

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
CONSELHO DE PÓS-GRADUAÇÃO
ESCOLA DE VETERINÁRIA



PREPARO DE VACINA OLEOSA EXPERIMENTAL CONTRA BRONQUITE
INFECCIOSA DAS GALINHAS (BIG) E AVALIAÇÃO EM AVES GNOTO
BIÓTICAS (GN) E EM AVES LIVRES DE PATÓGENOS (SPF).

DORILÉIA OLIVEIRA RESENDE

U.F.M.G. - BIBLIOTECA UNIVERSITÁRIA



152518601 0000

NÃO DANIFIQUE ESTA ETIQUETA

22/03/07

BELO HORIZONTE
MINAS GERAIS
1985

DORILÉIA OLIVEIRA RESENDE

7636.089 69
R. 433 p
1985



PREPARO DE VACINA OLEOSA EXPERIMENTAL CONTRA BRONquite
INFECCIOSA DAS GALINHAS E AVALIAÇÃO EM AVES GNOTOBIÓTI
CAS (GN) E EM AVES LIVRES DE PATÓGENOS (SPF).

Tese apresentada à Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para a obtenção do Grau de Mestre em Medicina Veterinária. Área - Medicina Veterinária Preventiva.

Belo Horizonte
Minas Gerais
1985



M6000185493

RESENDE, Doriléia Oliveira, 1985-

R 433 p

Preparo de vacina oleosa experimental contra bronquite infecciosa das galinhas (BIG) e avaliação em aves gnotobióticas (GN) e em aves livres de patógenos (SPF). Belo Horizonte, Escola de Veterinária da UFMG, 1985.

92p. ilust.

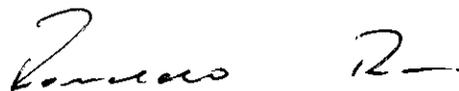
Tese, Mestre em Medicina Veterinária.

1. Virologia aplicada. 2. Vacina oleosa antivírica - preparo e avaliação. 3. Bronquite infecciosa. I. Título

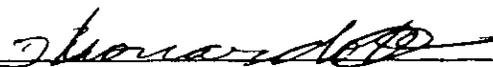
CDD 636.508 960 19

Ao meu esposo Maurício e minha
filha Fabíola, pelo carinho, a
poio e compreensão.
A meus pais, pelo exemplo e es
tímulo.

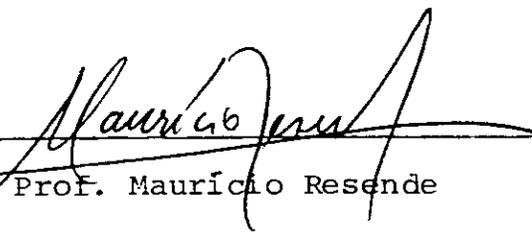
Aprovada em: 03 de outubro de 1985.



Prof. Ronaldo Reis - Orientador



Prof. Regino Leonardo de Oliveira



Prof. Maurício Resende

AGRADECIMENTOS

A realização desta tese não teria sido possível sem a decisiva colaboração dos Departamentos de Microbiologia e de Bioquímica do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG. A autora agradece a oportunidade concedida pelo Ministério da Agricultura e registra o seu profundo reconhecimento às seguintes pessoas:

- | | |
|--|--|
| RONALDO REIS | - Prof. Titular do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva da UFMG, Orientador. |
| MAURÍCIO RESENDE | - Prof. Titular do Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, Co-Orientador. |
| ENIO CARDILLO VIEIRA | - Prof. Titular do Departamento de Bioquímica do Instituto de Ciências Biológicas - UFMG. |
| TASSO MORAES E SANTOS
JACQUES ROBERT NICOLI | - Profs. do Departamento de Bioquímica do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG. |

- REGINO LEONARDO DE OLIVEIRA - Prof. Adjunto do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva da Escola de Veterinária da UFMG.
- RABINDRANATH LOYOLA CONTRERAS - Prof. Assistente do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva da Escola de Veterinária da UFMG.
- MARIA AUXILIADORA ROQUE DE CARVALHO - Prof. Adjunto do Departamento de Microbiologia do ICB - UFMG.
- IVAN BARBOSA MACHADO SAMPAIO - Coordenador do Curso de Pós-Graduação da Escola de Veterinária da UFMG.
- EDUARDO OSÓRIO CISALPINO - Coordenador do Curso de Pós-Graduação do Departamento de Microbiologia do ICB-UFMG.
- ROBERTO ALTAVILLA E
MARÍLIA NADIR DOS SANTOS - Funcionários do Departamento de Microbiologia do ICB-UFMG.

FRANCISCO ABÍLIO DO NASCIMENTO - Funcionários do Departa -
ROMILDA MARIA NASCIMENTO E mento de Bioquímica do
MARCELO EUSTÁQUIO DA SILVA ICB-UFMG.

JÚLIO CÉSAR DE ANDRADE FRANCO - Médico Veterinário, res -
ponsável Técnico do Labo -
ratório HERTAPE.

Este trabalho contou com o apoio financeiro
do Conselho de Pesquisa da UFMG (Projeto nº664 (9/82)-EV).

INDICE

	PÁGINA
INTRODUÇÃO -----	1
REVISÃO DE LITERATURA -----	6
MATERIAIS E MÉTODOS -----	21
RESULTADOS -----	44
DISCUSSÃO -----	61
CONCLUSÕES -----	72
RESUMO -----	75
SUMMARY -----	78
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS -----	81

ANEXOS

TABELAS	PÁGINA	
I	Índices de Neutralização (IN) encontrados em aves GN e SPF vacinadas e não vacinadas -----	52
II	Isolamento de vírus das aves GN e SPF, vacinadas e não vacinadas, desafiadas com amostra 208 de vírus da BIG -----	53
III	Presença de Lesões Macroscópicas em aves GN e SPF, vacinadas e não vacinadas, desafiadas com amostra 208 de vírus da BIG --	54
FIGURAS		
1	Aves GN criadas em isoladores apropriados	55
2	Aves GN criadas em isoladores apropriados	56
3	Granuloma difuso, no ponto de inoculação, aos 45 dias após a vacinação-----	57
4	Vacina oleosa contra BIG aos 90 dias após o preparo; à esquerda, tubo mantido a 4°C; à direita, tubo mantido em estufa a 37°C-	58

- 5 Vacina oleosa contra BIG aos 180 dias apōs
o preparo: ā esquerda, tubo mantido a 4⁰C;
ā direita, tubo mantido em estufa a 37⁰C-- 59

- 6 Lesāo tīpica de nanismo e enrolamento en -
contrado no isolamento de vīrus das aves
GN e SPF nāo vacinadas ----- 60

1.-INTRODUÇÃO

A Bronquite Infecciosa das Galinhas (BIG) é uma doença respiratória de caráter agudo, altamente contagiosa, de importância econômica para a indústria avícola, principalmente em plantéis de galinhas poedeiras, onde o prejuízo maior é a queda na produção de ovos e a má qualidade dos mesmos, além de uma redução da eclodibilidade (SEVOIAN & LEVINE, 1957).

As perdas econômicas decorrem, ainda, da mortalidade de aves jovens (HOFSTAD, 1978), redução do consumo de ração e ganho de peso (PRINCE et alii, 1962) e a "síndrome nefrite - nefrose" em frangos de corte e aves adultas (WINTERFIELD & HITCHNER, 1962; CUMMING, 1963; JONES, 1974; SILVA et alii, 1979).

Em aves jovens, as lesões são mais expressivas no trato respiratório (DELAPLANE & STUART, 1939), enquanto que as aves adultas tendem a apresentar sintomas respiratórios discretos; no entanto, os níveis de produção de ovos, embora elevando-se após o surto, não chegam a atingir os níveis normais (BROADFOOT & SMITH, 1954).

Os sorotipos descritos, até hoje, são em número de dez (JOHNSON & MARQUARDT, 1975), os quais não oferecem imunidade cruzada satisfatória. O sorotipo Massachussets é considerado como sendo o que confere melhor proteção contra os outros sorotipos (HOFSTAD, 1975).

No Brasil, o isolamento do vírus da BIG foi realizado por HIPÓLITO (1957). A partir daquela data, outros trabalhos foram efetuados no sentido de se estabelecer a prevalência da bronquite infecciosa em nosso país (HIPÓLITO et alii, 1960/61; HIPÓLITO & GODOY, 1963; HIPÓLITO et alii, 1973).

Levantamento sorológico utilizando-se aves de granjas distribuídas por todo o Estado de Minas Gerais evidenciou uma prevalência de 100% de anticorpos contra o vírus da BIG, não tendo sido, entretanto, observados sintomas clínicos indicativos da doença (HEREDIA et alii, 1978).

Em granjas do Estado de São Paulo, uma alta prevalência de anticorpos anti-vírus da BIG foi constatada (HSIUNG et alii, 1978). Estudos sobre aspectos clínicos e anátomo-patológicos da "síndrome nefrite-nefrose" foram descritos (HIPÓLITO et alii, 1973; SILVA et alii, 1979).

Mais recentemente, foi realizado um trabalho de patogenia comparada de duas amostras de vírus da BIG isoladas de campo (RESENDE, 1983).

Embora a vacinação contra a BIG tenha sido oficialmente liberada (BRASIL, 1977), não houve, ainda, qualquer levantamento dos sorotipos existentes no Brasil, estudo da patogenia, virulência, características antigênicas e prevalência de sub-tipos do vírus.

As vacinas, usadas no país, foram produzidas, inicialmente, a partir de vírus vivo, utilizando-se a amostra importada "HOLLAND" H-120 (BRASIL, 1977/1980). As vacinas contendo vírus vivo conferem boa proteção inicial contra a infecção, entretanto, o título e a duração dos anticorpos produzidos dependem do grau de atenuação da amostra vacinal e da idade das aves (HITCHNER et alii, 1964; WINTERFIELD, 1967/68; GOUGH & ALEXANDER, 1979) e, além disso, acarretam consequências indesejáveis, tais como: disseminação do vírus a plantéis susceptíveis da área; reação vacinal que pode fun-cionar como fator de "stress" predispondo as aves a outras infecções, especialmente infecções respiratórias; queda na produção de ovos e, ainda, possível contaminação com outros agentes patógenos (CHRISTIAN & MACK, 1957; BERRY, 1965; MC MARTIN, 1968; MCDUGALL, 1969; HROTMATKA & RAGGI, 1970) veiculados acidentalmente na vacina.

Atualmente, os laboratórios de produtos de uso veterinário estão ampliando suas linhas de produção, apresentando

as vacinas aviárias, também, sob forma de emulsão oleosa. As vacinas oleosas para uso em medicina veterinária têm se mostrado eficazes quanto à proteção esperada e se constituem num campo promissor para o desenvolvimento de técnicas mais aprimoradas para o combate a diversas enfermidades animais (RIVENSON, 1979).

O uso de adjuvantes em emulsão do tipo água-em-óleo, como potenciadores da resposta imunitária a inúmeros antígenos, tem sido estudado há várias décadas (FREUND et alii, 1948; TALMAGE & DIXON, 1953; MCKINNEY & DAVENPORT, 1961; HERBERT, 1966/68) e representam uma esperança no sentido de promoverem o aparecimento de uma imunidade de longa duração (HILLEMANN, 1967). Tais adjuvantes parecem atuar das seguintes maneiras: a) no local da inoculação se forma um depósito que libera lentamente o antígeno emulsionado; b) a emulsão serve para transportar o antígeno a múltiplos focos de todo o sistema linfático; c) formam-se reações granulomatosas no ponto de inoculação em pontos focais de todo o organismo, que consistem de emulsão oleosa circundada por células mononucleares (macrófagos, linfócitos e células plasmáticas) muito eficazes na síntese de anticorpos. O papel dos macrófagos tem muita importância, uma vez que eles ingerem as emulsões oleosas, tanto no local da injeção como no sistema reticuloendotelial da zona afetada, e a cinética da endocitose e a digestão da emulsão são decisivas para o resultado do processo de imunização e para qualquer manifestação tóxica que possa ocorrer (OMS, 1976). A atividade dos macrófagos, nas aves, não

foi ainda adequadamente estudada, mas os dados disponíveis indicam que, em geral, as funções acessórias e efetoras são as mesmas dos macrófagos de mamíferos (SHARMA & TIZARD, 1984);d) o efeito adjuvante é verificado em, pelo menos, duas subpopulações de células T. A atividade das células T pré-citotóxicas é diminuída através de células supressoras, enquanto que a função das células T envolvidas com o estímulo da produção de células B é aumentada (REINISCH et alii, 1976).

