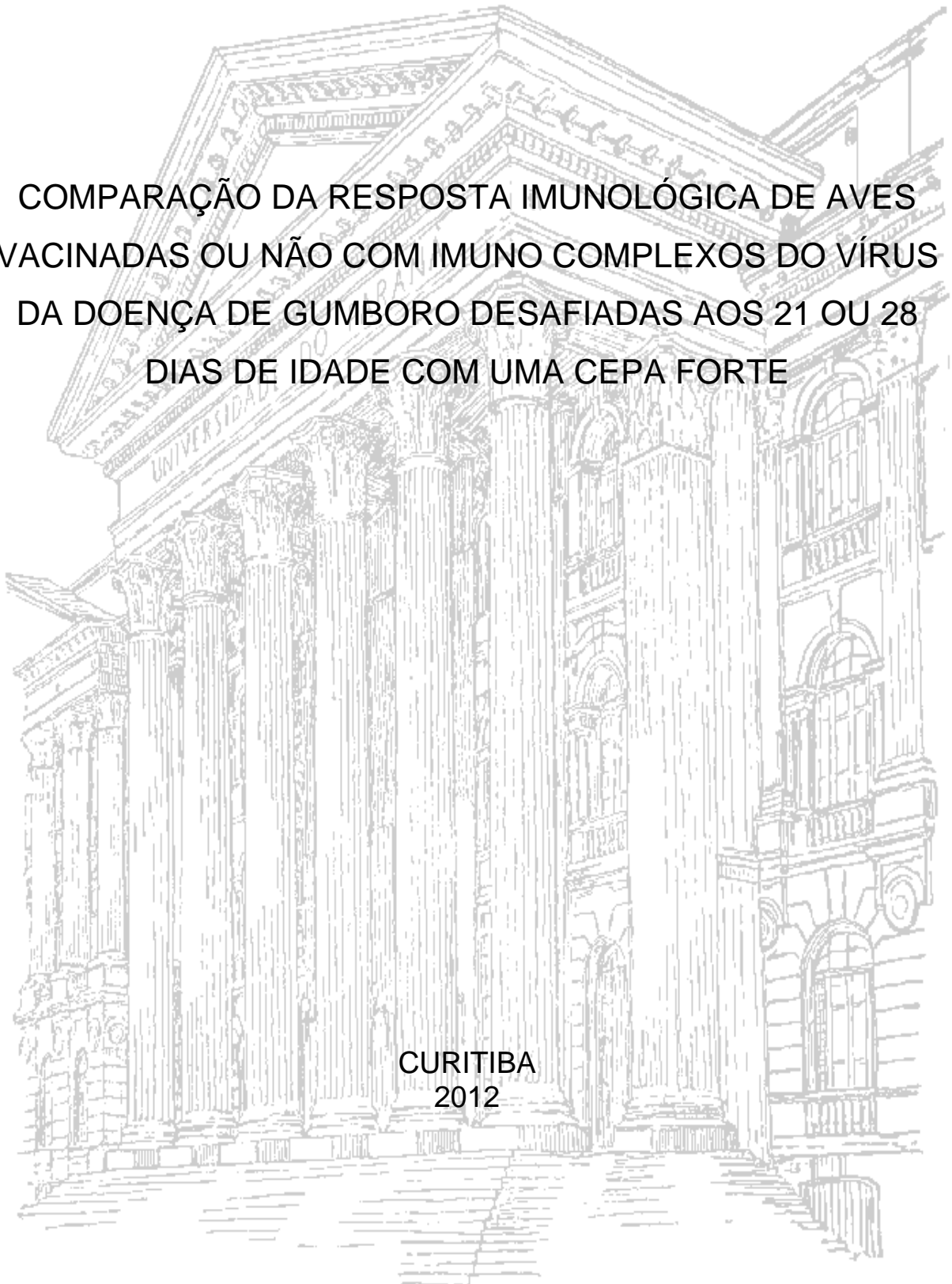


PATRICK WESTPHAL FERREIRA

COMPARAÇÃO DA RESPOSTA IMUNOLÓGICA DE AVES  
VACINADAS OU NÃO COM IMUNO COMPLEXOS DO VÍRUS  
DA DOENÇA DE GUMBORO DESAFIADAS AOS 21 OU 28  
DIAS DE IDADE COM UMA CEPA FORTE

CURITIBA  
2012



PATRICK WESTPHAL FERREIRA

COMPARAÇÃO DA RESPOSTA IMUNOLÓGICA DE AVES  
VACINADAS OU NÃO COM IMUNO COMPLEXOS DO VÍRUS  
DA DOENÇA GUMBORO DESAFIADAS AOS 21 OU 28 DIAS  
DE IDADE COM UMA CEPA FORTE

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Ciências Veterinárias, Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Área de Concentração: Nutrição e Alimentação Animal, Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná.

