

PROTEÇÃO VACINAL CONTRA BRONQUITE - ENSAIOS *IN VIVO*

Iara Maria Trevisol

Pesquisadora – área de virologia das aves
Embrapa Suínos e Aves – CNPSA, Concórdia, SC
iara@cnpssa.embrapa.br

A bronquite infecciosa das galinhas (BI) é uma doença viral respiratória aguda, disseminada no mundo todo. É uma doença altamente contagiosa, com sinais clínicos de espirros, ronqueira e estertores traqueais. Os sintomas diminuem o desempenho das aves, com perda de peso e refugagem. As complicações com infecções bacterianas secundárias causam grandes perdas econômicas por condenação de carcaças principalmente por aerossaculite (Cavanagh e Naqi, 2003). O vírus da bronquite infecciosa das aves (VBI) replica também no oviduto e em aves em produção causa perdas de 10 a 50% na produção de ovos, causando ainda alterações da qualidade da casca e consequentes deformações nos ovos. Frequentemente a produção de ovos não retorna aos níveis normais (Cavanagh e Naqi, 2003).

O VBI é membro da família *Coronaviridae* que agrupa os gêneros *Coronavírus* e *Torovírus*. Três grupos compõem o gênero *Coronavírus*, 2 grupos de vírus de mamíferos e o grupo 3, no qual o VBI está inserido. No gênero *Torovírus* não foram descritos até o momento, nenhum vírus aviário (Cavanagh e Naqi, 2003). O VBI é um vírus envelopado, que contém um genoma de RNA não segmentado de 27,6 Kb, que codifica 3 proteínas estruturais: M, S e N. A glicoproteína S (“spike protein”) contém 1.160 aminoácidos e é clivada em duas subunidades, S1 e S2, das quais S2 é mais conservada em sua sequência de aminoácidos. S1 é a principal proteína viral indutora de respostas imunes mediadas por anticorpos neutralizantes (Cavanagh e Naqi, 2003), tendo assim um importante papel na indução de proteção vacinal contra a doença. Porém, a S1 apresenta um alto grau de variabilidade e é este grau de variabilidade antigênica que determina se o vírus constitui ou não um sorotipo diferente. A alta variabilidade de S1 decorre de mutações frequentes, comuns aos vírus cujo genoma contém RNA. Nesta a enzima RNA polimerase é muito mais sujeita a introduzir erros de cópia no processo de replicação do genoma, resultando com maior frequência em mutações pontuais nas sequências de seus genes. Além das mutações, já foi demonstrada também a ocorrência do processo de recombinação no genoma do VBI, surgindo novos vírus por recombinação entre os genomas de diferentes vírus circulantes em um mesmo hospedeiro. As próprias amostras vacinais vivas atenuadas podem recombinar com cepas de campo circulantes, podendo resultar em novos vírus (Wang, *et al.*, 1993 e Jia, *et al.*, 1995), razão pela qual a introdução de novos sorotipos vacinais tem sido evitada e encarada com muito critério quanto ao custo benefício inerente aos riscos de surgimento de novos vírus. Por esta razão, as alternativas de controle de surtos de BI ainda são: 1) o uso de vacinas do sorotipo Massachusetts atenuadas por passagens em ovos embrionados, tais como H120, H52, que possuem relativo espectro de proteção cruzada contra alguns sorotipos do vírus; 2) cuidados essenciais de manipulação das

vacinas; 3) estratégias de revacinação de reforço para tentar atingir uma resposta imune mais eficiente; 4) bom manejo.

Segundo Cavanagh et al. (1992), há evidências de uma considerável proteção cruzada mesmo entre diferentes sorotipos do vírus, uma vez que as alterações por mutações e recombinações nem sempre são significativas, não resultando na necessidade de novas amostras vacinais contra estas "variantes". Portanto, para configurar situações de falhas vacinais, os testes de proteção vacinal *in vivo* tornam-se tão ou mais relevantes do que apenas a caracterização sorológica ou molecular do vírus (Cook, 1997).

A comprovada ocorrência de proteção cruzada entre diferentes sorotipos do VBI suporta a observação de que muitas vezes um efetivo controle da doença deve levar em conta antes de tudo cuidados básicos e práticas corretas no uso e manipulação de vacinas (Cook, 1997; Cavanagh, et al., 1997), especialmente a adequada refrigeração e uso de doses completas recomendadas pelo fabricante. Entende-se assim que nem toda variante do VBI estará necessariamente associada a total falha de proteção vacinal, podendo-se considerar com mais precisão o conceito de "protectotipos" sugerido por Cook (1997), onde a capacidade de diferentes amostras do VBI circulantes à campo induzirem ou não proteção cruzada é utilizada para classificar as amostras como variantes ou não.