Na situação atual da indústria avícola brasileira, o uso de vacinas oleosas está cada vez mais difundido, em virtude da facilidade de se poder administrar, em aves matrizes e em aves comerciais para postura, uma única dose no início da postura, evitando, assim, grandes perdas econômicas.

O presente trabalho visou como objetivos:

a) produção de uma vacina inativada oleosa experimental contra BIG, a partir da amostra Massachusetts-41, que apresentasse características físicas ideais de estabilidade e viscosidade, e cuja técnica fosse de fácil preparo;

b) observar a resposta imunitária e a proteção contra as manifestações clínicas e patológicas, conferidas pela vacina, em aves gnotobióticas (GN) e em aves livres de agentes patógenos (SPF), frente ao desafio com uma amostra de campo local.



2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. - Uso de adjuvantes oleosos

FREUND et alii (1948) estudaram os efeitos adjuvantes de várias substâncias, utilizando como antígeno uma vacina contendo S. typhi, inativada com formalina. Como emulsificadores foram empregados: Falba, lanolina, Arlacel A, Tween 80, lecitina e cera de abelhas, além de combinações de miricina mais colesterol e miricina mais ácido oleico. Para a fase oleosa da emulsão foram usados óleo de parafina ou óleo de amendoim. Preparações contendo a vacina, com ou sem adjuvantes, foram inoculadas profundamente no tecido subcutâneo

de coelhos em ambos os lados da região escapular. A produção de anticorpos aglutinantes contra S. typhi foi aumentada quando os autores incorporaram o antígeno à emulsão água-em-óleo preparada com óleo de parafina com os emulsificadores Falba, lanolina ou Arlacel A ou, ainda, miricina combinada a colesterol. A adição de micobactérias mortas (M. butyricum, M. tuberculosis ou M. phlei) às diferentes emulsões testadas aumentou o nível de anticorpos de modo significativo.

BERLIN (1960) trabalhando com várias formulações de vacinas emulsificadas contendo vírus de influenza do tipo A, amostra PR 8, inativado com formalina a 1:1000, procurou estabelecer as relações existentes entre as propriedades físicas das vacinas oleosas e o efeito adjuvante na produção de anticorpos. As emulsões preparadas foram inoculadas em camundongos albinos de 20 a 30g, no tecido subcutâneo da região dorsal. Os títulos de anticorpos foram medidos pelo teste de inibição da aglutinação com antígeno homólogo. As propriedades físicas das vacinas foram testadas quanto ao tipo de emulsão, viscosidade e estabilidade. O autor concluiu que a relação entre a viscosidade e o efeito adjuvante é inversa, ou seja, quanto mais alta a viscosidade mais reduzido é o efeito adjuvante. Já a relação entre a estabilidade da emulsão e o efeito adjuvante pareceu ser mais complexa. A instabilidade das emulsões preparadas foi verificada através do aspecto cremoso das mesmas, bem como, coalescência de gotas e separação total das fases líquida e oleosa. Neste experi -

mento, o tempo de estocagem decorrido antes da completa separação das fases a 37°C foi usado como medida de estabilidade.

HERBERT (1968) inoculando camundongos, por via sub-cutânea, com dose única de ovalbumina altamente purificada e em emulsão do tipo água-em-óleo, obteve títulos de anticorpos 500 vezes maiores que os estimulados pela mesma dose sem adjuvante, e que permaneceram em níveis altos por pelo menos um ano. Nem o óleo, nem o emulsificante, nem a emulsão por si própria, quando injetados em pontos diferentes daquele do antígeno, estimularam uma resposta desse tipo. A resposta não foi afetada por inoculação sub-cutânea simultânea de anti-ovalbumina, ou por inoculação posterior de um antígeno diferente em emulsão água-em-óleo ou ovalbumina em salina. Foi detectada ovalbumina em emulsão retirada de camundongos 544 dias após a inoculação e sua vida média dentro da emulsão foi verificada ser de aproximadamente 90 dias. As observações indicaram que este tipo de adjuvante pode exercer seu efeito unicamente pela liberação gradativa de mínimas quantidades de antígeno durante um longo período de tempo.

A Organização Mundial de Saúde (1976), através de um grupo científico internacional, apresentou uma revisão sobre adjuvantes imunológicos para uso humano e para animais de laboratório enfocando os aspectos de seu emprego na imunoterapia de tumores, suas ações sobre as células do sistema reticuloendotelial, seus efeitos sobre as diferentes classes de anticorpos, bem como ativação de macrófagos e, ainda, su

gerindo futuras investigações no que concerne a emulsões do tipo água-em-óleo, quais sejam: 1) eliminar ou inativar as lipases do antígeno, que hidrolisam as emulsões acarretando liberação de ácidos graxos, que provocam reações locais indesejáveis; 2) pesquisar outros óleos minerais, emulsificantes e estabilizantes biodegradáveis cujos produtos de decomposição não provoquem reações inflamatórias excessivas. Os adjuvantes citados compreendem os de depósito (hidróxido de alumínio e emulsões oleosas), corineformes anaeróbias, bacilo de Calmette-Guérin e Bordetella pertussis.

2.2. - Vacinas oleosas contra Doença de Newcastle e contra Bronquite Infecciosa das Galinhas

LEVY & ZAKAY-RONES (1973) descreveram um método de preparação de vacina contra a Doença de Newcastle, inativada com betapropiolactona a 0.2% e incorporada a uma mistura de adjuvante incompleto de Freund (1 parte de Arlacel A + 9 partes de Bayol F) contendo 2% de Tween 80. Aves de 4 a 7 semanas de idade foram inoculadas por via IM ou subcutânea e níveis de anticorpos inibidores da hemaglutinação persistiram por longo período. A imunidade conferida protegeu contra o desafio com 2×10^5 DIE₅₀ de uma amostra virulenta de vírus da Doença de Newcastle administrada intramuscularmente ou por contato.

CESSI & NARDELLI (1974) testaram uma vacina oleosa contra Doença de Newcastle em aves com 21 dias de idade: um grupo sem anticorpos maternos e outro grupo originado de um plantel imunizado. O vírus foi inativado com betapropiolactona a 1:1000 por 2 horas a 37°C. Após o teste de inocuidade em ovos embrionados, uma parte do vírus inativado foi homogeneizado com três partes de uma mistura de adjuvante incompleto de Freund (1 parte de Arlacel 80 + 9 partes de Marcol 52). A vacina final, armazenada em refrigerador (de 4°C a 8°C) ou à temperatura ambiente (20°C), reteve sua potência por pelo menos um ano. Os níveis de anticorpos das aves inoculadas na terceira semana de idade subiram rapidamente até atingir o pico na quarta semana após a vacinação, declinando depois, mas mantendo níveis satisfatórios até a vigésima semana. Com a revacinação nesta época subiram novamente os níveis de anticorpos, que permaneceram elevados até a 63a. semana de vida. Quanto à influência dos anticorpos maternos, em aves com altos níveis de anticorpos passivos até três semanas de idade, os experimentos mostraram a existência de interferência, inversamente proporcional à idade das aves e praticamente ausente após a terceira semana de vida.

GOUGH et alii (1977) avaliaram a resposta imunitária a vacinas inativadas oleosas mono e bivalentes contra Doença de Newcastle e Bronquite Infecciosa. Ambos os vírus foram inativados com betapropiolactona a 0,05% a 37°C durante 90 minutos e concentrados por centrifugação a 30.000g du

rante 30 minutos. Como adjuvantes foram utilizados o incompleto de Freund e o BRL 5907 (RNA fita dupla isolado de um micófito). Usando essas mesmas vacinas como reforço secundário às 13 semanas de idade foi produzida uma resposta acentuada de anticorpos por até dez semanas, quando houve grande resistência ao desafio com vírus da BIC no grupo de aves vacinadas com vacina bivalente. Essa resposta secundária foi mais significativa quando precedida de uma vacinação primária com vacina bivalente viva, que por si só não estimulou uma boa resposta de anticorpos. A revacinação com vacina bivalente inativada contendo o adjuvante BRL 5907 produziu uma resposta secundária melhor que no grupo que recebeu somente vacina bivalente. Quando as vacinas mono e bivalentes inativadas foram usadas na primeira vacinação a resposta de anticorpos não foi boa. Entretanto, a revacinação com a mesma vacina bivalente inativada melhorou significativamente a resposta.

STONE et alii (1978) estudaram a influência da composição de emulsões do tipo água-em-óleo em suas características físicas. Foram preparadas diversas vacinas experimentais tendo em suas fases aquosas os vírus da Doença de Newcastle (La Sota), Influenza aviária (A/turkey/Wisconsin/68) e da Bronquite Infecciosa (Massachusetts), concentrados 25 vezes, respectivamente. Outra vacina foi preparada com uma suspensão a 5% de M. gallisepticum. Na fase oleosa foi utilizado o óleo mineral Drakeol 6 VR e os emulsificadores Arlacel

A, Arlacel 80, usados isoladamente ou em combinação com Tween 80, emulsificante da fase aquosa. A proporção das fases líquida e oleosa que garantiu melhores características físicas de estabilidade e viscosidade foi de 1:4, respectivamente, à qual foi acrescentado 4% de Tween 80. As emulsões contendo Tween 80 na fase líquida e Arlacel A ou Arlacel 80 na fase oleosa apresentaram viscosidade mais baixa que emulsões contendo apenas um emulsificante da fase oleosa. As vacinas preparadas com emulsificantes nas duas fases permaneceram estáveis por mais de doze semanas a 37°C e induziram uma boa resposta de anticorpos em aves SPF vacinadas entre 4 e 8 semanas de idade com 0,5 ml, na região dorso-anterior do pescoço.

BOX et alii (1980) prepararam vacinas experimentais oleosas mono e bivalentes contra Doença de Newcastle e contra Bronquite Infecciosa e as testaram em três grupos diferentes de 50 aves comerciais de postura que serviram como controles. As 150 aves comerciais obedeceram ao esquema normal de vacinações contra Doença de Newcastle, vacina viva no 1º dia de vida, na 4a. semana contra Doença de Newcastle e Bronquite Infecciosa, contra Bronquite na oitava semana e contra encefalomielite às 13 semanas. O 1º grupo foi vacinado às 16 semanas com 0,5ml de vacina oleosa contra BIG monovalente por via intramuscular. O 2º grupo recebeu 0,5ml por via intramuscular, de vacina bivalente oleosa contra Doença de Newcastle e BIG. O terceiro grupo não foi vacinado às 16 semanas e o grupo de 10 aves SPF não recebeu qualquer esquema de vacinação prévio e também não foi vacinado às 16 sema

nas. Às 31 semanas de vida e no pico da produção de ovos, todas as aves foram desafiadas com $10^{6,0}$ DIE/ml de uma amostra virulenta de vírus da BIG, do tipo Massachussets, sob a forma de aerossóis. As aves que não receberam vacina oleosa, mono ou bivalente, às 16 semanas, mostraram acentuado declínio na produção de ovos mesmo tendo recebido duas doses anteriores de vacina viva atenuada contra BIG. Em contraste, as aves imunizadas no início da produção com vacina monovalente oleosa contra BIG ou combinada com vacina contra Doença de Newcastle não apresentaram queda alguma na produção de ovos após o mesmo desafio. As aves SPF quando desafiadas pararam quase que completamente a postura. Em aves revacinadas com vacina oleosa, os níveis de anticorpos inibidores da hemaglutinação contra o vírus da BIG mostraram uma elevação de menos de $5 \log_2$ na época da vacinação para mais de $10 \log_2$ quatro semanas após.

STONE et alii (1980) avaliaram a eficiência de três vacinas oleosas comerciais contra a Doença de Newcastle, vendidas na Europa, e uma vacina americana inativada contendo hidróxido de alumínio ($Al(OH)_3$). O teste foi realizado pela primovacinação em frangos de corte suscetíveis e pela vacinação secundária de poedeiras comerciais previamente imunizadas com vacina viva. A avaliação foi baseada na resposta de anticorpos inibidores da hemaglutinação e proteção contra o desafio com vírus neurotrópico ou velogênico viscerotrópico da Doença de Newcastle. As vacinas oleosas induziram títulos mais elevados e constantes. Com uma exceção, todas as aves vacinadas

com vacinas oleosas e desafiadas foram protegidas contra a doença clínica, queda na produção de ovos e diminuição da qualidade dos ovos. A vacinação não preveniu a infecção com os vírus de desafio.