Orientação: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Elizabeth Santin

CURITIBA  
2012


## PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS




### PARECER

A Comissão Examinadora da Defesa da Dissertação intitulada “COMPARAÇÃO DA RESPOSTA IMUNOLÓGICA DE AVES VACINADAS OU NÃO COM IMUNO COMPLEXOS DO VÍRUS DA DOENÇA DE GUMBORO DESAFIADAS AOS 21 OU 28 DIAS DE IDADE COM UMA CEPA FORTE” apresentada pelo Mestrando PATRICK WESTPHAL FERREIRA declara ante os méritos demonstrados pelo Candidato, e de acordo com o Art. 79 da Resolução nº 65/09–CEPE/UFPR, que considerou o candidato João para receber o Título de Mestre em Ciências Veterinárias, na Área de Concentração em Ciências Veterinárias.

Curitiba, 25 de fevereiro de 2013.

  
Professora Dr.<sup>a</sup> Elizabeth Santin  
Presidente/Orientadora

  
Professor Dr. Luiz Felipe Caron  
Membro

  
Dr. Mário Sergio Assayag  
Membro

*À minha família, em especial à minha mãe por ter compreendido meus motivos e lutado comigo essa batalha a cada dia. Aos grandes amigos, que sempre estiveram ao meu lado. Dedico.*

## AGRADECIMENTOS

A Deus acima de tudo por ter me permitido participar de mais esse processo de aprendizado, por ter me dado calma e paz nas atribuições.

À minha família, pelo apoio incondicional durante todas as minhas escolhas, por terem auxiliado na formação do meu caráter, e pelo amor dispendido comigo todos esses anos.

À Universidade Federal do Paraná, principalmente aos profissionais dos *campi* Palotina e Curitiba por terem me acolhido e terem feito parte da minha história, minha formação e da minha profissão.

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Elizabeth Santin, pela amizade, pela paciência, pela orientação, pelos conselhos, pelo aprendizado acima de tudo, o meu muito obrigado.

Aos amigos do LABMOR, em especial a Maristela Toledo, Mariana C. Lourenço, Leandro Kuritza, Leonardo Miglino e Larissa Pickler pelo auxílio durante o meu experimento, pelo apoio nos momentos bons e ruins, pelas brincadeiras, por tornarem o meu ambiente de trabalho o mais feliz possível. Aos estagiários e todos que me auxiliaram de alguma forma na realização deste projeto.

Aos colegas e amigos da Pós Graduação, Alexandre, Antônio, Carol Zanatta, Carlos Oliveira, Dany, Eduardo, Flávia, Giovanna, Humberto, Ivânio, Rafaela, Sâmara, Thiago e todos os outros que de alguma forma me auxiliaram a concluir mais essa etapa.

Ao professor Luiz Felipe Caron, pela orientação, pelo auxílio e pela motivação.

Aos meus amigos que sempre estiveram comigo em todas as situações, e me motivaram a seguir em frente, agradeço sempre por ter conhecido vocês.

A CAPES e ao programa REUNI, pela concessão de bolsas durante a realização do mestrado.

Às empresas CEVA Saúde Animal LTDA pelo fornecimento da vacina utilizada no experimento e a empresa AGROGEN pelos animais utilizados no experimento.

A todos que permaneceram ao meu lado e de alguma forma me auxiliaram na conclusão de mais essa etapa.

A vocês o meu muito obrigado!

## SUMÁRIO

<b>Lista de Tabelas.....</b>	<b>viii</b>
<b>Lista de Figuras .....</b>	<b>ix</b>
<b>Resumo .....</b>	<b>x</b>
<b>Abstract.....</b>	<b>xi</b>
<b>Introdução Geral.....</b>	<b>12</b>

### **Capítulo 1 - Doença de Gumboro, Respostas Imunológicas e Tecnologias Atuais em Vacinas: Uma Revisão .....**

<b>Resumo .....</b>	<b>20</b>
<b>Abstract .....</b>	<b>21</b>
<b>Introdução.....</b>	<b>22</b>
<b>Doença de Gumboro .....</b>	<b>25</b>
<b>Variantes do IBDV .....</b>	<b>27</b>
<b>Patogenia .....</b>	<b>29</b>
<b>O IBDV e Resposta Imunológica.....</b>	<b>32</b>
<b>Vacinas.....</b>	<b>36</b>
<b>Vacinas Compostas por Imuno Complexos.....</b>	<b>40</b>
<b>Vacinas Recombinantes .....</b>	<b>42</b>
<b>Considerações Finais .....</b>	<b>43</b>
<b>Referências Bibliográficas .....</b>	<b>45</b>

### **Capítulo 2 - Comparação da Resposta Imunológica de Aves Vacinadas ou não com Imuno Complexos do Vírus da Doença Infecciosa da Bolsa Cloacal desafiadas aos 21 ou 28 dias de Idade com uma Cepa Forte.....**