Por muitos anos a técnica de soroneutralização cruzada (Cowen e Hitchner, 1975; Hofstadt, 1981; Johnson e Marquadt, 1975; Cook, 1997) foi utilizada como meio de definir a relação antigênica entre vacinais e amostras isoladas de campo, de modo a prever e avaliar a capacidade de vacinas em conferir proteção. Os vírus que não produzem reações recíprocas de títulos neutralizantes são considerados diferentes sorotipos. Hoje, utilizam-se técnicas de diagnóstico e análise molecular, que são muito mais rápidas que as provas de soroneutralização cruzada e não requerem reagentes específicos de referência tais como soros hiperimunes e manipulação de cepas virais de referência para caracterização de novos isolados de VBI suspeitos de variantes. O isolamento viral clássico, utilizando ovos embrionados SPF ("Specific Pathogen Free") ou culturas celulares primárias de rim de pinto (Gelb, 1989), permite disponibilidade de vírus para caracterização do sorotipo viral e testes de proteção vacinal. A desvantagem do isolamento viral é a demora quando comparada a outros métodos mais rápidos como RT-PCR diretamente em suabe de traquéia ou tecidos. A técnica de RT-PCR aliada a análise de restrição do gene da proteína S1 é mais rápida para o diagnóstico e permite ao mesmo tempo determinar variações a nível molecular entre diferentes amostras isoladas do VBI. A observação de uma correlação direta entre os resultados da análise de restrição com os resultados de testes de neutralização cruzada faz com que este diagnóstico molecular se constitua em ferramenta ágil e aplicável ao diagnóstico e epidemiologia de diferentes sorotipos ou variantes do IBV (Kwon et al., 1993; Lin et al., 1991).

Paralelo aos avanços na utilização da biologia molecular no estudo da BI das aves, novas amostras do vírus estão continuamente sendo detectados. Em 1991, na Inglaterra, começou a ser relatado em galinhas em produção vacinadas, sinais de doença com características incomuns a bronquite infecciosa. Estes surtos foram associados com um novo tipo de vírus, completamente diferente das amostras de VBI já descritas. O novo vírus foi denominado 793B por Gough et al., 1992 e amostra 4/91 por Parsons et al., também em 1992. A doença relatada, apresentava mortalidade elevada e uma miopatia do músculo peitoral profundo (Gough et al., 1992 e Parsons et al., 1992 apud Cook, 1996). Entre 1990 e 1992 na região de

Delmarva surtos de doença respiratória em galinhas foram causadas por um vírus ainda não descrito nos Estados Unidos. Esta amostra foi denominada DE072 e logo após, foi relacionada à amostra vacinal holandesa D1466. Os surtos foram controlados com uma vacina viva atenuada contendo a DE072 até 1996, quando novos relatos surgiram.

Na China em 1996, surtos apresentando edema e úlceras hemorrágicas no pró-ventrículo e mortalidade de 15 a 89% das aves, caracterizou o envolvimento da amostra de VBI denominada “tipo pró-ventricular”. Ainda na China em 1998, pintinhos adoeceram com aparente depressão, os olhos inchados, lacrimejamento e diarreia, seguidos de sinais respiratórios. A morbidade foi de 100% e a mortalidade de 20%. Os exames pós morte mostraram intensa inflamação no pró-ventrículo, e um único agente foi isolado e denominado VBI amostra QX.

Quadros de nefrite e falsas poedeiras também estão sendo associadas a amostra QX na Holanda, na Bélgica, Alemanha e França desde 2004. Em 2008 a Inglaterra também relatou o isolamento da amostra QX.

No Brasil a presença de amostras “variantes” do VBI também ocorre. Desde 1973 e 1979 ficou comprovada a presença de amostras nefropatogênicas (Lamas et al, 1979 e July e Hipólito, 1973, *apud* Silva 2010). A partir destes estudos pioneiros, a necessidade de utilizar uma vacina para BI ficou comprovada e foi aprovada em 1978. A utilização da vacina sempre apresentou resultados satisfatórios e ainda hoje, esse fato precisa ser considerado com cuidado.