STONE et alii (1981) compararam três vacinas oleosas experimentais contra Doença de Newcastle para determinar se a imunogenicidade é influenciada por diferenças na composição da emulsão. As vacinas usadas foram formuladas diferentemente, mas a quantidade de antígeno (amostra La Sota) inativado foi a mesma. As aves utilizadas receberam vacina viva contra a Doença de Newcastle na segunda e sexta semanas de vida e foram divididas em quatro grupos de 18 ou 19 aves cada. Três grupos foram revacinados às 22 semanas de vida com 0,5 ml, por via subcutânea, de uma das três vacinas oleosas. O quarto grupo não foi revacinado. Vinte e oito semanas após a revacinação, metade das aves de cada grupo foi exposta, via conjuntiva, ao desafio com $10^{7,0}$ DL₅₀ da amostra viscerotrópica velogênica Fontana 1083, isolada no surto de Newcastle em 1971, na Califórnia. A outra metade das aves foi desafiada 44 semanas após a revacinação com $10^{8,0}$ DL₅₀ da amostra viscerotrópica velogênica Largo, isolada de aves importadas da Flórida, considerada mais virulenta que a Fontana 1083. As aves controles também foram desafiadas. Os critérios de avaliação foram morbidade, mortalidade e isolamento de vírus 3 a 7 dias após o desafio. As respostas sorológicas foram verificadas através dos títulos de HI. De 56 aves vacinadas, 55

permaneceram clinicamente normais frente à exposição dos vírus viscerotrópicos velogênicos 28 a 44 semanas após a vacinação; quatro das 21 aves controles e todas as aves não vacinadas foram clinicamente afetadas ou morreram.

STONE et alii (1983) estudaram a influência da formulação na eficiência de vacinas oleosas experimentais contra a Doença de Newcastle. Diferentes emulsificantes, diferentes proporções entre as fases líquida e oleosa e diferentes concentrações de antígeno foram comparados através da imunização de aves com quatro semanas de idade. As vacinas contendo emulsificantes da fase líquida (Tween 80) e da fase oleosa (Arlacel 80) induziram a formação de anticorpos inibidores da hemaglutinação com títulos mais altos do que vacinas com apenas o emulsificante da fase oleosa. As vacinas contendo ambos os emulsificantes foram também mais estáveis a 37°C e menos viscosas. Vacinas contendo diferentes proporções das fases líquida e oleosa e diferentes quantidades de antígeno (1,2% a 50% do volume da vacina) induziram proteção similar contra o desafio.

BRUGH et alii (1983) compararam a imunogenicidade de vacinas contra a Doença de Newcastle preparadas com diferentes adjuvantes em emulsão. O antígeno foi preparado a partir da amostra La Sota. Na composição das vacinas entrou antígeno mais óleo mineral (Drakeol 6VR) acrescido dos emulsificantes Tween 80 e Arlacel 80 ou, então, antígeno mais lípides metabolizáveis como óleo de amendoim, glicerina ou lecitina de soja. A emulsificação se fez manual ou mecanicamente. As va

cinas emulsionadas mecanicamente foram preparadas três a quatro dias antes da inoculação e estocadas a 4°C. Quando emulsificadas manualmente, o preparo deu-se no momento da inoculação. No total foram preparadas doze vacinas. Aves SPF de 4 semanas de idade foram inoculadas subcutaneamente na região do pescoço com 0,5ml. Cada uma das doze vacinas foi testada num grupo de onze ou doze aves e dois grupos de doze aves foram mantidos como controles. Aves vacinadas e não vacinadas foram desafiadas quatro a oito semanas após a vacinação, via conjuntiva, com amostras viscerotrópicas velogênicas Largo ou Fontana, respectivamente. Os critérios de avaliação foram morbidade, mortalidade e isolamento de vírus sete dias após o desafio. As respostas sorológicas das aves inoculadas com vacinas contendo óleo mineral foram 10 a 100 vezes mais altas que as das aves inoculadas com vacinas preparadas com lípidos metabolizáveis (LM). Uma entre as 106 aves que receberam vacinas oleosas, 12 entre as 24 aves vacinadas com LM e todas as 24 aves controles apresentaram a doença clínica e morreram após o desafio. Cinco vacinas oleosas emulsificadas manualmente apresentaram atividade adjuvante similar a 4 vacinas oleosas emulsionadas por homogeneização convencional.

2.3. Aspectos clínicos e anátomo-patológicos

HOFSTAD (1945) estudou a patogenia de uma amostra de vírus da BIG em aves com 21 dias de idade, inoculadas pela via intratraqueal. O aparecimento dos sinais clínicos de doença, tais como espirros, dispnéia, ronqueira, ocorreu a partir de 18 h.a.i. O único achado macroscópico encontrado em aves sacrificadas e necropsiadas foi uma traqueíte discreta com exsudato na luz traqueal.

PRINCE et alii (1962) estudaram o efeito da ventilação no desempenho de aves inoculadas com o vírus da BIG. Quatro grupos de 20 aves com idade entre quatro a oito semanas foram utilizados, sendo que em dois deles as aves foram inoculadas com o vírus e dois grupos permaneceram como controles. Em cada um dos grupos a ventilação foi de 3/4 e 2 cfm por ave. O consumo alimentar e o ganho de peso foram significativamente reduzidos devido à infecção. Embora não significante, o consumo alimentar tendeu a ser mais elevado na presença da taxa de ventilação mais alta.

PURCELL & MCFERRAN (1972) pesquisaram a patogenicidade de uma amostra irlandesa do vírus da BIG (VF 70-733, sorotipo Massachussets) para aves SPF com doze semanas de idade, inoculadas com $10^{6,75}$ DIE₅₀ através de aerossóis. Todas as aves infectadas apresentaram distúrbios respiratórios (espirros, obstrução nasal, dispnéia) entre 48 e 312 h.a.i. As

lesões macroscópicas se localizaram na traquéia, sacos aéreos e rins. O vírus foi isolado da traquéia, de 24 a 288 h.a.i., dos sacos aéreos, de 24 a 312 h.a.i. e dos rins, de 24 a 336 h.a.i.

JONES (1974) estudou a patogenia do vírus da BIG, a mostra M-41 em aves SPF com 30 semanas de idade. Inoculou um grupo de aves (A) por via intratraqueal, outro grupo (B) pela via endovenosa e outro (C), pela via intra-oviduto. Distúrbios respiratórios (espirros, dispnéia, respiração bucal e ronqueira pulmonar) foram encontrados no grupo A, a partir de 48 h.a.i., no grupo B, a partir de 72 h.a.i., e no grupo C, a partir de 96 h.a.i. As aves dos grupos B e C apresentaram letargia e à necrópsia apresentaram lesões macroscópicas nos rins (hipertrofia e descoloração) e carcaças desidratadas. O vírus foi isolado dos rins, traquéia e pulmões dos três grupos.

SPRINGER et alii (1974) pesquisaram a patogenia de uma amostra atenuada do vírus da BIG (sorotipo Massachussets) em aves gnotobióticas (GN) com cinco dias de idade, inoculadas por via intranasal com duas gotas de suspensão vírica contendo $10^{7,8}$ DIE₅₀/0,2 ml. Todas as aves apresentaram sintomas clínicos de doença respiratória (espirros e coriza com exsudato seromucoso) entre 72 e 168 h.a.i. Nenhuma ave morreu. As aves foram sacrificadas e os achados de necrópsia se resumiram em uma discreta aerosaculite.

MACDONALD & MCMARTIN (1976) compararam a patogenicidade da amostra vacinal "Holland" (sorotipo Massachussets)

em dois níveis de atenuação: H₅₂, menos atenuada e H₁₂₀, mais atenuada. Inocularam aves SPF com um dia e com doze semanas de idade. Utilizaram dois grupos com a mesma idade, sendo que um recebeu 0,05 ml de uma suspensão vírica contendo $0,5 \times 10^{4,1}$ DIE₅₀ (H₁₂₀) e o outro, 0,05 ml de $0,5 \times 10^{3,7}$ DIE₅₀ (H₅₂) via intratraqueal. Os dois níveis de atenuação causaram distúrbios respiratórios (espirros, obstrução nasal com respiração bucal e ronqueira pulmonar) nas aves de ambas as idades. Os vírus foram isolados dos rins das aves infectadas com a amostra H₅₂. Não houve mortalidade nos grupos infectados com H₁₂₀, mas com H₅₂ chegou a 30% nas aves com um dia de idade e a 10% nas aves com doze semanas. O vírus foi isolado da traquéia e pulmão em aves de ambas as idades e com as duas amostras.

RESENDE (1983) estudou a patogenia comparada de duas amostras brasileiras do vírus da BIG em aves gnotobióticas (GN) e livres de patógenos (SPF). As aves GN e SPF apresentaram sintomas clínicos, lesões macroscópicas e resposta sorológica diferentes, quando expostas a $10^{4,8}$ DIE₅₀ da amostra 208 e $10^{5,0}$ DIE₅₀ da amostra 29-78. As aves GN infectadas com as amostras 208 e 29-78 apresentaram sintomas clínicos menos acentuados (espirros menos freqüentes, ausência de obstrução nasal e ronqueira pulmonar) do que as aves SPF. Ambas as amostras provocaram congestão da mucosa dos cornetos e seios nasais infra-orbitários, traqueíte e conjuntivite discreta,

com presença de exsudato seromucoso (aves GN) e mucopurulento (aves SPF). Nas aves GN os achados de necrôpsia e clínicos ocorreram entre 48 e 72 h.a.i., para a amostra 29-78 e nas aves SPF entre 24 e 48 h.a.i. Nas aves SPF os achados de necrôpsia e clínicos ocorreram a partir de 24 h.a.i. para ambas as amostras.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Amostras de Vírus

3.2. Amostra 208

A amostra 208 (sorotipo Connecticut) foi isolada em 1973, a partir de swabs traqueais de poedeiras comerciais adultas apresentando sintomas respiratórios tais como: espirros, dispnéia, ronqueira, após a terceira passagem consecutiva em ovos embrionados de galinha (OEG) com dez dias de incubação, via cavidade alantóide, pelo Prof. Maurício Resende, no Departamento de Microbiologia do Ins-

tituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais. Esta amostra foi mantida liofilizada a -20°C .

O vírus foi reconstituído com 1 ml de PBS (Phosphate Buffered Saline) estéril, pH 7,2, diluído a 1:10 com PBS estéril, pH 7,2, testado quanto à contaminação bacteriana em caldo BHI* e tioglicolato** incubados a 37°C por 72 horas, e inoculado, via cavidade alantóide, em 10 OEG com 9-10 dias de incubação na quantidade de 0,2 ml/ovo. Após 72 horas de inoculação, oito ovos foram colocados em geladeira (4°C), durante a noite, para morte dos embriões e retração total dos vasos sanguíneos. O líquido alantóico foi coletado com seringa estéril, centrifugado a 6.000 rpm por 30 minutos em centrífuga refrigerada*** (4°C) para clarificação. O sobrenadante foi separado, adicionado de 1 ml de solução de antibióticos**** para cada 30 ml de líquido alantóico clarificado e deixado em temperatura ambiente por 20 minutos. Foi feita uma prova de esterilidade e, a seguir, o líquido alantóico foi distribuído em alíquotas de 5 ml, estocado a -70°C e conside

* Bacto-Brain Heart Infusion, 0132-01, Difco, Detroit, Michigan, USA.

** Bacto-Thioglycollate Medium, 0363-01, Difco, Detroit, Michigan, USA.

*** GSA rotor, Sorvall Super Speed, RC 2-B, Automatic Refrigerated Centrifuge, Newton, Connecticut, USA.

**** Solução de antibióticos 200 x 200: 1.000.000 u.i. penicilina G potássica (Fontoura-Wyeth) + 1 g de sulfato de estreptomicina (Fontoura Wyeth) + 5 ml de PBS, pH 7,2, filtrados em swinnex de 25 mm com membrana GSWP - 02500, 0,22 m, Millipore, Bedford, Massachusetts, USA.

rado como "vírus semente". Os dois ovos restantes foram abertos 216 horas após a inoculação e a atividade do vírus da BIG foi verificada através do aparecimento de lesões típicas nos embriões: nanismo, enrolamento e presença de uratos nos mesonefros. Foi realizada, também, a prova de hemaglutinação para o vírus da Doença de Newcastle e nenhuma atividade hemaglutinante foi constatada no líquido alantóico colhido às 72 e 216 h.a.i. Outra passagem, a partir do "vírus semente", foi efetuada em OEG com dez dias de incubação, nos mesmos moldes da anterior e o líquido alantóide colhido foi chamado de "vírus de trabalho", estocado a -70°C e utilizado em todo o experimento.

