores genéticos, visto que a linhagem C possuía níveis semelhantes de anticorpos de origem materna e após a primovacinação, não respondendo à revacinação.

TIZARD (1982) afirma que se uma segunda dose de antígeno é dada a um animal ainda possuidor de anticorpos circulantes após uma resposta imune primária, então o nível desses anticorpos pode cair por alguns dias, até que a resposta imune secundária se ponha em plena marcha. Esta denominada fase negativa ocorre como resultado da ligação do antígeno injetado aos anticorpos, com posterior remoção da corrente circulatória. Os níveis baixos de anticorpos da resposta secundária, observados neste experimento, podem ser assim explicados. Adicionalmente devemos lembrar que a via de administração do antígeno não é direta e, portanto, o vírus deve, em uma primeira fase, se multiplicar ao nível do epitélio das vias respiratórias, antes de solicitar as células imunocompetentes da ave para a produção de anticorpos circulantes.

#### 5.1.3. Peso das aves

Os valores médios para os pesos corporais das aves estão de acordo com os encontrados na prática comercial.

As aves mais leves foram as da linhagem B, (TAB. XIII) que apresentou diferença significativa na resposta imune secundária ao vírus da doença de NC. Esta correlação negativa entre peso corporal e resposta imune humoral foi observada em outros experimentos (SIEGEL & GROSS, 1980; GROSS et alii, 1980; SIEGEL et alii, 1982).

Os recursos metabólicos de um organismo são distribuídos basicamente para funções tais como resposta imune, crescimento e reprodução. Embora uma alta produção de anticorpos possa ter influência negativa nas outras duas funções, isto deve ser considerado em um contexto temporal, por que vantagens a curto prazo podem ser anuladas e/ou resultar em desvantagens durante a vida produtiva (SIEGEL et alii, 1982).

## 5.2. Experimento II

O controle genético quantitativo da resposta primária de anticorpos tem sido demonstrado em aves (SIEGEL & GROSS, 1980; ZIJPP & LEENSTRA, 1980). Nesses estudos, eritrócitos de carneiro foram escolhidos como agente imunizante. Os eritrócitos de carneiro são antígenos naturais multideterminantes, que provocam uma resposta imune humoral dependente de células timo- e bursa-derivadas (WHITE & NIELSEN, 1975; ZIJPP et alii, 1983; WING, 1984). Por sua vez, a maioria dos agentes patógenos também possui estruturas antigênicas complexas. Contudo, um único parâmetro imunológico parece ser insuficiente para a caracterização da capacidade imunológica geral. É provável que, comparavelmente aos camundongos e homens, a resistência a algumas doenças aviárias seja estreitamente relacionada ao complexo B de histocompatibilidade e a resistência a outras doenças seja codificada por outros genes fora do complexo B. Portanto, um índice baseado nas respostas imunes humorais e a mediação celular, na fagocitose e em marcadores do complexo B, deverá ser estabelecido como indicador da resistência às doenças in-

fecciosas (CRITTENDEN, 1983; ZIJPP, 1983b).

Procurando verificar, em aves, diferenças genéticas na resposta de anticorpos para eritrócitos de carneiro, vários autores experimentaram diversos esquemas de imunização (WHITE & NIELSEN, 1975; GROSS, 1979; ZIJPP & LEENSTRA, 1980; ZIJPP et alii, 1982; ZIJPP, 1983a; ZIJPP et alii, 1983), onde combinaram dose, via e tempo decorrido após a inoculação para a sangria. ZIJPP et alii (1983) enfatizaram a importância do esquema de imunização no efeito fenotípico dos genes reguladores da resposta imune.

Os níveis baixos de hemaglutininas naturais, observados no dia da inoculação (valor médio de 0,45), concordam com aqueles encontrados por WHITE & NIELSEN (1975), ZIJPP & LEENSTRA (1980) e ZIJPP et alii (1982). Apesar de encontrar, igualmente, níveis baixos de hemaglutininas no dia 0, ZIJPP (1983a) verificou diferenças significativas entre as linhagens estudadas.