<b>Resumo .....</b>	<b>53</b>
<b>Abstract .....</b>	<b>54</b>

Introdução.....	55
Material e Métodos .....	57
Animais e Ambiente .....	57
Vacinação e Desafio .....	58
Avaliação Clínica e Macroscópica .....	59
Histologia .....	60
Controle Negativo (B0).....	60
Imunoistoquímica .....	62
Citometria de Fluxo .....	64
Análise Estatística .....	64
Resultados.....	65
Escores de Lesão Histológica e Infiltração de Linfócitos T CD3+ em BC .....	65
Desafio 21 dias x 28 dias .....	67
Não vacinados x Vacinados .....	68
Citometria de Fluxo .....	70
Discussão .....	72
Desafio 21 dias x 28 dias .....	73
Não vacinados x Vacinados .....	76
Conclusão.....	79
Referências Bibliográficas .....	80
Considerações Finais .....	84

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Descrição do delineamento experimental e tratamentos.....	58
<b>Tabela 2.</b> Classificação do grau de severidade das lesões macroscópicas avaliadas. .....	60
<b>Tabela 3.</b> Classificação dos escores de lesão <i>versus</i> grau de severidade das lesões avaliadas em bolsa cloacal na histopatologia.....	62
<b>Tabela 4.</b> Média e desvio padrão dos escores de lesão em bolsa cloacal analisadas na histopatologia multiplicado por grau de severidade (GSDG) comparando o desafio aos 21 dias com o desafio aos 28 dias, entre aves vacinadas e não vacinadas, avaliados aos 35 dias de idade das aves. ....	66
<b>Tabela 5.</b> Comparação entre aves desafiadas aos 21 ou 28 dias para resultados de necropsia, área e histologia de bolsa cloacal, contagem de linfócitos T CD3+ na bolsa e linfócitos B, CD4+ e CD8+ no baço.....	68
<b>Tabela 6.</b> Comparação entre aves desafiadas não vacinadas <i>versus</i> vacinadas com ICs para resultados de necropsia, área e histologia de bolsa cloacal, contagem de linfócitos T CD3+ na bolsa e linfócitos B, CD4+ e CD8+ no baço. ....	69
<b>Tabela 7.</b> Médias e desvio padrão das porcentagens celulares identificadas no soro das aves nas diferentes coletas (1º dia de vida, 3 dias antes do desafio e 7 dias pós desafio) analisadas na citometria de fluxo.....	71

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Avaliação de escore de folículo de bolsa cloacal considerando regiões com vacuolização celular (seta preta) e substituição de tecido íntegro por tecido conjuntivo (seta vermelha). Galinha, bolsa cloacal, HE, aumento de 10x. .... 61
- Figura 2.** Exemplo de mensuração de área<sup>2</sup> de linfócitos T CD8+ em baço. Foram avaliados 15 campos microscópicos e as subáreas calculadas pelo software foram somadas para obtenção da área total de linfócitos ocupada em um campo 24.100µm<sup>2</sup>. Galinha, baço, Imunoistoquímica, aumento de 40x..... 64
- Figura 3.** Avaliação dos Escores de bolsa cloacal da Histopatologia. B0: Aves não vacinadas e não desafiadas – sem alterações no tecido bursal, folículos íntegros sem sinal de degeneração celular; B1: sem vacinação e desafio aos 21 dias; B2: vacinação CEVAC® Transmune IBD (SC) e desafio aos 21 dias; B3: sem vacinação e desafio aos 28 dias e B4: vacinação CEVAC® Transmune IBD (SC) e desafio aos 28 dias – tecido bursal apresentando diversos graus de atrofia de folículos, vacuolização, degeneração folicular e substituição de tecido íntegro por tecido conjuntivo. Galinha, bolsa cloacal, HE, aumento de 4x..... 66
- Figura 4.** Distribuição de Linfócitos T CD3+ em bolsa cloacal aos 35 dias nos diferentes tratamentos. B0 – Aves não vacinadas e não desafiadas – pouca infiltração de células T CD3+ em BC;..... 67
- Figura 5.** Porcentagem de área de baço ocupada pelas células T CD4+, CD8+ e Linfócitos B, levando em conta os dois períodos de desafio e aves não vacinadas (N/V) e vacinadas (V) com imuno complexos (ICs). As letras A e B dentro das colunas referem-se à diferença estatística pelo teste do Kruskal-Wallis ( $P < 0,05$ ) entre grupos avaliados. .... 69
- Figura 6.** Comportamento dos linfócitos T CD4 de mucosa e T CD8 ativados circulantes de aves desafiadas aos 21 ou aos 28 dias, ao longo das coletas realizadas 3 dias antes do desafio (3d AD) e 7 dias pós-desafio (7d PD)..... 72