31.2. - Amostra M-41 (Massachusetts) -41)

A amostra M-41 foi cedida pelo Laboratório Hertape e mantida a -70°C . O "vírus semente" e o "vírus de trabalho" foram obtidos do mesmo modo que o da amostra 208.

3.1.3 Amostra Beaudette

A amostra IBV-Beaudette V-114, apatogênica e adaptada em OEG, foi cedida pelo laboratório do Prof. Bernard C. Easterday (Dep. Vet. Science, Univ. Wisconsin, USA) e mantida a -70°C . O "vírus semente" e o "vírus de trabalho" foram obtidos do mesmo modo que o da amostra 208.

3.1.4 Amostra Holland H-120

A amostra Holland H-120, de passagem desconhecida, foi cedida pelo laboratório de Doenças das Aves, da Escola de Veterinária da UFMG.

3.1.5 Caracterização das Amostras

As amostras M-41 e 208 foram caracterizadas como vírus da BIG (MATHEWS, 1982) de acordo com as seguintes provas: comportamento em OEG (BEAUDETTE & HUDSON, 1937); soroneutralização (PAGE & CUNNINGHAM, 1962); imunodifusão (PARISIS, 1965; LOHR, 1980). A amostra "Holland" H₁₂₀ (sorotipo Massachussets) foi usada como vírus de referência em todas as provas do experimento.

3.2 Produção da Vacina

3.2.1 Preparo do Antígeno



A amostra M-41 foi utilizada para a obtenção do antígeno. O "vírus semente" foi diluído a 1:10 com PBS estéril, pH 7,2, e inoculado em 32 ovos embrionados de galinha (SPF) com dez dias de incubação, na quantidade de 0,2 ml/ovo. Dois ovos foram inoculados com 0,2 ml de PBS e outros dois ovos foram inoculados com 0,2 ml da amostra H₁₂₀, para controle. Os embriões mortos até 24 h.a.i. foram descartados. Os ovos inoculados com a amostra M-41 foram abertos com 48 h.a.i. e o líquido alantóico foi coletado assepticamente e centrifuga

do a 6.000 rpm por 30 minutos em centrífuga refrigerada*. Do total colhido no sobrenadante foram retirados 5 ml para a titulação do vírus e provas de esterilidade. O restante foi adicionado de uma mistura de solução de antibióticos (idêntica à utilizada na produção dos "vírus sementes") e estocado a -70°C .

Para a titulação do vírus foram feitas diluições seriadas do líquido alantóico coletado (10^{-1} a 10^{-8}) e foram inoculados cinco OEG, por diluição, com 0,2 ml/ovo. Os embriões mortos até 24 h.a.i. foram descartados e a leitura dos ovos continuou até 192 h.a.i., anotando-se os mortos, diaria mente. O título, calculado segundo o método de REED & MUN-CHEN (1938), foi de $10^{5,5}$ DIE₅₀/0,2ml de amostra M-41.

A inativação do antígeno foi feita com betapropio lactona** (0,1%) durante 2 horas a 24°C . O volume (0,15ml) de betapropiolactona, mantida em freezer a -20°C , foi diluído em 10 ml de água destilada e adicionado à quantidade total do antígeno (150 ml) a ser inativado. Após a inativação, foram retirados 20 ml do antígeno, utilizados para a prova de infectividade residual e provas rotineiras de esterilidade.

* GSA Rotor, Sorvall Super Speed, RC-2B, Automatic Refrigerated Centrifuge, Newton, Connecticut, USA.

** β -propiolacton (3-Hydroxy-propions aurelacton), P.A.

PM 72,06 Flucka AG Bucks SB, fabricação suíça.

Para a prova de infectividade residual, ou seja, presença de vírus vivo após a inativação, foram inoculados 10 OEG com 10 dias de incubação e acompanhados durante 7 dias para verificação de lesões características do vírus da BIG nos embriões. As provas de esterilidade constaram de passagem em caldo BHI e tioglicolato incubados a 37°C por 72 horas. O antígeno, assim inativado e testado, foi adicionado de 50% de sacarose* (solução a 0,34 M) e liofilizado, segundo técnicas padronizadas (ROWE, 1971).

3.2.2 Preparo da Emulsão

A vacina foi preparada sob forma de emulsão oleosa dupla, isto é, redispersando a emulsão simples, do tipo água-em-óleo, em uma fase externa à base de salina (HERBERT, 1978).

A fase oleosa da emulsão constou de uma mistura de óleo mineral (Drakeol 6 VR)** e de um emulsificante (Arlacel A***) na proporção de 9:1, que foi filtrada**** e mantida a

* Sucrose, Grade I, crystalline, Cat. nº 5.9378, Sigma Chemical Company, P.O. Box 14508, St. Louis, Mo., 63178, USA.

** Drakeol 6 VR - Aldrich Chemical Company, Cat. nº 16.140-3, P.O. Box 355, Milwaukee, Wi., 53201, USA.

*** Arlacel A - Special 330 B - Mannide Monooleate, Sandria Corporation, Box 7 - Bayside, N.Y., USA.

-20°C. A fase líquida foi preparada a partir do antígeno liofilizado, concentrado 15 vezes, e adicionado de uma solução de salina, contendo 2% de Tween 80* na proporção de 4:1 (STONE et alii, 1980).

A fase oleosa foi colocada sob agitação lenta (12.500 rpm) durante 5 minutos em um mixer** e, gota a gota, foi acrescentada à fase líquida. A mistura foi homogeneizada a 25.000 rpm durante 1 minuto e a proporção da fase líquida e oleosa foi de 1:4.

Foram realizadas provas de esterilidade e inocuidade nas fases líquida e oleosa, individualmente. A emulsão final foi testada quanto à estabilidade, viscosidade e tipo de emulsão.

Para a prova de estabilidade, foram retirados 10 ml de vacina e colocados 5 ml em dois frascos, separadamente. Um dos frascos permaneceu em geladeira (4°C) e outro, em estufa a 37°C, ambos pelo prazo de, no mínimo, três meses, a fim de ser observada a dissociação ou não das partes líquida e oleosa da vacina final (BERLIN, 1960).

**** Filtrada em Swinnex 25 mm com membrana GSWP - 02500 ;
0,22 nm, Millipore, Bedford, Massachusetts, USA.

* Tween 80 - (polyoetilenesorbitan), Cat. nº P 1754, Sigma Chemical Company, P.O. Box 14508, St. Louis, Mo., USA.

** SORVALL OMNIMIXER - MicroMacroHomogenizer, velocidade até 50.000 rpm, Ivan Sorvall Inc., Newton, Conn., USA.

A viscosidade foi medida através da queda da vacina emulsionada de uma pipeta sorológica de 1,0 ml, a 24°C. A emulsão foi aspirada até a marca zero. O tempo, em segundos, para o efluxo de 0,2 ml foi medido e tirada a média em três pipetas separadamente (BERLIN, 1960).

O tipo de emulsão foi verificado pelo teste em lâmina. Uma gota da vacina emulsionada foi misturada a uma gota de água e uma gota de óleo, respectivamente (BERLIN, 1960).

Outro frasco contendo 50 ml de vacina foi mantido em geladeira (4°C) até o momento da vacinação.

3.3. Aves Utilizadas

3.3.1 Aves Gnotobióticas (GN)

Foram obtidas e criadas segundo normas estabelecidas por BRADLEY et alii (1967); COATES et alii (1968) e PLEASANTS (1977).

3.3.1.1. - Obtenção de Aves GN

a) Ovos Utilizados

Os ovos foram obtidos da Granja Rezende em Uberlândia - MG, férteis e isentos de agentes patógenos específicos (SPF) incubados durante 19 dias, com ovoscopia diária na primeira semana.

b) Isoladores

O isolador maternidade foi construído apresentando as seguintes características: paredes laterais e fundo de compensado, com 20 mm de espessura, revestidos com pintura resistente; teto de plástico flexível transparente, com 2 mm de espessura; área de entrada e saída de material feitos com tubos de PVC rígido de 30 cm de diâmetro e 30 cm de comprimento, adaptados à parede do isolador e fechados, por fora e por dentro, com materiais plásticos*, par de luvas de borracha longas, flexíveis e resistentes, adaptadas à área de entrada de material e utilizadas no manuseio interno do i

* GF Supply Division, Standard Safety Equipment Company, 431 North Quentin Road, Palatine, Illinois, USA.

4. RESULTADOS

Das 90 aves SPF mantidas no biotério 10 morreram: 7 por canibalismo, 2 por defeitos de incubação e 1 por reação pós-vacinal.

Nos isoladores 1 ave controle morreu asfixiada na luva de borracha de manipulação. Um dos isoladores, contendo 4 aves sofreu contaminação* e as medidas tomadas foram a limpeza total do interior do isolador e o uso de antibiótico, após a realização de um antibiograma**. As aves pas

* com uma única bactéria, Gram-positiva, baciliforme, aeróbia, produtora de esporos, formadora de cadeia e imóvel.

** Multodisk, Oxoid, Hampshire, England.

saram, então, a receber cloranfenicol* adicionado ao alimento estéril. Uma solução aquosa desse antibiótico foi esterilizada por filtração **, ampolada (5ml) e introduzida no isolador. A cada frasco de comida (1 litro) foi adicionada uma ampola de 500 mg de cloranfenicol, de dois em dois dias, até o fim do experimento.

4.1. Avaliação das Características Físicas da Emulsão

4.1.1. - Tipo de emulsão

A gota de vacina colocada em água não se misturou, enquanto que com óleo houve total miscigenação da vacina.

4.1.2. - Viscosidade

O tempo, em segundos, para o efluxo de 0.2 ml da emulsão foi de 1.5 segundos.

4.1.3. - Estabilidade

A vacina colocada em estufa a 37°C permaneceu estável, sem dissociação das duas fases, pelo prazo de 4 meses ou 16 semanas. A partir desse tempo a separação começou a

* Cloromicetina, cápsulas de 250 mg, Parke-Davis, São Paulo, Brasil.

** Swinnex 25mm com membrana esterilizante GSWP-02500, poro 22 nm, Millipore, Bedford, Massachussets, USA.

ocorrer gradativamente até 6 meses após o preparo da vacina; já a vacina que foi armazenada em geladeira a 4°C iniciou a separação das fases por volta de 6 meses após o seu preparo, permanecendo estável até esse prazo (Figuras 4 e 5).

4.2. Reação após a vacinação

4.2.1. - Aves GN e SPF

As aves GN apresentaram reação vacinal mais intensa que as aves SPF, do ponto de vista clínico. As aves mostraram-se bastante deprimidas durante 3 a 5 dias, mantendo, entretanto, consumo normal de água e ração.

Apenas uma ave SPF morreu após a aplicação da vacina, sem qualquer sinal clínico. Todas as aves evidenciaram um desconforto bastante grande no ponto de inoculação da vacina, agitando a cabeça constantemente.

4.3. Reação após o desafio

4.3.1. - Aves GN e SPF vacinadas

O único sinal clínico presente em ambos os grupos foi hiperemia de conjuntiva, que teve início às 24 horas após o desafio e desapareceu por volta de 96 h.a.i.

4.3.2. - Aves GN e SPF controles

Os sinais clínicos foram os mesmos para ambos os grupos iniciando com hiperemia e congestão de conjuntiva às 24 horas e prolongando-se por mais de 144 horas após o desafio. Tosse, espirros e coriza apareceram às 72 horas e, também, se prolongaram além de 144 h.a.i. As aves SPF apresentaram, ainda, ruídos respiratórios.

4.4. Resposta de anticorpos anti-vírus da BIC

4.4.1. - Sangria pré-vacinal

Nenhuma ave testada apresentou resultado positivo para o teste.