A presença do sorotipo Arkansas foi descrita em 1985 por Brandem. Em 1987 por Di Fabio e em 1992 por Wentz, amostras com baixa relação antigênica com a amostra Massachusetts forma isoladas no país. Porém, são ainda muito escassos os estudos de variantes no Brasil que comprovem a baixa relação antigênica com a vacina disponível. Um dos dados científicos mais recentes é de 2000, onde Di Fábio e colaboradores, pesquisaram amostras de VBI em frangos e poedeiras e encontraram pelo menos cinco diferentes sorotipos. Em 2006, novas amostras variantes foram descritas causando surtos da doença em frangos de corte e poedeiras no estado de Minas Gerais, e em 2007 as variantes aparecem associadas a casos de enterite e infertilidade de machos (Trevisol e Jaenisch, 2010).

A partir de 2003/2004, lesões atípicas de degeneração e necrose da musculatura peitoral superficial e profunda foram também relatadas. Nestes casos, algumas amostras de vírus têm sido isoladas e sequenciadas, demonstrando novas amostras de BI, distintos do sorotipo vacinal Massachusetts (Brentano et al, 2005). Uma destas amostras foi avaliada frente a uma amostra vacinal Massachusetts disponíveis no Brasil com dois programas de vacinação: uma dose e duas doses de vacina H120. Os resultados sugeriram que não houve completa proteção cruzada entre a amostra de desafio e a amostra de vacinal (Trevisol et al, 2006). Porém ainda falta conhecer melhor essas amostras envolvidas com lesões na musculatura peitoral, uma vez que testes de inoculações experimentais com altas doses da amostra isolada de um desses casos não foi capaz de reproduzir as lesões, embora a doença respiratória, foi visível (Brentano et al, 2005). A deposição de imunocomplexos nas paredes capilares dos músculos foi também relacionada a uma causa da possível miopatia. Novos testes de proteção cruzada realizados em 2009 com amostras consideradas “variantes” do ponto de vista da biologia molecular, mostraram que aves SPF vacinadas com duas doses de H120, apresentaram proteção para as duas variantes analisada, sendo que uma delas mostrou-se

altamente patogênica quando os tecidos das aves desafiadas e não vacinadas foram analisados (Trevisol et al, 2010).

O Brasil tem controlado a bronquite infecciosa das galinhas (BIG) com vacinação desde 1979, quando a primeira vacina foi licenciada (Silva, 2010). Falhas de proteção tem sido relatadas e a ocorrência de manifestações clínicas diversas, são associadas as variações do vírus e o surgimento de amostras variantes (Back, 2009)). Especula-se que essas variantes resultam em proteção cruzada “pobre” frente a amostra vacinal disponível. A identificação de variantes e a avaliação frente a vacina viva, busca auxiliar o entendimento desses casos clínicos e a adequação dos procedimentos de controle. Mas, para determinar a eficácia de uma vacina viva, são necessárias instalações específicas, pessoal qualificado, tempo e um método confiável e exequível. Há muito descrito na literatura, mas a experiência da Embrapa tem mostrado a dificuldade em manter padrões de leitura e interpretação para o principal índice de validação de uma vacina viva para BIG. Este índice é o percentual de proteção indicado pela atividade ciliar em anéis de traquéias. Essas traquéias são colhidas de aves vacinadas e desafiadas. Desde os primeiros estudos da Embrapa com testes de desafio *in vivo*, esse parâmetro tem sido avaliado e a partir das dificuldades encontradas, vimos trabalhando para adequar este sistema, para termos uma avaliação mais facilmente executável e menos subjetiva. A padronização de um escore de leitura com critérios específicos e exemplos gravados em vídeo tem facilitado muito a interpretação do ensaio, aumentando a confiabilidade e a reprodutibilidade (Trevisol et al 2011, no prelo).

A consolidação da metodologia de ensaios de proteção *in vivo* esta acontecendo paralelamente a implementação de um teste molecular quantitativo que complementar as leituras das traquéias. Além disso, estudos com marcadores moleculares de indução de resposta imune e um melhor entendimento dos mecanismos de ciliostase, estão também sendo investigados. Esses parâmetros, medidos por PCR em tempo real e as análises histopatológicas correspondentes, certamente darão maior robustez as nossos ensaio *in vivo*, e portanto, uma melhor resposta a respeito da eficácia da vacina sorotipo Massachusetts H120 frente as variantes brasileiras.