## RESUMO

A doença de Gumboro é uma das principais doenças imunossupressoras em frangos de corte, sua presença em plantéis avícolas é responsável por perdas econômicas relacionadas à imunossupressão, baixo desempenho e mortalidade. Os programas de vacinação utilizados para auxílio no controle da doença podem mudar de região para região, alternando-se na utilização de cepas suaves e intermediárias, conforme desafio de campo. As vacinas fortes que utilizam cepas muito virulentas em geral são responsáveis por causar efeitos deletérios principalmente em bolsa cloacal (BC), gerando algum grau de imunossupressão. Tecnologias atuais em vacinas visam reduzir estes efeitos e acelerar etapas para que a resposta imune contra a doença seja mais rápida, dinâmica e efetiva. As vacinas recombinantes e as compostas por imuno complexos (ICs) são duas opções utilizadas no mercado com este objetivo. A presente dissertação busca comparar diferentes períodos de desafio com uma cepa vacinal forte de IBDV (*Infectious Bursal Disease Virus*) na resposta imune de frangos de corte, vacinados ou não com ICs. Para isso essa dissertação foi dividida em dois capítulos sendo o Capítulo I, uma revisão bibliográfica intitulada “*Doença de Gumboro, Respostas Imunológicas e Tecnologias Atuais em Vacinas: Uma Revisão*”, que traz informações relacionadas à Doença de Gumboro e as principais alternativas de vacinação utilizadas na prática de acordo com a literatura. E o Capítulo II, um trabalho experimental intitulado “*Comparação da Resposta Imunológica de Aves Vacinadas ou Não com Imuno Complexos do Vírus da Doença de Gumboro, Desafiadas aos 21 ou 28 dias de Idade com uma Cepa Forte*”, realizada com objetivo de avaliar se diferentes períodos de desafio afetam de forma diferente a resposta imunológica de aves vacinadas ou não com ICs. Os resultados obtidos demonstraram que aves desafiadas aos 21 dias apresentaram maior quantidade de células T CD4 de mucosa no sangue que aves desafiadas aos 28 dias, menor quantidade de células T CD4+ no baço e menor tamanho de BC aos 35 dias de vida. Em ambos períodos de desafio, aves vacinadas apresentaram menor infiltração de células T CD8+ no baço e aves vacinadas desafiadas aos 21 dias apresentaram menor porcentagem de células T CD4 de mucosa no sangue. Mostrando que o período de contato das aves com o vírus pode interferir na resposta imunológica, tanto em aves vacinadas quando não vacinadas com ICs.

**Palavras-Chave:** vacina, linfócito T, doença de Gumboro, imuno complexos.

## ABSTRACT

The Gumboro disease is one of the main immunosuppressive diseases in broiler chickens, its presence in poultry production is responsible for economic losses related to immunosuppression, poor performance and mortality. The vaccination programs used to aid in disease control may change from region to region, and can switch on the use of mild and intermediate strains, according as the field challenge. Hot or strong vaccines using very virulent strains samples in general are responsible for causing harmful effects mainly in cloacal bursa, causing some degree of immunosuppression. Current vaccine technologies aim to reduce these effects and shorten some steps so that the immune response can act more quickly and in a dynamic and effective way against the disease. Recombinant and immune complexes vaccines are two options used for this purpose. This dissertation aims to compare different periods of challenge with a strong vaccine strain of IBDV (Infectious Bursal Disease Virus) in the immune system of broilers vaccinated or not with immune complexes.. It is divided into two chapters, the Chapter I, a literature review entitled "*Gumboro Disease, Immune Response and Actual Vaccine Technology: A Review*," which provides information related to Gumboro Disease and the main alternative vaccination used in practice according to literature. And Chapter II, an experimental study entitled "*Comparison of Immune Response of Birds Vaccinated or Not with Immune Complexes of Gumboro Disease Virus, Challenged at 21 or 28 days of age with a strong strain*" performed to evaluate whether different periods of challenge differently affect the immune response of birds vaccinated or not with ICs. The results showed that birds challenged at 21 days showed a higher percentage of mucosal T CD4 cells in blood than birds challenged at 28 days, fewer T CD4+ cells in the spleen and smaller size of cloacal bursa in birds evaluated at 35 days of life. In both periods of challenge, vaccinated birds showed less infiltration of T CD8+ cells in the spleen and birds vaccinated and challenged at 21 days showed a lower percentage of mucosal T CD4 cells in the blood stream. These results show that the period of contact of the birds with the virus may interfere with the immune response, in both groups vaccinated with immune complexes and unvaccinated birds.

**Keywords:** vaccine, T lymphocyte, Gumboro disease, immune complex.

## INTRODUÇÃO GERAL

O desenvolvimento do setor avícola brasileiro levou o país à condição de terceiro maior produtor e o maior exportador mundial de carne de frango (UBABEF, 2011). Para acompanhar a grande demanda pela carne de frango, a avicultura mostrou avanços nas áreas de melhoramento genético, nutrição, sanidade e manejo (Fukayama et al., 2005). Segundo Castro (2010), o Brasil possui os melhores índices de produtividade e sanidade do mundo.

Com o objetivo de manter e ampliar os mercados consumidores, é necessário otimizar o delicado balanço entre os custos de produção e as características de qualidade exigidas pelos mercados consumidores interno e externo (Morales, 2010). A sanidade foi um dos pilares responsáveis pela base de uma avicultura estruturada e competitiva. A presença de doenças que diminuem a resistência das aves aos desafios de campo é um fator que pode aumentar custos (Martins, 2005; Alves, 2005; Galha et al., 2008) e até mesmo interferir na segurança alimentar dos produtos oriundos da indústria avícola.