4.4.2. - Sangria pós-vacinal

4.4.2.1. - Aves GN e SPF vacinadas

Todos os soros testados das aves sangradas aos 21 dias foram positivos para o teste de imunodifusão. Os soros das aves SPF testados para presença de anticorpos neutralizantes apresentaram uma média de índices de neutralização de $\bar{X}_{IN} = 2,28$, enquanto que os soros das aves GN apresentaram uma média de $\bar{X}_{IN} = 3,37$ (Tabela I).

4.4.2.2. - Aves GN e SPF controles

Não foram detectados anticorpos precipitantes anti-vírus da BIG em quaisquer dos soros testados. Os índices de neutralização nos soros das aves SPF tiveram uma média de $\bar{X}_{IN} = 0,037$, enquanto que nas aves GN a média foi $\bar{X}_{IN} = 0,33$ (Tabela I).

4.5. Isolamento de vírus

4.5.1. - Antes da vacinação

Nenhuma lesão característica do vírus da BIG foi constatada nos embriões inoculados.

4.5.2. - Após o desafio

4.5.2.1. - Aves SPF vacinadas e controles

Foram colhidos swabs traqueais de todas as aves do experimento, no 1º, 3º, 5º e 7º dias após o desafio. Os swabs tiveram o mesmo tratamento que os anteriores.

Das aves vacinadas, os swabs foram inoculados e os embriões não evidenciaram quaisquer lesões típicas do vírus da BIG. Os swabs das aves controles foram igualmente inoculados e os embriões apresentaram lesões como enrolamento, na nismo e mortalidade a partir de 72 horas (Figura 6 e Tabela II).

4.5.2.2. - Aves GN vacinadas e controles

O procedimento foi o mesmo que o das aves SPF. O isolamento de vírus das aves controles também se iniciou a partir de 72 horas (Tabela II).

4.6. Achados de Necrópsia (Lesões Macroscópicas)

4.6.1. - Aves GN vacinadas e controles

As aves dos isoladores foram necropsiadas e nenhum achado ou lesão macroscópica foi encontrada nas aves vacinadas. Nas aves controles os achados foram: conjuntivite discreta, congestão dos seios infra-orbitários e traqueíte, ambas com presença de exsudato seromucoso (Tabela III), além de hipertrofia do baço e da bursa de Fabricius.

4.6.2. - Aves SPF vacinadas e controles

Do grupo das vacinadas somente duas apresentaram sinus congestos; no restante das aves não foram observados outros achados macroscópicos.

Nas aves controles as lesões encontradas foram: conjuntivite, congestão dos seios infra-orbitários e traqueíte intensa, ambas com exsudato mucopurulento (Tabela III), e, ainda, hipertrofia de baço e da bursa de Fabricius.

Em ambos os grupos de aves vacinadas, no ponto de inoculação da vacina, houve a formação de um granuloma difuso, de aspecto pastoso e cor amarelada, ainda presente (Figura 3).

4.7. Análise Estatística

Utilizou-se a variância global após a verificação da homogeneidade das variâncias individuais dos grupos GN e SPF de aves vacinadas, já que o tamanho das amostras variou bastante entre os dois grupos. A aplicação do teste "t" de Student revelou haver diferença estatisticamente significativa entre as médias dos índices de neutralização (IN) das aves vacinadas de ambos os grupos, GN e SPF, ao nível de 5%.

TABELA I - Índices de Neutralização (IN) encontrados em aves GN e SPF vacinadas e não vacinadas

SPF VACINADAS	GN VACINADAS
n = 40	n = 4
$\bar{X} = 2.28$	$\bar{X} = 3.37$
S = 0.57	S = 0.5
CV = 25	CV = 14

SPF NÃO VACINADAS	GN NÃO VACINADAS
n = 40	n = 3
$\bar{X} = 0.037$	$\bar{X} = 0.33$
S = 0.1	S = 0.28
CV = 333	CV = 84

n = tamanho da amostra;

S = variância

\bar{X} = média;

CV= coeficiente de
variação.

TABELA II - Isolamento de vírus das aves GN e SPF, vacinadas e não vacinadas, desafiadas com amostra 208 de vírus da BIG.

AVES		DIAS APÓS O DESAFIO			
		1º	3º	5º	7º
SPF	Não vacinadas	0/40	25/40	40/40	40/40
	Vacinadas	0/40	0/40	0/40	0/40
GN	Não vacinadas	0/3	1/3	3/3	3/3
	Vacinadas	0/4	0/4	0/4	0/4

TABELA III - Presença de Lesões Macroscópicas em aves GN e SPF, vacinadas e não vacinadas, desafiadas com amostra 208 de vírus da BIG.

Aves	Nº	Lesões Macroscópicas			
		Traqueíte	Sinusite	Conjuntivite	
Vacinadas	SPF	200	-	+	-
	201	-	-	-	-
	202	-	-	-	-
	203	-	-	-	-
	204	-	-	-	-
	205	-	-	-	-
	206	-	-	-	-
	207	-	-	-	-
	208	-	-	+	-
	209	-	-	-	-
	GN	501	-	-	-
502	-	-	-	-	
Não vacinadas	SPF	300	+	-	+
	301	+	-	-	+
	302	+	+	+	+
	303	+	+	+	+
	304	+	+	+	+
	305	++	+	+	+
	306	+	+	+	+
	307	+	+	+	+
	308	++	+	+	+
	309	+	+	+	+
	GN	401	+	+	+
402	+	+	+	+	

- ausente; + ligeira; ++ intensa



FIGURA 1 - Aves GN criadas em isoladores.

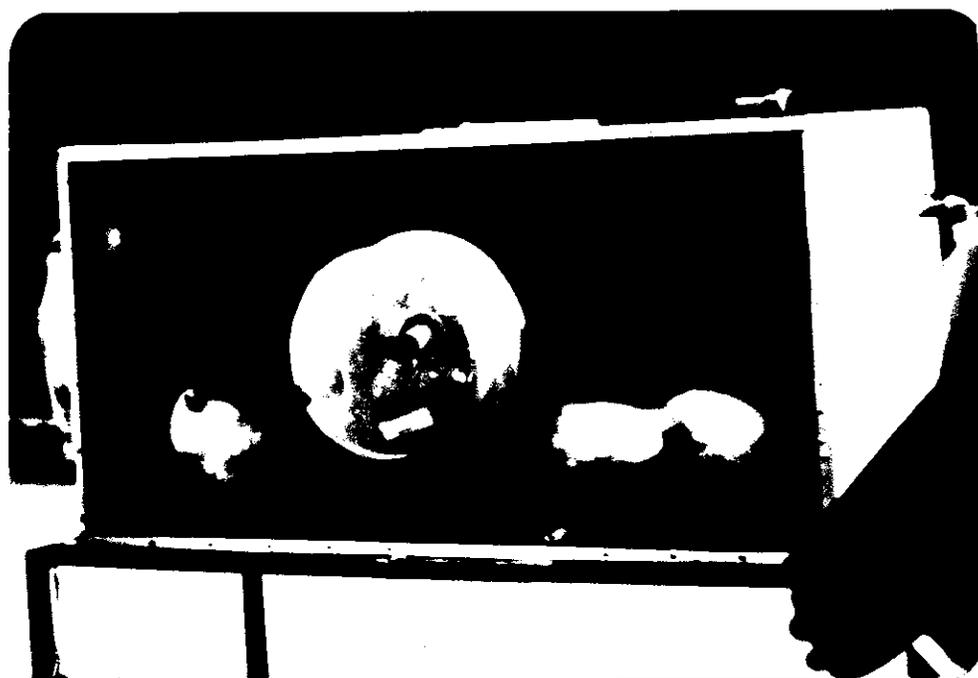


FIGURA 2 - Aves GN criadas em isoladores.



FIGURA 3 - Granuloma difuso, no ponto de inoculação,
aos 45 dias após a vacinação.



FIGURA 4 - Vacina oleosa contra BIG aos 90 dias após o preparo; à esquerda, tubo mantido a 40°C; à direita, tubo mantido em estufa a 37°C.



FIGURA 5 - Vacina oleosa contra BIG aos 180 dias após o preparo: à esquerda, tubo mantido a 4°C; à direita, tubo mantido em estufa a 37°C.

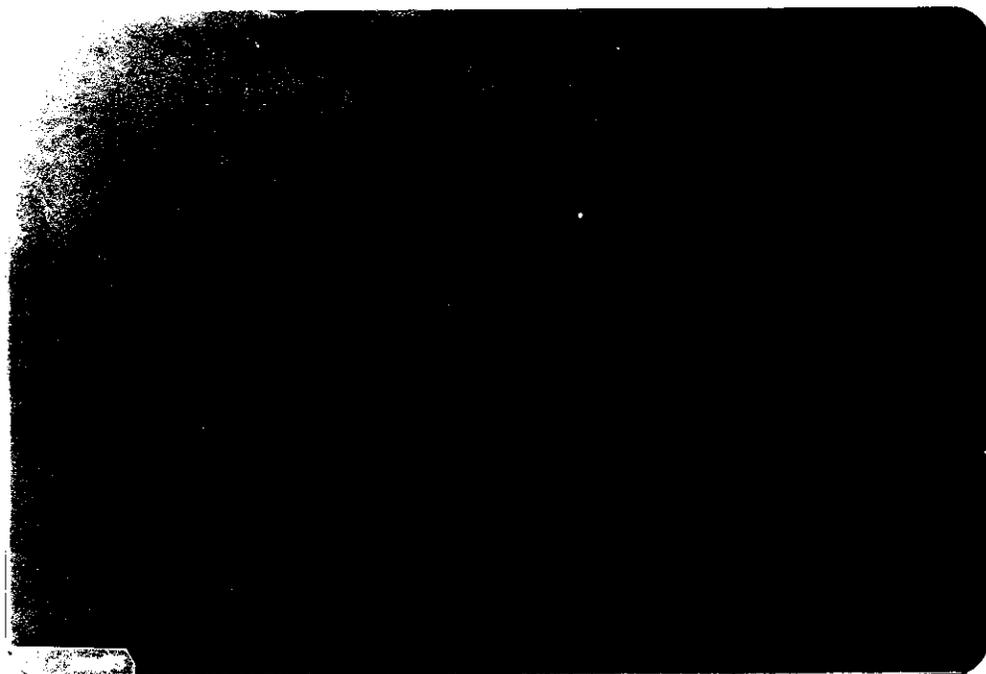


FIGURA 6 - Lesão típica de nanismo e enrolamento encontrada no isolamento de vírus das aves GN e SPF não vacinadas (embrião da direita).

5. DISCUSSÃO

5.1. Avaliação da vacina

É sabido que a ação de pequenas quantidades de antígenos durante longo período de tempo, estimula a produção de anticorpos contra qualquer tipo de determinante, cuja afinidade média aumenta com o próprio tempo. O aumento desta afinidade obedece à estimulação preferencial dos linfócitos B sensíveis ao antígeno, que têm maior afinidade pelos determinantes antigênicos. Esta estimulação vai se tornando cada vez mais seletiva, uma vez que se produz o anticorpo de grande afinidade capaz de formar um complexo com o antígeno residual e impedi-lo que estimule as células B cujos re

ceptores têm menor afinidade. Quando se empregam grandes doses de antígeno, com ou sem adjuvante, para provocar uma produção primária de anticorpos, há uma seleção mínima de células de grande afinidade e predominam os anticorpos de escassa afinidade; um novo estímulo também produz, sobretudo, anticorpos de pouca afinidade. O antígeno em pequenas doses, sem adjuvante, pode ser capaz de estimular e manter uma resposta de suficiente intensidade ou duração para que se desenvolva um processo seletivo. Portanto, a melhor maneira de se obter a produção de anticorpos de grande afinidade é administrar quantidades mínimas de antígeno de uma forma persistente juntamente com um adjuvante enérgico e constante (OMS, 1976).

Antígenos inoculados parenteralmente, contendo óleo mineral, geralmente estimulam a formação de títulos de anticorpos mais altos e mais persistentes que quantidades equivalentes dos mesmos antígenos, sem adição de adjuvante ou com hidróxido de alumínio (STONE et alii, 1980) ou ainda, contendo lípidos metabolizáveis (BRUGH et alii, 1983). A maioria dos adjuvantes provoca preferencialmente a síntese de uma ou várias classes de anticorpos. As partículas de $Al(OH)_3$, sobre as quais se adsorve o antígeno, são adjuvantes muito eficazes para promover a síntese de anticorpos IgE em coelhos e outros roedores (OMS, 1976).