Com a inoculação de 1 ml de suspensão a 10% de eritrócitos de carneiro, via intramuscular e avaliação sorológica no 10º dia pós-inoculação, não foram encontradas diferenças significativas, nos níveis de anticorpos, entre as linhagens trabalhadas (TAB. XV). Entretanto, ZIJPP (1983a) trabalhando com frangos de três origens genéticas, a saber, uma linhagem de corte, uma de postura e uma de médio peso, observou diferenças significativas, até o 14º dia pós-inoculação, nos títulos de hemaglutininas, com maior valor médio no 7º dia. Considerando que as diferenças porventura existentes entre as cinco linhagens de frangos de corte fossem de pequena amplitude e, portanto, de difícil detecção, talvez com um menor intervalo entre a imunização e a sangria fosse possível evidenciá-las, ou ainda, com a utilização de uma maior dose de antígeno.



## 6. CONCLUSÕES

Nas condições em que foram realizados os experimentos, as seguintes conclusões foram obtidas:

1. O grau da resposta imune secundária à vacinação contra doença de Newcastle dependeu da origem genética das aves, tendo a linhagem Pilch apresentado o maior nível de anticorpos inibidores da hemaglutinação.

2. Correlação negativa entre peso corporal e produção de anticorpos inibidores da hemaglutinação para o vírus da doença de Newcastle foi observada na linhagem Pilch, que apresentou o menor peso corporal aos 49 dias de idade.

3. Não foi observada influência de linhagem na produção de anticorpos inibidores da hemaglutinação para o vírus da Bronquite Infecciosa e, tampouco, na produção de anticorpos hemaglutinantes frente a eritrócitos de carneiro, nos diferentes grupos genéticos estudados.

4. São necessários maiores estudos de avaliação das respostas imunes em aves de diferentes origens genéticas, frente a antígenos diversos, bem como suas correlações com características produtivas.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ALEXANDER, D.J.; ALLAN, W.H.; BIGGS, P.M.; BRACEWEL, C. D.; DARBYSHIRE, J.H.; DAWSON, P.S.; HARRIS, A.H.; JORDAN, F. T.W.; MACPHERSON, I.; McFERRAN, J.B.; RANDALL, C. J. ; STUART, J.C.; SWARBRICK, O.; WILDING, G.P. A standard technique for haemagglutination inhibition tests for antibodies to avian infectious bronchitis virus. Vet. Rec., London, 113(3):64, 1983.
2. ALLAN, W.H.; LANCASTER, J.E.; TÓTH, B. Newcastle disease vaccines; their production and use. Rome, Food and Agriculture Organization of the United Nations, 1978. 163p.
3. ANDRADE, L.F.; VILLEGAS, P.; FLETCHER, O.J. Vaccination of day-old broilers against infectious bronchitis: effect of vaccine strain and route of administration. Avian Dis., College Station, 27(1):178-87, 1983.
4. BEARD, C.W.; HOPKINS, S.R.; HAMMOND, J. Preparation of Newcastle disease virus hemagglutination-inhibition test antigen. Avian Dis., College Station, 19(4):692-9, 1975.
5. BENNEJEAN, G.; GUITTET, M.; PICAULT, J.P.; BOUQUET, J. F.; DEVAUX, B.; GAUDRY, D.; MOREAU, Y. Vaccination of one day-old chicks against Newcastle disease using inactivated oil adjuvant vaccine and/or live vaccine. Avian Pathol., Houghton, 7(1):15-27, 1978.