A doença de Gumboro ou IBD (*Infectious Bursal Disease*) é uma das principais doenças imunossupressoras das aves, principalmente por atingir um dos mais importantes sítios de maturação e fornecimento de linfócitos B, a bolsa cloacal. Os linfócitos B são células responsáveis pela resposta imune humoral, que auxiliam na eliminação de patógenos e produção de anticorpos. A imunossupressão normalmente se apresenta em aves infectadas antes das 3 semanas de vida, já o contato com o IBDV a partir desse período pode causar mortalidade de 20% ou mais em aves não vacinadas ou vacinadas de forma ineficiente (Corley et al., 2002; Lukert & Saif, 2003; Balamurugan & Kataria, 2006; Schat & Skinner, 2008).

As principais formas de controle para a IBD estão centralizadas nos programas de biossegurança e vacinação. Porém o conceito de biossegurança definido por Soncini & Scheid (2008) como, conjunto de procedimentos efetuados para minimizar a entrada de patógenos numa granja, deixa implícito que mesmo com essas medidas poderiam existir ainda lacunas, as quais serviriam como porta de entrada para um agente patogênico nas granjas de produção. Além disso, o vírus da IBD (IBDV) é endêmico no Brasil, e, por ser muito resistente as condições ambientais, é de difícil erradicação das áreas contaminadas (Winterfield & Thacker, 1978, Kumar et al., 2000).

A vacinação é utilizada com o objetivo de complementar e ocupar as possíveis lacunas deixadas por falhas nos programas de biossegurança, entretanto é importante que seja realizada de forma consciente avaliando o *status* imunológico/sorológico e idade das aves a serem vacinadas (Bernardino, 2004; Bernardino & Leffer, 2009) e o histórico de doenças da região e da propriedade. Com essas informações o profissional será capaz de tomar a decisão correta sobre a data da vacinação, qual vacina utilizar e se esta será capaz de ativar resposta eficiente pelas aves contra o desafio de campo.

Atualmente, o mercado conta com tecnologias de vacinação que podem ser aplicadas *in ovo*, protegendo as aves desde a saída incubatório (Ricks et al., 1999; Perozo, 2009; Lemiere et al., 2012) . Neste cenário se encontram as vacinas recombinantes que se utilizam de um segmento genômico do agente, inserido em um organismo pouco ou não patogênico que é capaz de induzir resposta imune pela ave sem que o agente esteja presente (Bublott et al., 2007, Arnold et al., 2012, Gao et al, 2013).

As vacinas compostas por imuno complexos (ICs) são outra realidade no controle das doenças aviárias antes do primeiro dia de vida dos pintinhos. Em várias espécies, incluindo aves, os ICs são formados durante resposta imune a um antígeno (Ag) introduzido, por uma ligação com anticorpos (Acs) específicos recém formados em resposta a este (Jeurissen et al., 1998). A vacina fornece ao animal esses ICs já prontos acelerando etapas da resposta imunológica, além de não permitir que o vírus vacinal seja inativado pelos anticorpos maternos (AMs), e permite que a indução de resposta imunológica pelas aves acabe ocorrendo conforme o nível dos AMs diminui (Vidal et al, 2009).

O sistema imune dos vertebrados consiste de múltiplos tipos celulares interconectados com diferentes capacidades e funções, as quais interagem pelo contato célula a célula ou pela secreção de uma variedade de moléculas autócrinas e parácrinas. Enquanto alguns tipos celulares são sésseis, outros são móveis e circulam pela corrente sanguínea de maneira a detectar antígenos presentes nos centros linfóides. Esse sistema funciona como um sistema elaborado o qual funcionalmente pode ser dividido em resposta precoce ou inata e resposta de reação tardia ou adaptativa (Schijns et al., 2008).

Diferentes patógenos requerem tipos distintos de reações imunes do hospedeiro. Quando se projeta uma vacina, é importante conhecer antecipadamente o tipo desejado de reações imunes adaptativas. Para certos microrganismos a imunidade anticorpo-dependente é suficiente, enquanto para outros a imunidade mediada por células é essencial. A combinação das duas respostas também pode ser preferencial – algumas vezes em diferentes períodos após uma infecção (Schijns et al, 2008).

Apesar das vacinas vivas terem se mostrado muito eficazes contra uma série de doenças aviárias, elas possuem uma consequência importante, a imunossupressão. A imunossupressão tem sido associada com o uso de vacinas para vírus de Newcastle, IBDV, vírus enterite hemorrágica e o vírus da anemia infecciosa, tanto por que alguns agentes, como o IBDV, se replicam em células B associadas com a resposta imunológica (Ezeokoli et al., 1990; Padilha, 2005; Schijns et al, 2008). Esta imunossupressão pode ser maior conforme menos atenuado for o agente viral utilizado na vacina.