Os estudos sobre vacinas oleosas contra a BIG são escassos na literatura, por essa razão o planejamento e a execução do presente trabalho foram baseados, também, em

trabalhos realizados com vacinas inativadas e sob a forma de emulsão oleosa contra a Doença de Newcastle (LEVY & ZAKAYRONES, 1973; CESSI & NARDELLI, 1974).

A partir dos anos 70 as experiências no preparo de vacinas inativadas apresentadas sob forma de emulsão oleosa contra a Doença de Newcastle mostraram as vantagens no sentido de conferirem uma imunidade de longa duração e níveis mais elevados de anticorpos. Desde então, a preocupação dos pesquisadores se voltou, também, para a produção de outras vacinas aviárias, inativadas e adicionadas de adjuvantes oleosos, inclusive contra a BIG (COUGH et alii, 1977; STONE et alii, 1978; BOX et alii, 1980).

As vacinas em emulsão do tipo água-em-óleo consistem de uma fase aquosa, na forma de gotículas, em óleo mineral. O antígeno é contido na fase aquosa e permanece disperso no óleo através da ação de emulsificantes. As características físicas da emulsão são afetadas por fatores tais como: o tipo de emulsificantes adicionados, a atividade intrínseca do emulsificante da fase líquida, os volumes relativos entre a fase aquosa e a oleosa e o processo de emulsificação (HERBERT, 1978).

A preparação de emulsões requer o conhecimento de uma tecnologia específica e a metodologia não está descrita extensivamente na literatura biomédica. As emulsões do tipo água-em-óleo têm se mostrado excelentes adjuvantes imunológicos. Reações tissulares indesejáveis no ponto de inoculação têm sido minimizadas pelo uso de óleos e emulsificantes

atóxicos (AITKEN & SURVASHE, 1974).

O maior obstáculo no preparo de vacinas sob a forma de emulsão oleosa é a obtenção de emulsão do tipo água - em-óleo com baixa viscosidade, essencial para assegurar um manuseio fácil e correto, particularmente em climas frios e, ainda, com a necessária estabilidade (BERLIN, 1959; STONE et alii, 1978).

A influência da composição da emulsão nas características físicas, bem como na eficiência de vacinas experimentais tem sido bastante estudada. Emulsões contendo em sua formulação Tween 80, emulsificante da fase aquosa, em combinação com Arlacel A ou Arlacel 80 (emulsificante da fase oleosa) evidenciam viscosidade mais baixa e estabilidade de maior. A utilização do Tween 80 pareceu não alterar a antigenicidade do vírus da BIG. O Tween 80, emulsificante hidrofílico, é um derivado polioxietilenado do emulsificante lipofílico Arlacel 80. Essa proximidade entre as moléculas dos dois emulsificantes deve contribuir para a redução da viscosidade e um aumento na estabilidade. Por sua vez, essas características físicas devem estar associadas com o aumento na resposta sorológica (STONE et alii, 1983). Contudo, não se pode excluir a possibilidade de que o aumento da resposta sorológica associado ao Tween 80 seja o resultado de uma interação direta dele com o antígeno viral ou o resultado de um efeito adjuvante direto e independente (GALL, 1967). Nossos resultados, com relação ao uso dos mesmos emul

sificantes, estão em concordância com trabalhos anteriores (FREUND et alii, 1948; STONE et alii, 1978/1983). A estabilidade da vacina foi verificada pelo tempo após o preparo, sem haver dissociação completa das duas fases. A temperatura de 37°C ela permaneceu estável até 16 semanas, o que também foi encontrado por outros pesquisadores (CESSI & NARDELLI, 1974; STONE et alii, 1983).

A fase líquida deve ser bastante reduzida em seu volume, para que a viscosidade seja baixa, portanto, a concentração do antígeno precisa ser bem mais elevada, a fim de reter a potência da vacina (BERLIN, 1959; STONE et alii, 1978). Para concentrar o antígeno utilizamos o método da liofilização, ao invés da ultracentrifugação, que é a metodologia mais empregada em virologia e que foi utilizada em outros trabalhos (BOX et alii, 1980; STONE et alii, 1980 / 1981). Optamos pela liofilização, porque apesar de não purificar o vírus usado como antígeno, é um processo mais simples e de custo mais barato, devido ao fato de se dispensar o emprego de centrífuga preparativa. A liofilização do líquido alantóico e posterior adição do mesmo à fase líquida da vacina, mostrou-nos ser esse um processo também seguro no que diz respeito à estabilidade da vacina.

O uso de betapropiolactona a 0,1% se mostrou eficiente e a ausência de infectividade residual foi confirmada através da inoculação do material em OEC com 9 a 11 dias de incubação, não tendo havido o aparecimento de quaisquer

lesões, nos embriões, características do vírus da BIG. Outros autores obtiveram a mesma inativação com diferentes concentrações, temperatura e tempo de exposição (CESSI & NARDELLI, 1974 ; GOUGH et alii, 1977).

A emulsificação, fase final do preparo da vacina , é um ponto crítico. Os métodos descritos na literatura citam desde o processo manual, com o uso de duas seringas a copladas (BERLIN, 1959; HERBERT, 1978) até uma homogeneização mecânica com auxílio de homogeneizador usando rotações variando de 4.000 a 19.500 rpm. O processo de emulsificação da vacina em questão foi realizado em duas etapas. Na primeira etapa, a fase líquida foi acrescentada, gota a gota , sob agitação lenta (12.500 rpm) à fase oleosa. Na segunda etapa, a emulsão oleosa foi homogeneizada a 25.000 rpm, durante aproximadamente 1 minuto, sob refrigeração, o que diferiu de outros trabalhos apresentados anteriormente (STONE et alii, 1978/1983). A homogeneização realizada em rotação e tempo maiores, parece ter influenciado na estabilidade do produto final, já que a dissociação das fases líquida e oleosa, à 37°C, teve início por volta de 16 semanas.

5.2. Resposta Clínica e Imunitária

A escolha da via subcutânea, na região dorso- anterior do pescoço, para a inoculação da vacina se deveu ao fato de que assim se evitaria a formação de granuloma visível externamente, o que depreciaria a carcaça das aves. O granuloma formado abaixo da derme foi do tipo difuso (Figura 3). Na maioria dos trabalhos com vacinas oleosas a via intramuscular é a mais usada (LEVY & ZAKAY-RONES, 1973; GOUGH et alii, 1977). A via intramuscular, no músculo peitoral ou da coxa, tem, também, a desvantagem de que as aves se sentem incomodadas com o granuloma no ponto de inoculação e acabam ferindo e infectando o local de depósito da vacina. Uma das aves morreu logo após a vacinação. À necrópsia não se observou qualquer lesão, o que nos levou a acreditar que foi devido a um erro de inoculação ou de alguma maneira relacionada com o processo de vacinação ou de contenção da ave.

A reação vacinal, sob o aspecto clínico, foi mais intensa nas aves GN do que nas SPF. O consumo de água e ração não foi alterado, mas as aves demonstraram um desconforto bastante grande no ponto de inoculação, agitando a cabeça constantemente durante cerca de 3 a 5 dias.

O desafio de todas as aves GN e SPF foi feito com uma suspensão vírica da amostra 208, por via intratraqueal, através de uma sonda, para que não houvesse perda de partí-

culas víricas. Os métodos utilizados em outros trabalhos consistem em dispersão de partículas através de spray, por via intranasal ou intraocular (GOUGH et alii, 1977; BOX et alii, 1980; STONE et alii, 1983).

Nas aves GN e SPF controles os sintomas clínicos após o desafio foram de doença respiratória. As aves GN apresentaram hiperemia e congestão de conjuntiva 24 horas após o desafio, que se prolongaram por mais de 144 horas. Tosse, espirros e coriza apareceram às 72 horas e se prolongaram por mais de 144 horas. Esses resultados estão em desacordo com outros achados (SPRINGER et alii, 1974; RESENDE, 1983). No primeiro trabalho, aves GN infectadas com vírus da BIG apresentaram coriza e espirros apenas; já no segundo trabalho, o autor observou somente espirros em aves GN infectadas com a mesma amostra 208. Nas aves SPF controles os sintomas clínicos foram, também, hiperemia e congestão de conjuntiva, com início 24 horas após o desafio e se prolongando por mais de 144 horas, coriza, tosse, espirros e ronqueira pulmonar. Excetuando hiperemia e congestão de conjuntiva, os sintomas clínicos restantes também foram encontrados por outros pesquisadores que trabalharam com amostras de vírus da BIG com tropismo para o sistema respiratório (PURCELL & MCFERRAN, 1972; JONES, 1974; RESENDE, 1983).

Não houve mortalidade entre as aves GN e SPF controles. Em outro trabalho (PURCELL & MCFERRAN, 1972) houve uma pequena mortalidade em aves SPF devido, talvez, à associação com alguma infecção bacteriana secundária.

Após o desafio as aves GN e SPF controles não apresentaram alterações mensuráveis quanto ao consumo de água e ração contrariando outros estudos (PRINCE et alii, 1962 ; PURCELL & MCFERRAN, 1972) os quais verificaram redução na ingestão de alimento com posterior diminuição do ganho de peso das aves infectadas com vírus da BIG. Nossos resultados confirmam os achados encontrados por RESENDE (1983).

As aves GN e SPF vacinadas apresentaram somente uma ligeira hiperemia de conjuntiva, que se iniciou às 24 horas após o desafio e desapareceu ao redor de 96 horas.

A resposta de anticorpos contra o vírus da BIG foi pesquisada através dos testes de imunodifusão e soroneutralização. Os soros de todas as aves GN e SPF vacinadas foram positivos à imunodifusão. Pelo teste de soroneutralização, os soros das aves GN e SPF vacinadas apresentaram índices de acordo com os preconizados por CUNNINGHAM (1951). As aves GN apresentaram uma média de índices de neutralização significativamente maior que a das aves SPF (Tabela I).

Nas aves GN e SPF vacinadas devido à ação antivírica dos anticorpos produzidos, não houve isolamento de vírus através de swabs traqueais. Por outro lado, de todas as aves controles o vírus da BIG foi isolado através de inoculação de OEG com 9 a 11 dias de incubação, no 3º, 5º e 7º dias após o desafio. (Tabela II).

5.3. - Achados de Necrópsia

As aves GN vacinadas não apresentaram, ne crópsia, quaisquer lesões macroscópicas. Dentre as SPF apenas duas apresentaram sinus congestos. (Tabela III).

Nas aves SPF controles (Tabela III) as lesões macroscópicas se limitaram ao sistema respiratório superior, bem como conjuntivite e hipertrofia de baço e da bursa de Fabricius. Tal hipertrofia se deu devido ao estímulo provocado pelo vírus para a produção de anticorpos. As aves GN apresentaram conjuntivite discreta, congestão da mucosa dos cornetos e seios nasais infraorbitários com presença de exsudato seromucoso e uma traqueíte discreta, também, com exsudato seromucoso.

As aves SPF apresentaram as mesmas manifestações, apenas com exsudato mucopurulento amarelado nos seios infraorbitários e traqueíte mais intensa, também, com presença de exsudato mucopurulento, de cor amarela.

Conjuntivite, observada tanto nas aves GN como nas SPF, está de acordo com outro trabalho (RESENDE, 1983), mas não foi descrita por outros pesquisadores.

Traqueíte, com exsudato seromucoso e mucopurulento também foi encontrado por outros pesquisadores que utilizaram amostras de vírus da BIG com tropismo para o sistema respiratório (HOFSTAD, 1945; PURCELL & MCFERRAN, 1972).

Hipertrofia de baço e da bursa de Fabricius foi encontrada em algumas aves GN e SPF controles, o que também foi descrito em outro trabalho (RESENDE, 1983), contrariando outro estudo (MACDONALD & MCMARTIN, 1976), que encontrou material purulento no interior da bursa de Fabricius.

Aerossaculite não foi verificada em nenhuma das aves GN e SPF necropsiadas. Já em outro trabalho (SPRINGER et alii, 1974), os achados de necrópsia em aves GN se limitaram a uma discreta inflamação dos sacos aéreos. Este tipo de diferença poderia refletir pequenas diferenças de tropismo das amostras usadas no desafio.

A vacina em questão apresentou resultados satisfatórios dentro do que foi proposto inicialmente. No entanto, são necessários outros estudos para avaliar, por exemplo, a resposta clínica e imunitária em aves adultas, com aplicação no início da postura, tanto em caráter experimental como a nível de campo. A amostra utilizada nos experimentos (208) tem tropismo para o sistema respiratório, portanto, outro trabalho que poderia ser realizado diz respeito ao teste da vacina frente a amostras nefrotrópicas e a amostras com tropismo para o aparelho reprodutor.