6. BIGGS, P.M. Disease prevention and control in poultry production. In: DISEASE PREVENTION AND CONTROL IN POULTRY PRODUCTION, Sydney, 1983. Proceedings. Sydney, Post-Graduate Committee in Veterinary Science, University of Sydney, 1983. p.313-9.
7. COLE, R.K. & HUTT, F.B. Genetic differences in resistance to Newcastle disease. Avian Dis., College Station, 5 (2):205-14, 1961.
8. CRITTENDEN, L.B. Recent advances in the genetics of disease resistance. Avian Pathol., Houghton, 12(1):1-8, 1983.
9. DARBYSHIRE, J.H. Immunity to avian infectious bronchitis. In: POWELL, P.C. ed. Avian Immunology, Linton, British Veterinary Poultry Association, 1982. p.68-72 (Proceedings).
10. DAVELAAR, F.G. & KOUWENHOVEN, B. Influence of maternal antibodies on vaccination of chick of different ages against infectious bronchitis. Avian Pathol., Houghton, 6(1): 41-50, 1977.
11. EIDSON, C.S.; THAYER, S.G.; VILLEGAS, P.; KLEVEN, S.H. Vaccination of broiler chicks from breeder flocks immunized with a live or inactivated oil emulsion Newcastle disease vaccine. Poult. Sci., Champaign, 61(8):1621-9, 1982.
12. FALLAH-MOGHADDAM, H.; GYLES, N.R.; PATTERSON, L.T.; SKEELES, J.K.; WHITFILL, C.E. Genetic aspects of antibody titer responses in chickens to different classes of antigens. Poult. Sci., Champaign, 63(Suppl. 1):98, 1984.
13. GAVORA, J.S. & SPENCER, J.L. Breeding for genetic resistance to disease: specific or general? World's Poult. Sci. J., Cambridge, 34(3):137-48, 1978.
14. GELB, J. Jr. & KILLIAN, S.L. Serodiagnosis of infectious bronchitis using the HI tes. In: NINETEENTH NATIONAL MEETING ON POULTRY HEALTH AND CONDEMNATIONS, Ocean City, 1984. Proceedings. Ocean City, 1984. p.26-31.

15. GIAMBRONE, J.J. Evaluating Newcastle disease vaccination plans for broilers. Poult. Dig., Mt. Morris, 40(496):280, 282-3, 1983.
16. GOMES, F.P. Curso de Estatística Experimental. 6. ed. Piracicaba, Nobel, 1976. 430p.
17. GORDON, C.D.; BEARD, C.W.; HOPKINS, S.R.; SIEGEL, H. S. Chick mortality as a criterion for selection toward resistance or susceptibility to Newcastle disease. Poult. Sci., Champaign, 50(3):783-9, 1971.
18. GOUGH, R.E. & ALEXANDER, D.J. Comparison of duration of immunity in chickens infected with a live infectious bronchitis vaccine. Res. Vet. Sci., London, 26(3):329-32, 1979.
19. GROSS, W.B. Comparison of dose effect of sheep red cells on antibody response in two lines of chickens. Avian Dis., College Station, 23(2):526-8, 1979.
20. GROSS, W.G.; SIEGEL, P.B.; HALL, R.W.; DOMERMUTH, C. H.; DuBOISE, R.T. Production and persistence of antibodies in chickens to sheep erythrocytes. 2. Resistance to infectious diseases. Poult. Sci., Champaign, 59(2):205-10, 1980.
21. HELLER, D.; SOLLER, M.; PELEG, B. A.; RON-KUPER, N.; HORNSTEIN, K. Immune response to Newcastle disease virus vaccine, fowl-pox vaccine and *Escherichia coli* vaccine in bedouin and White Leghorn chickens. Poult. Sci., Champaign, 60(1):34-7, 1981.
22. HOLMES, H.C. Resistance of the respiratory tract of the chicken to Newcastle disease infection following vaccination: the effect of passively acquired antibody on its development. J. Comp. Pathol., New York, 89(1):11-19, 1979.
23. KING, D.J. IBV Hemagglutination (HA) antigen preparation. Athens, U.S. Department of Agriculture, Agricultural Research Service, Southeast Poultry Research Laboratory,