Desta forma são cada vez mais necessários estudos para avaliar se a idade de contato das aves com o IBDV poderia interferir no poder de imunossupressivo viral em aves submetidas a vacinação ou não vacinadas, auxiliando no entendimento da atuação destes produtos na dinâmica da resposta imune das aves.

Esta dissertação foi dividida em dois capítulos sendo o Capítulo I, uma revisão bibliográfica sobre a doença de Gumboro e as principais alternativas vacinais para o controle da doença e sua relação com a resposta imune das aves, intitulada "*Doença de Gumboro, Respostas Imunológicas e Tecnologias Atuais em Vacinas: Uma Revisão*", e o Capítulo II, um trabalho experimental intitulado "*Comparação da Resposta Imunológica de Aves Vacinadas ou Não com Imuno Complexos do Vírus da Doença de Gumboro, Desafiadas aos 21 ou 28 dias de Idade com uma Cepa Forte*", que compara a resposta imune por meio de testes de imunoistoquímica, histologia e citometria de fluxo de aves vacinadas e não vacinadas com ICs, desafiadas em dois períodos com uma cepa quente de IBDV.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVES, F.M.X. **Celulite Associada às Lesões na Bolsa de Fabricio de Frangos de Corte sob Inspeção Sanitária**. 2005. Niterói, 60f. Dissertação (Mestre em Medicina Veterinária), Universidade Federal Fluminense.

ARNOLD, M.; DURAIRAJ, V.; MUNDT, E.; et al. Protective Vaccination against Infectious Bursal Disease Virus with Whole recombinant *Kluyveromyces lactis* Yeast Expressing the Viral VP2 Subunit. **PLoS ONE** 7(9):e42870, 2012. Disponível em: <<http://www.plosone.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pone.0042870>>, acesso em 02/03/2013.

BALAMURUGAN, V.; KATARIA, J.M. Economically Important Non-oncogenic Immunosuppressive Viral Diseases of Chicken - Current Status. **Veterinary Research Communications** 30:541–566, 2006.

BERNARDINO A. Programas de Vacinação. In: MENDES, A.A.; NÄÄS, I.A.; MACARI, M. **Produção de Frangos de Corte**. Campinas: Fundação APINCO de Ciência e Tecnologia Avícolas, pp.179-203, 2004.

BERNARDINO, A.; LEFFER, E. Doença Infecciosa da Bolsa de Fabricio. In: BERCHIERI JÚNIOR, et al. **Doenças das Aves**, 2 ed. Campinas: Fundação APINCO de Ciência e Tecnologia Avícolas, pp. 651-673, 2009.

BUBLOT, M.; PRITCHARD, N.; LE GROSS, F.X. et al. Use of vectored vaccine against Infectious Bursal Disease of Chickens in the face of high-titred maternally derived antibody. **Journal of Comparative Pathology** 137:81-84, 2007.

CASTRO, A.G.M. Importância do Intercâmbio Técnico entre o Setor Público e Privado em prol do Desenvolvimento da Avicultura. In: XI Simpósio Brasil Sul de Avicultura e II Brasil Sul Poultry Fair, 2010. **Anais...** Chapecó - Brasil, pp.12-17, 2010.

CORLEY, M.; GIAMBRONE, J.J.; DORMITÓRIO, T.V. Evaluation of the immune response and detection of infectious bursal disease viruses by Reverse Transcriptase – Polymerase Chain Reaction and Enzyme-Linked Immunosorbent Assay after in ovo vaccination of commercial broilers. **Avian Diseases** 46: 803-809, 2002.

EZEOKOLI, C.D.; ITYONDO, E.A.; NWANNENNA, A.I.; UMOH, J.U. Immunosuppression and Histopathological Changes in the Bursa of Fabricius Associated with Infectious Bursal Disease Vaccination in Chicken. **Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases**, 13(4):181-188, 1990.

FUKAYAMA, E.H.; BERTECHINI, A.G.; GERALDO, A. et al. Extrato de Orégano como Aditivo em Rações para Frangos de Corte. **Revista Brasileira de Zootecnia**. 34(6):2316-2326, 2005.

GALHA, V.; BONDAN, E.F.; LALLO, M.A. Relação entre imunossupressão e coccidiose clínica em frangos de corte criados comercialmente. **Revista do Instituto de Ciências da Saúde**, 26(4):432-437, 2008.

GAO, H.; LI, K.; GAO, L.; et al. DNA prime-protein boost vaccination enhances protective immunity against infectious bursal disease virus in chickens. **Veterinary Microbiology**, 164(1-2):9-17, 2013.

JEURISSEN, S.H.M.; JANSE, E.M.; LHERBACH, P.R. et al. The working mechanism of an immune complex vaccine that protects chickens against infectious bursal disease. **Immunology**. 95:494-500, 1998.

KUMAR, K.; SINGH, K.C.P.; PRASAD, C.B. Immune Responses to Intermediate Strain IBD Vaccine at Different Levels of Maternal Antibody in Broiler Chickens. **Tropical Animal Health and Production**, 32:357-360, 2000.