A proteção conferida pela vacina, medida através dos índices de neutralização, foi maior nas aves GN, o que nos sugere que nestas aves a resposta imunológica foi mais específica e direcionada que nas aves SPF.

Com base em nosso trabalho e na literatura consul
tada, podemos dizer que o isolamento e a identificação das
amostras de campo brasileiras precisa ganhar prioridade. Ho
je, através do emprego da técnica de anticorpos monoclo -
nais, sua identificação e classificação sorológica podem
ser efetuadas com grande precisão. É possível que se encon
trem amostras de campo com maior imunogenicidade que as u
sadas atualmente nas vacinas comerciais.

6. CONCLUSÕES

6.1. Foi possível produzir uma vacina inativada oleosa contra a BIG, a partir da amostra Massachussets-41, de boas qualidades físicas e com técnica mais simplificada.

6.1.1. - O uso de Tween 80, emulsificante hidrofílico, em associação com o emulsificante da fase oleosa, Arla cel A, possibilitou a obtenção de uma vacina com baixa viscosidade e maior estabilidade.

6.1.2. - A liofilização foi eficiente recurso para a concentração da fase líquida da emulsão. A não purificação do vírus que entrou no preparo da vacina, em nada alterou as propriedades físicas da mesma.

6.2. - A amostra 208 (amostra desafio) produziu nas aves controles (não vacinadas) manifestações clínicas e patológicas de doença respiratória, inclusive nas aves GN, livres de bactérias colonizadoras do sistema respiratório, sendo estas manifestações mais graves nas aves SPF.

6.3. - A vacina produziu reações clínicas mais intensas nas aves GN do que nas aves SPF, mas o consumo de água e ração não foi afetado em quaisquer dos grupos.

6.4. - A vacina protegeu satisfatoriamente as aves GN e SPF, que tiveram discreta hiperemia de conjuntiva de curta duração e, à necrópsia, somente duas aves SPF apresentaram discreta sinusite. O índice de antisoros neutralizantes foi maior nas aves GN do que nas SPF.



As aves GN e SPF foram utilizadas para o estudo comparativo das observações realizadas antes e depois da vacinação. A reação vacinal, sob o aspecto clínico, foi mais intensa nas aves GN. Após o desafio, as aves GN e SPF vacinadas apresentaram o mesmo grau de hiperemia de conjuntiva, que teve início às 24 horas e desapareceu por volta de 96 h.a.i (horas após a inoculação). As aves GN e SPF controles apresentaram hiperemia e congestão de conjuntiva, iniciando às 24 horas e prolongando-se por mais de 144 horas após o desafio; essas aves apresentaram, ainda, tosse, espirros e coriza, que apareceram às 72 horas e se prolongaram além de 144 horas após o desafio. As aves SPF controles apresentaram, também, ronqueira pulmonar. Anticorpos precipitantes e neutralizantes foram pesquisados através das provas de gel difusão (AGD) e soroneutralização (SN), tanto nas aves vacinadas como nas aves não vacinadas de ambos os grupos. Entre as aves vacinadas, houve uma diferença significativa ($P < 0,05$) entre as médias dos índices de neutralização (IN) apresentados pelas aves GN e pelas aves SPF, sendo $\bar{X}_{IN} = 3,37$ e $\bar{X}_{IN} = 2,28$, respectivamente.

O isolamento de vírus da BIG foi tentado, nas aves GN e SPF vacinadas, antes e após a vacinação, pela inoculação de swabs traqueais em ovos embrionados de galinha (OEG) com 9 a 11 dias de incubação. Não houve qualquer isolamento de vírus durante todo o experimento. Já nas aves GN e SPF controles o isolamento de vírus se iniciou a partir de 72 h.a.i. com lesões típicas nos embriões, como enrolamento, na

nismo e mortalidade.

À necrópsia, nenhuma lesão macroscópica foi encontrada nos dois grupos de aves vacinadas. Nas aves GN controles os achados foram conjuntivite discreta, congestão dos seios infra-orbitários e traqueíte, ambas com presença de exsudato seromucoso. Nas aves SPF controles as lesões foram conjuntivite, congestão dos seios infra-orbitários e traqueíte, ambas com exsudato mucopurulento, de aspecto amarelado.

7. RESUMO

PREPARO DE VACINA OLEOSA EXPERIMENTAL CONTRA BRONQUITE INFECCIOSA DAS CALINHAS (BIG) E AVALIAÇÃO EM AVES GNOTIBIÓTI-CAS (GN) E EM AVES LIVRES DE PATÓGENOS (SPF).

Foi preparada uma vacina oleosa experimental, sob forma de emulsão dupla e testada em aves GN e em aves SPF. O produto final atingiu os requisitos de estabilidade, viscosidade e tipo de emulsão. As aves GN foram criadas em isoladores apropriados e divididas em dois grupos de quatro aves cada (vacinadas e não vacinadas). As aves SPF foram criadas em condições de isolamento e, também, divididas em dois grupos: 45 aves vacinadas e 45 aves não vacinadas.

SUMMARY

PREPARATION OF AN EXPERIMENTAL INFECTIOUS BRONCHITIS OIL-EMULSION VACCINE AND EVALUATION IN GNOTOBIOTIC (GN) AND SPECIFIC-PATHOGEN-FREE (SPF) CHICKENS.

An experimental infectious bronchitis oil-emulsion vaccine was prepared and evaluated in GN and SPF chickens. All standard requirements for stability, viscosity and emulsion type were achieved. GN chickens were reared in appropriate isolators and were divided into two groups of four birds each (vaccinated and unvaccinated). SPF chickens were reared in isolation and were also divided into two groups: 45 vaccinated and 45 non-vaccinated.

GN and SPF chickens were used for a comparative study on the observations before and after vaccination.

Post-vaccinal reaction was more intensive in GN birds. After challenge both GN and SPF vaccinated chickens showed the same degree of conjunctival hyperaemia which started at 24 hours and disappeared around 96 h.a.i. (hours after inoculation). Non-vaccinated GN and SPF chickens showed hyperaemia and congestion of the conjunctiva from 24 hours through more than 144 hours after challenge. These birds also showed cough, gasping and nasal discharge from 72 hours up to 144 hours after challenge. SPF control chickens also showed tracheal rales.

Precipitating and neutralizing antibodies were assessed by agar-gel diffusion and serum neutralization tests. Amongst the vaccinated birds there was a significant difference ($P < 0.05$) between the neutralization indexes means of the GN and SPF chickens being $\bar{X}_{IN} = 3.37$ and $\bar{X}_{IN} = 2.28$ respectively.

Viral isolation was attempted in vaccinated GN and SPF chickens before and after vaccination by inoculating tracheal swabs in 9 to 11 day-old embryonating chicken eggs. There was no isolation throughout the experiments. On the other hand, viral isolation in unvaccinated GN and SPF birds started at 72 h.a.i. with typical embryo lesions such as curling, stunting and mortality.

At necropsy no gross lesion was found in both groups of vaccinated birds. Unvaccinated GN chickens showed mild conjunctivitis, infra-orbitary sinus congestion

and tracheitis both presenting sero-mucous exudate. Non-vaccinated SPF birds showed the same lesions except for the exudate which was a yellowish mucopurulent one.



8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AITKEN, I.D. & B.D. SURVASHE Observations on the serological and dermal response to a single subcutaneous inoculation of inactivated Newcastle disease vaccine in mineral oil adjuvant. Avian Pathol., Cambridge, 3 : 211-22, 1974.
- BEAUDETTE, F.R. & C.B. HUDSON Cultivation of the virus of infectious bronchitis. J. Am. Vet. Med. Assoc., Schaumburg , 90(2):51-60, 1937.
- BERLIN, B.S. Gross physical properties of emulsified influenza virus vaccine and the adjuvant response. J. Immunol., Baltimore, 85(1): 81-9, 1960.

- BERRY, D.M. Inactivated infectious bronchitis vaccine
J. Comp. Pathol., London, 75(4): 409-15, 1965.
- BOX, P.G.; A.V. BEPESFORD; B. ROBERTS Protection of laying
 hens against infectious bronchitis with inactivated
 emulsion vaccines. Vet.Rec., London, 106: 264-8, 1980.
- BRADLEY, R.E.; H. BOTERO, J. JOHNSON; W.M. REID Techniques
 in parasitology. I. Gnotobiotic poultry in plastic film
 isolator and some applications to parasitological
 research. Exp. Parasitol., New York, 21(3): 403-13, 1967.
- BRASIL, Ministério da Agricultura. Departamento Nacional de
 Produção Animal. Divisão de Defesa Sanitária Animal. Por-
 taria nº 003, 13 de maio de 1977: Formação Grupo de Traba-
 lho Permanente a fim de estudar e propor medidas destina-
 das ao diagnóstico e profilaxia da Bronquite Infecciosa
 das Galinhas. In: HIPÓLITO, O. et alii. BRONQUITE INFECCIOSA DAS GALINHAS: a doença no Brasil. s.n.t., p. 62.
- BRASIL. Leis, decretos, etc. Portaria nº 24 - 17 de janeiro
 de 1980. Vacinas; aprova normas a serem observadas na
 produção, controle e emprego de vacina contra a bronquite
 infecciosa. São Paulo. Lex Editora. 1980. 6p.
- BROADFOOT, D.I. & W.M. SMITH Effects of infectious
 bronchitis virus in laying hens on egg production, percent
 unsettable eggs and hatchability. Poult. Sci., Menasha ,
33(3): 653-4, 1954.

- BRUGH, M.; H.D. STONE; H.W. LUPTON Comparison of inactivated Newcastle disease viral vaccines containing different emulsion adjuvants. Am.J.Vet.Res., Chicago, 44: 72-75, 1983.
- CESSI, D. & L. NARDELLI Vaccination against Newcastle disease: efficacy of an oil emulsion vaccine. Avian Pathol., Cambridge, 3(4): 247-53, 1974.
- CHRISTIAN, R.T. & W. MACK An experimental infectious bronchitis virus vaccine inactivated with Betapropiolactone. Poult. Sci. Menasha, 36(2): 1177-81, 1957.
- COATES, M.E.; H.A. GORDON; B.S. WOSTMANN eds. The germ-free animal in research, Academic Press, London, 1968 .
289 pp.
- CUMMING, R.B. Infectious virus avian nephrosis (uraemia) in Australia. Aust.Vet.J., Sidney, 39(4): 145-7, 1963 .
- CUNNINGHAM, C.H. Newcastle disease and infectious bronchitis neutralizing antibody indexes of normal chicken serum. Am. J. Vet. Res., Chicago, 12(43): 129-33, 1951 .
- DELAPLANE, J.P. & H.O. STUART Studies on infectious bronchitis. Bull. Rhode I. Agric. Exp. Sta., Providence, 273: 18-33, 1939.
- FIESER, L.F. & M. FIESER Reagents for organic synthesis. New York, John Wiley & Sons, 1967. 459 pp.

- FORBES, M. & J. T. PARK Growth of germ-free and conventional chicks: effect of diet, dietary penicillin and bacterial environment. J. Nut., Bethesda, 67: 69-84, 1959.
- FREUND, J.; J. K. THOMSON; H. B. HOUGH; H. E. SOMMER; T. M. PISANI Antibody formation and sensitization with the aid of adjuvants. J. Immunol., Baltimore, 60(3): 383 - 98, 1948.
- GALL, D. Observations on the properties of adjuvants. In: REGAMEY, R. H. et alii, eds. International symposium on adjuvants of immunity, Basel, S. Karger, 1967 (Symposia series in immunobiological standardization, 6) p. 39.
- GOUGH, R. E.; W. H. ALLAN; D. NEDELICIU Immune response to monovalent and bivalent Newcastle disease and infectious bronchitis inactivated vaccine. Avian Pathol., Cambridge, 6(2): 131-42, 1977.
- GOUGH, R. E. & D. J. ALEXANDER Comparison of duration of immunity in chickens infected with a live infectious bronchitis vaccine by three different routes. Res. Vet. Sci., London, 26(3): 329-32, 1979.
- HERBERT, W. J. Antigenicity of soluble protein in the presence of high levels of antibody: a possible mode of action of the antigen adjuvants. Nature, London, 210: (5037): 747-8, 1966.