Bibliografia

- BACK, A. 21º Congresso Brasileiro de Avicultura - Anais, 2009, Porto Alegre, RS; 211-215.
- BRENTANO, L. et al. Revista Brasileira de Ciência avícola, suplemento 7; pg 232; 2005.
- CAVANAGH, D., DAVIS, P.J., COOK, J.K.A. LI, D., KANT, A. E KOCH, G. (1992) Location of the amino acid differences in the S1 spike glycoprotein subunit of closely related serotypes of infectious bronchitis virus. *Avian Pathology*. 21: 33-43.
- CAVANAGH, D., ELLIS, M.M. E COOK, J.K.A. (1997) Relationship between sequence variation in the S1 spike protein of infectious bronchitis virus and the extent of cross protection *in vivo*. *Avian Pathology*. 26: 63-74.

CAVANAGH, D. and S. NAQI. 2003. Infectious bronchitis. In A. M. FADLY, H. J. BARNES, J.R. GLISSON, L. R. MCDUGALD, D.E. SWAYNE and Y. M. SAIF (eds.). *Diseases of Poultry*. 11th Ed. Iowa State University Press: Ames, IA, 101—120.

COOK, J.K.A., ORBELL, S.J., WOODS, M.A., HUGGINS, M.B. (1996). A survey of the presence of a new infectious bronchitis virus designated 4/91. *Veterinary Record*. 138: 178-180.

COOK, J. (1997) Bronquite infecciosa aviária: situação mundial e distribuição de sorotipos. Anais, pg 13-27. Simpósio Sobre Sanidade Avícola, FACTA (Fundação Apinco de Ciência e Tecnologia Avícola), pg 13-27. Maio 97, São Paulo - SP.

COWEN, B.S., HITCHNER, S.B. (1975) Serotyping of avian infectious bronchitis virus by the virus neutralization test. *Avian Disease*. 19: 583-595.

GELB, J. JR. (1989) Infectious bronchitis. Em: A laboratory manual for the isolation and identification of avian pathogens. 3^o Ed. American Association of avian pathologists. Edit: Purchase, H.G, Arp, L.H., Domermuth, C.H. e Pearson, J.E. Kendal Hunt Publishing Company. Dubuque, Iowa, USA.

HOFSTADT, M.S. (1981) Cross immunity in chickens using seven isolates of avian infectious bronchitis virus. *Avian Disease*. 25: 650-654.

JIA, W., KARACA, K., PARRISH, C.R., NAQI, S.A. (1995) A novel variant of avian infectious bronchitis virus resulting from recombination among three different strains. *Archives of Virology*, 140, 259-71.

JOHNSON, B.B., MARQUADT, W.W. (1975) The neutralizing characteristics of strains of infectious bronchitis virus as measured by the constant-virus variable-serum method in chicken tracheal cultures. *Avian Disease*. 19: 82-90.

KWON, H.M., JACKWOOD, M.W., GELB JR., J. (1993) Differentiation of infectious bronchitis virus serotypes using polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism analysis. *Avian Disease*. 37: 124-202.

LIN, Z., KATO, A, KUDOU, Y. E UEDA, S. (1991) A new typing method for the avian infectious bronchitis virus using polymerase chain reaction and restriction enzyme fragment length polymorphism. *Arch. Virol*. 116: 19-31.

SILVA, EN. *Revista Brasileira de Ciência Avícola* 2010, v.12, n.3, 197-203.

TREVISOL, I.M. et al. *Revista Brasileira de Ciência avícola*, suplemento 8; pg 240; 2006.

TREVISOL, I.M. et al. *Trabalhos de Pesquisa José Maria Lamas da Silva* . SA052 – CD-Room – Conferência Facta 2010, Santos, SP.

TREVISOL, I.M. et al. Trabalhos de Pesquisa José Maria Lamas da Silva. Conferência Facta 2011, Santos, SP (no prelo).

TREVISOL, I.M. & JAENISCH, F.R.F. Bronquite Infecciosa das galinhas: crise atual. Avicultura Industrial, v.101, n.1187, p.14-18 e 20; 2010.et al.

WANG, C.H., HSIEH, M.C. E CHANG, P.C. (1993) Isolation, pathogenicity and H120 protection efficacy of infectious bronchitis virus isolated in Taiwan. AVIAN Dis. 40: 620-625.