LEMIERE, S.; PEROZO, F.; SAINT-VIS, B.; et al. Hatchery Vaccination Quality Control of Herpesvirus of Turkey-Infectious Bursal Disease HVT-IBD Viral Vector Vaccine Application by Specific qPCR. **International Journal of Poultry Science** 11(9):570-576, 2012.

LUKERT, P.D., SAIF, Y.M. Infectious bursal disease virus. In: SAIF, Y.M et al. **Diseases of Poultry**, 11 ed. Ames: Iowa State University Press, pp. 161–179, 2003.

MARTINS, N.R.S.; RESENDE, J.S.; JORGE, M.A. Principais causas de imunossupressão em galinhas. In: Conferência APINCO 2005 de Ciência e Tecnologia Avícolas, 2005, **Anais...** Santos - Brasil. pp. 79-94, 2005.

MORALES, O. Produtividade e equilíbrio da Fisiopatologia do Aparelho Digestivo. In: XI Simpósio Brasil Sul de Avicultura e II Brasil Sul Poultry Fair, 2010. **Anais...** Chapecó - Brasil, pp.96-99, 2010.

PADILHA, A.P. **Doença Infeciosa Bursal: Avaliação da Patogenicidade de Vacinas Comercializadas no Brasil em Aves Livres de Patógenos Específicos**. 2005. Porto Alegre, 41f. Dissertação (Mestre em Ciências Veterinárias), Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

PEROZO, F., P. VILLEGAS, R. FERNANDEZ, et al. Efficacy of single dose recombinant HVT-IBDV vaccination against a variant IBDV strain. **Avian Diseases**, 53: 624-628, 2009.

RICKS, C.A.; AVAKIAN, A.; BRYAN, T.; GILDERSLEEVE, et al. In ovo vaccination technology. **Advances in Veterinary Medicine** (41):495-515, 1999.

SCHAT K.A.; SKINNER, M.A. Avian Immunosuppressive Diseases and Immune Evasion. In: DAVISON, F.; KASPERS, B.; SCHAT, K.A. **Avian Immunology**, 1st ed. Academic Press, Elsevier Ltd. pp. 299-322, 2008.

SCHIJNS, V.E.J.C.; SHARMA, J.; TARPEY, I. Practical Aspects of Poultry Vaccination. In: DAVISON, F., KASPERS, B., SCHAT, K.A. **Avian Immunology**, 1st ed. Academic Press, Elsevier Ltd., pp. 373–393, 2008.

SONCINI, R.A.; SCHEID, I.R. Auditorias em biossegurança em granjas de suínos. **Acta Scientiae Veterinariae**, 36(1):47-51, 2008.

UBABEF, Relatório Anual 2010/2011. **União Brasileira de Avicultura**. SP. 2011. Disponível em: <<http://www.abef.com.br/ubabef/exibenoticiaubabef.php?notcodigo=2761>>, acesso em 20/11/2012.

WINTERFIELD, R.W.; THACKER, H.L. Immune Response and Pathogenic of Different Strains of Infectious Bursal Disease Virus Applied as Vaccines. **Avian Diseases** 5:253-260, 1978.

VIDAL K.A.; ICOCHEA, A.D'A., PERALES, R.C. et al. Evaluación de dos vacunas comerciales conteniendo el complejo antígeno anticuerpo contra La infección bursal em pollos de carne. **Revista de Investigaciones Veterinárias del Perú**, 20 (1):90-101, 2009.

## **CAPÍTULO 1**

# **DOENÇA DE GUMBORO, RESPOSTAS IMUNOLÓGICAS E TECNOLOGIAS ATUAIS EM VACINAS: UMA REVISÃO**

## **Doença de Gumboro, Respostas Imunológicas e Tecnologias Atuais em Vacinas: Uma Revisão**

*(Gumboro Disease, Immune Response and Actual Vaccine Technology: A Review)*

Patrick Westphal Ferreira

### **RESUMO**

A doença de Gumboro é uma das principais enfermidades imunossupressoras em aves domésticas, causada por um Birnavírus que atua principalmente nos linfócitos B, e também pode atingir macrófagos. Normalmente a enfermidade de Gumboro é controlada por meio da vacinação. Entretanto, a interferência de imunidade materna, a qual protege os pintinhos nos primeiros dias de vida, e o aparecimento de estirpes muito virulentas de IBDV têm diminuído a eficiência de vacinação com estirpes clássicas do vírus optando-se pelo uso de vacinas consideradas mais patogênicas. Estas vacinas menos atenuadas podem causar algum efeito imunossupressivo nas aves, piorando o desempenho produtivo e até tornando as aves suscetíveis a outras doenças. Recentemente com o avanço da tecnologia, vacinas vêm sendo desenvolvidas para substituir e tentar otimizar o processo de vacinação tornando os plantéis avícolas mais protegidos e causando menos reação vacinal, como é o caso das vacinas complexo antígeno-anticorpo e as vacinas recombinantes. Estas vacinas podem ser utilizadas *in ovo* ou desde o primeiro dia de vida da ave, sofrendo pouco ou não sofrendo interferência dos anticorpos maternos. Assim, o objetivo da presente revisão é buscar abordar o conhecimento existente no que se refere à imunidade contra o vírus da doença de Gumboro bem como os resultados com uso de vacinas com imuno complexos e recombinantes encontrados na literatura.