- [1982a]. 2p. (Mimeografado).
24. KING, D.J. IBV Hemagglutination inhibition test procedure. Athens, U.S. Department of Agriculture, Agricultural Research Service, Southeast Poultry Research Laboratory, [1982b]. 2p. (Mimeografado).
  25. KUPER-RON, N. & PELEG, B.A. Natural haemagglutinins and immune responsiveness in young chicks. Avian Pathol., Houghton, 12(1):17-22, 1983.
  26. PELEG, B.A.; SOLLER, M.; RON, N.; HORNSTEIN, K.; BRODY, T.; KALMAR, E. Familial differences in antibody response of broiler chickens to vaccination with attenuated and inactivated Newcastle disease virus vaccine. Avian Dis., College Station, 20(4):661-8, 1976.
  27. SIEGEL, P.B. & GROSS, W.B. Production and persistence of antibodies in chickens to sheep erythrocytes. 1. Directional selection. Poult. Sci., Champaign, 59(1): 1-5 , 1980.
  28. SIEGEL, P.B.; GROSS, W.B.; CHERRY, J.A. Correlated responses of chickens to selection for production of antibodies to sheep erythrocytes. Anim. Blood Groups and Biochem. Genet., Wageningen, 13(4):291-7, 1982.
  29. SNEDECOR, G.W. & COCHRAN, W.G. Statistical methods. 6.ed. Ames, Iowa State University Press, 1967. 593p.
  30. SOLLER, M.; HELLER, D.; PELEG, B.; RON-KUPER, N.; HORNSTEIN, K. Genetic and phenotypic correlations between immune response to *Escherichia coli* and to Newcastle disease virus vaccines. Poult. Sci., Champaign, 60(1):49-53, 1981.
  31. TAKAHASHI, S.; INOOKA, S.; MIZUMA, Y. Selective breeding for high and low antibody responses to inactivated Newcastle disease virus in japanese quails. Poult. Sci., Champaign, 63(4):595-9, 1984.
  32. TIMMS, L.M. & BRACEWELL, C.D. Cell mediated and humoral

- immune response of chickens to live infectious bronchitis vaccines. Res. Vet. Sci., London, 31(2):182-9, 1981.
33. TIZARD, I. An introduction to veterinary immunology. 2. ed. Philadelphia, W.B. Saunders, 1982. 363p.
  34. UHR, J.W. & MÖLLER, G. Regulatory effect of antibody on the immune response. Adv. Immunol., New York, 8:81-127, 1968.
  35. WHITE, R.G. & NIELSEN, K.H. Interactions between the immunological responses of a thymus-independent antigen (Salmonella adelaide O antigen) with a thymus-dependent antigen (sheep erythrocytes). Immunology, Oxford, 28(5) : 959-72, 1975.
  36. WING, T.L. Influence of genetics on immunocompetence. In: NEW HAMPSHIRE POULTRY HEALTH CONFERENCE, Durham, 1984. Proceedings. Durham, Cooperative Extension Service, University of New Hampshire, 1984. p.30-3.
  37. ZIJPP, A.J. The effect of genetic origin, source of antigen, and dose of antigen on the immune response of cockerels. Poult. Sci., Champaign, 62(2):205-11, 1983a.
  38. ZIJPP, A.J. Breeding for immune responsiveness and disease resistance. World's Poult. Sci. J., Cambridge, 39(2):118-31, 1983b.
  39. ZIJPP, A.J. Genetic aspects of disease resistance. Poultry, Doctinchem, 12-5, jan. 1985.
  40. ZIJPP; A.J.; FRANKENA, K.; BONESCHANSCHER, J.; NIEUWLAND, M.G.B. Genetic analysis of primary and secondary immune responses in the chicken. Poult. Sci. Champaign, 62(4) : 565-72, 1983.
  41. ZIJPP, A.J. & LEENSTRA, F.R. Genetic analysis of the humoral immune response of White Leghorn chicks. Poult. Sci., Champaign, 59(7):1363-9, 1980.
  42. ZIJPP, A.J.; ROOYAKKERS, J.M.; KOUWENHOVEN, B. The immune

response of the chick following viral vaccinations and immunization with sheep red blood cells. Avian Dis. College Station, 26(1):97-106, 1982.