- HERBERT, W. J. The mode of action of mineral-oil emulsion adjuvants on antibody production in mice. Immunol., London 14(3): 301-18, 1968.
- HERBERT, G.A. Ammonium sulphate fractionation of sera mouse, hamster, guinea pig, monkey, chimpanzee, swine chicken and cattle. Appl. Microbiol. Washington, 27(3) : 389-93, 1974.
- HERBERT, W.J. Mineral-oil adjuvants and the immunization of laboratory animal. In: WEIR, D.M., ed. Handbook of Experimental Immunology, 3ed., Oxford, Blackwell Scientific Publications, 1978, appendix 3.
- HEREDIA, S.A.M.; R.L. OLIVEIRA, Z.M.A. LOPES Ocorrência de anticorpos neutralizantes contra o vírus da bronquite infecciosa em aves procedentes dos plantéis de reprodução no Estado de MG. In: CONGRESSO MUNDIAL DE AVICULTURA, 16º; Rio de Janeiro, 1978, Anais, Rio de Janeiro, 1978. vol.3, p. 395-405.
- HILLEMAN, M.R. Considerations for safety and application of emulsified oil adjuvants to viral vaccines. In : REGAMEY, R.H. et alii, eds. International symposium on adjuvants of immunity, Basel, S. Karger, 1967 (symposia Series in immunobiological standardization, 6), p. 13-26.
- HIPÓLITO, O. Isolamento e identificação do vírus da bronquite infecciosa das galinhas no Brasil. Arq. Esc. Sup. Vet. UREMG, Belo Horizonte, 10: 131-50, 1957.

- HERBERT, W. J. The mode of action of mineral-oil emulsion adjuvants on antibody production in mice. Immunol., London 14(3): 301-18, 1968.
- HERBERT, G.A. Ammonium sulphate fractionation of sera mouse, hamster, guinea pig, monkey, chimpanzee, swine chicken and cattle. Appl. Microbiol. Washington, 27(3) : 389-93, 1974.
- HERBERT, W.J. Mineral-oil adjuvants and the immunization of laboratory animal. In: WEIR, D.M., ed. Handbook of Experimental Immunology, 3ed., Oxford, Blackwell Scientific Publications, 1978, appendix 3.
- HEREDIA, S.A.M.; R.L. OLIVEIRA, Z.M.A. LOPES Ocorrência de anticorpos neutralizantes contra o vírus da bronquite infecciosa em aves procedentes dos plantéis de reprodução no Estado de MG. In: CONGRESSO MUNDIAL DE AVICULTURA, 16º; Rio de Janeiro, 1978, Anais, Rio de Janeiro, 1978. vol.3, p. 395-405.
- HILLEMANN, M.R. Considerations for safety and application of emulsified oil adjuvants to viral vaccines. In : REGAMEY, R.H. et alii, eds. International symposium on adjuvants of immunity, Basel, S. Karger, 1967 (symposia Series in immunobiological standardization, 6), p. 13-26.
- HIPÓLITO, O. Isolamento e identificação do vírus da bronquite infecciosa das galinhas no Brasil. Arq. Esc. Sup. Vet. UREMG, Belo Horizonte, 10: 131-50, 1957.

- HIPÓLITO, O.; A.M. GODOY; H. MUTH Avian infectious bronchitis in Brazil. Arg. Esc. Vet. UFMG, Belo Horizonte, 13: 57 -9 , 1960/61.
- HIPÓLITO, O. & A.M. GODOY Estudos sobre a bronquite infecciosa no Brasil. II. Disseminação da doença em alguns Estados. Arg. Esc. Vet. UFMG, Belo Horizonte, 15: 323-6, 1963.
- HIPÓLITO, O.; J.A. BOTTINO; A.A. PINTO Estudo de duas amostras de vírus isoladas de casos de aves com a "Síndrome nefrite-nefrose". Ciênc. Cult., São Paulo, 25(6): 609, 1973.
- HITCHNER , S.B.; G.S. APPLETON; R.W. WINTERFIELD Evaluation of the immune response to infectious bronchitis virus . Avian Dis., College Station, 8: 153-62, 1964.
- HOFSTAD, M.S. A study of infectious bronchitis in chickens I. The pathology of infectious bronchitis. Cornell Vet., Ithaca, 35(1): 22-31, 1945.
- HOFSTAD, M.S. Antigenic differences among isolates of infectious bronchitis virus. Am.J.Vet.Res., Chicago , 36(4): 524-6, 1975.
- HOFSTAD, M.S. Avian infectious bronchitis. In: HOFSTAD , M.S.; B.W. CALNEK; C.F. HEMBOLDT; W.M. REID; H.W. YODER, eds. Diseases of Poultry, 7a. ed., Ames, Iowa State University Press, 1978. p. 487-503.

- HROTMATKA, L. & R.G. RAGGI Studies on Inactivated
infectious bronchitis vaccine. I. Response in White
Leghorn pullets. Avian Dis., College Station, 14 (3):
471-8, 1970.
- HSIUNG, H.M.; O. HIPÓLITO; E.N. SILVA Levantamento sorológico da bronquite infecciosa das galinhas. In: CONGRESSO MUNDIAL DE AVICULTURA, 169, Rio de Janeiro, 1978.
Anais. Rio de Janeiro, 1978. vol. 5, p. 707-12.
- JOHNSON, R.B. & W.W. MARQUARDT The neutralizing characteristics of strains of infectious bronchitis virus as measured by the constant-virus variable-serum methods in chicken tracheal cultures. Avian Dis., College Station, 19(1): 82-90, 1975.
- JONES, R.C. Nephrosis in laying chickens caused by Massachusetts type of infectious bronchitis virus.
Vet. Rec., London, 95(14): 319, 1974.
- LEVY, R. & Z. ZAKAY-RONES Immunization of chickens with an inactivated oil-adjuvant Newcastle disease virus vaccine. Avian Dis., College Station, 17(3): 598-604, 1973.
- LOHR, J.E. Infectious bronchitis agar-gel precipitin test. Use of infected allantoic fluid as antigen.
Avian Dis., College Station, 24(2): 463- 67, 1980 .

- MACDONALD, J.W. & D.A. MCMARTIN Observations on the effects of the H52 and H120 vaccine strains of infectious bronchitis virus in the domestic fowl. Avian Pathol., Cambridge, 5(3): 157-73, 1976.
- MATTEWS, R.E.F. Classification and nomenclature of viruses. Fourth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Intervirology, Basel, 17 (1/3): 1-200, 1982 .
- MCDUGALL, J.S. Avian infectious bronchitis: the protection afforded by an inactivated virus vaccine. Vet. Rec., London, 85: 378-81, 1969.
- MCKINNEY, R.W. & F.M. DAVENPORT Studies on the mechanism of action of emulsified vaccines. J. Immunology, Baltimore 86(1): 91-100, 1961.
- MCMARTIN, D.A. Preliminary investigation of methods for evaluating inactivated vaccines for infectious bronchitis virus. Brit. Vet.J., London, 124(1): 36-42, 1968.
- OMS .Organizacion Mundial de la Salud. Serie de Informes Tecnicos. N° 595. Coadyuvantes Immunologicos. Ginebra, 1976. pp. 5-42.
- PAGE, C.A. & C.H. CUNNINGHAM The neutralization test for infectious bronchitis virus. Am. J. Vet. Res., Chicago , 23(93):1065-71, 1962.

- PARISIS, E. The diagnosis of infectious bronchitis in fowls. II. Studies on the production of antigen for the gel precipitin test. Brit. Vet. J., London, 121(5): 234-9, 1965.
- PLEASANTS, J.R. Gnotobiotic. In: MELBY, E.C. & N.H. ALTMAN eds. Handbook of laboratory animal science, 2a. ed., Cleveland, CRC Pres, 1977, vol. 1, p. 119-174.
- PRINCE, R.P.; L.M. POTTER; R.E. LUGINBUHL; T. CHOMIAK Effect of ventilation rate on the performance of chicks inoculated with infectious bronchitis virus. Poult. Sci., Menasha, 41(1): 268-71, 1962.
- PURCELL, D.A. & J. B. MCFERRAN The histopathology of infectious bronchitis in the domestic fowl. Res. Vet. Sci., London, 13(92): 116-22, 1972.
- REED, L.J. & H.A. MÜNCHEN A simple method of estimating fifty per cent endpoints. Am. J. Hyg., Baltimore, 27(3) : 493-7, 1938.
- REINISCH, C.L.; N.A. GLEINER; S.F. SCHLOSSMAN Adjuvant regulation of T cell function. J. Immunology, Baltimore , 116(3): 710-15, 1976.
- RESENDE, J.S. Patogenia comparada de duas amostras brasileiras do vírus da Bronquite Infecciosa das Galinhas (BIG) em aves gnotobióticas (GN) e isentas de patógenos (SPF) . Belo Horizonte, 1983. 74 p. Tese de Mestrado.

- RIVENSON, S. Las vacunas oleosas en medicina veterinaria.
Revista de Medicina Veterinaria, Buenos Aires, 60 (1):
 22-38, 1979.
- ROWE, T.W.G. Machinery and methods in freeze-drying.
Cryobiology, New York, 8: 153-72, 1971.
- SEVOIAN, M. & P.P. LEVINE Effects of infectious bronchitis
 on the reproductive tract, egg production and egg quality
 of laying chickens. Avian Dis., College Station, 1 (2):
 136-64, 1957.
- SHARMA, J.M. & I. TIZARD Avian cellular immune effector
 mechanisms - A review. Avian Pathol., Cambridge, 13 :
 357-76, 1984.
- SILVA, J.M.L.; H.M. HSIUNG; A.J. CESAPO Aspectos clíni -
 cos e anátomo-patológicos da síndrome nefrite- nefrose
 (SNN) em frangos de corte. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE
 AVICULTURA, 6ª, BELO HORIZONTE, 1979. Anais. Belo Hori -
 zonte, 1979, v.3., p. 414-22.
- SPRINGER, W.T.; C. LUSKUS, S.S. POURCIAU Infectious
 bronchitis and mixed infections of Mycoplasma synoviae
 and Escherichia coli in gnotobiotic chickens.
 I. Sinergistic role in the airsacculitis syndrome.
Infect. Immun., Washington, 10(3): 578-89, 1974.
- SNEDECOR, G.W. & W. G. COCHRAN Statistical Methods .
 6a.ed., Ames, Iowa State University Press, 1967. 5931 pp.

- STONE, H.D.; M. BRUGH; S.R. HOPKINS; H.W. YODER; C. W. BEARD
Preparation of inactivated oil-emulsion vaccines with
avian viral or Mycoplasma antigens. Avian Dis., College
Station, 22(4): 666-74, 1978.
- STONE, H.D.; M. BRUGH; G.A. ERICKSON; C.W. BEARD Evaluation
of inactivated Newcastle disease oil-emulsion vaccines .
Avian Dis., College Station, 24: 99-111, 1980.
- STONE, H.D.; M. BRUGH; C.W. BEARD Comparison of three
experimental inactivated oil-emulsion Newcastle disease
vaccines. Avian Dis., College Station, 25:1070-6, 1981.
- STONE, H.D.; M. BRUGH; C.W. BEARD Influence of formulation
on the efficacy of experimental oil-emulsion Newcastle
disease vaccines. Avian Dis., College Station, 27(3):688-97, 1983 .
- TALMAGE, D.W. & F.J. DIXON The influence of adjuvants
on the elimination of soluble protein antigens and the
associated antibody responses. J. Inf. Dis., Chicago, 93(2):
176-80, 1953.
- WEBSTER, R.G.; M. MORITA; C. PRIDGEN & B. TUMOVA Ortho
and Paramyxoviruses from migratory feral ducks.
J. Gen. Virol., London, 32: 217-25, 1976.
- WINTERFIELD, R.W. & S.B. HITCHER Etiology of an infectious
nephritis-nephrosis syndrome of chickens.
Am. J. Vet. Res., Chicago, 23 (97): 1273-9, 1962.

WINTERFIELD, R.W. Immunity response from an inactivated infectious bronchitis vaccine. Avian Dis., College Station, 11(3): 446-51, 1967.

WINTERFIELD, R.W. Respiratory signs, immunity response and interference from vaccination with monovalent and multivalent infectious bronchitis vaccines. Avian Dis., College Station, 12(4): 577-84, 1968.