**Palavras-chave:** imunologia; imuno-complexo; vacina; vacina recombinante.

**ABSTRACT**

Gumboro disease is one of the main immunosuppressive diseases in poultry caused by a Birnavirus which acts primarily on B lymphocytes, but macrophages can also be affected. Usually the Gumboro disease is controlled by the use of vaccination. However, interference of maternal immunity, which protects the chicks in the first days of life, and the occurrence of very virulent strains of IBDV have reduced the effectiveness of vaccination with the classical virus strains, opting for the use of vaccines considered more pathogenic. These less attenuated vaccines can cause some immunosuppressive effect on birds, worsening the production and even making the birds more susceptible to other diseases. Recently through the advancement of genetic engineering, vaccines have been designed to replace or perhaps optimize the vaccination process, making poultry flocks more protected and causing less vaccine reaction, as can be found in the antigen-antibody complex vaccines and recombinant vaccines. These vaccines can be used *in ovo* or from the first day of the bird's life, reducing or eliminating the interference from maternal antibodies. The goal of this review is to approach the existing knowledge regarding immunity against Infectious Bursal Disease virus as well as the current results of using immune-complexes and recombinant vaccines found in the literature.

**Keywords:** immunology; immune-complex; vaccine; recombinant vaccine.

## INTRODUÇÃO

O vírus da doença de Gumboro (IBDV) pertence à família *Birnaviridae* responsável por causar a doença infecciosa da Bolsa Cloacal (IBD), mais comumente conhecida como doença de Gumboro. Esta é uma doença imunossupressora e acomete principalmente aves jovens (Van Den Berg et al., 2000). Está presente nos plantéis avícolas da maioria dos países da América Latina atingindo o sistema imunológico dos frangos, predispondo-os a sofrer doenças que normalmente passariam inadvertidas em aves com sistema imunológico normal. A presença de cepas muito virulentas tem sido reportada em países como Bolívia, Brasil, Colômbia, Uruguai, Venezuela e República Dominicana (Banda & Villegas, 2004). Segundo Moraes (2004) em dados do Centro de Diagnóstico em Patologia Aviária (CDPA), no período de 1999-2004 a IBD correspondia a cerca de 30% do total de diagnósticos efetuados naquele laboratório. Vargas et al. (2007), relatou também ocorrência da IBD em um lote de frangos de corte no Rio Grande do Sul com cerca de 12,5% de mortalidade.

Após a identificação inicial de cepas muito virulentas do vírus da doença de Gumboro (vvIBDV) em São Paulo, sua ocorrência foi relatada em todos os estados do país, constituindo um problema que obriga as empresas avícolas a adotarem novas abordagens de prevenção com relação a biossegurança e programas de vacinação (Tessari et al., 2000; Di Fabio, 2002).

A situação atual da doença de Gumboro na avicultura brasileira é pouco relatada, porém o Brasil fechou o ano de 2012 com cerca de 3,5 bilhões de aves imunizadas, segundo a empresa fabricante da vacina recombinante contra IBD mais vendida no país (Avisite, 2012), se levarmos em conta que esse é um número de apenas um fabricante é possível perceber que a IBD está presente no país e ainda é

uma grande preocupação na avicultura nacional, que continua investindo na imunização de seu plantel visando a prevenção da doença.

Barbosa et al. (2011) avaliou 187 amostras oriundas de países da América Latina em 2010 identificou por meio de exames de RT-PCR (*Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction*) que 45,98% eram positivas para IBDV, destas, somente 31% eram análogos aos vírus vacinais utilizados nas propriedades, o restante era composto por cepas variantes e cepas muito virulentas.

Assim como em outros países do mundo, o controle da IBD na América Latina se realiza por meio do uso de vacinas tanto nas aves reprodutoras quanto nas progênies (Van Der Berg et al. 2000, Bublôt et al., 2007). Apesar dos programas de vacinação utilizados no campo, o IBDV continua causando problemas econômicos devido à emergência de cepas altamente virulentas (Chen et al., 1998, Van Den Berg et al., 2000). Além disso, muitas vezes os programas vacinais contra IBD utilizados no campo não são eficazes em proteger as aves nem mesmo para as cepas clássicas, portanto, a imunossupressão induzida pelo vírus continua resultando em infecções secundárias, baixo desenvolvimento e condenação de carcaças no abatedouro (Van Den Berg et al., 2000).

Em geral utilizam-se para a IBD vacinas vivas atenuadas, que são agrupadas conforme sua virulência residual, ou seja, relacionado com seu nível de atenuação e virulência. Quanto menos atenuadas, essas vacinas podem apresentar quadros de imunodepressão e lesões na bolsa cloacal (BC) das aves vacinadas (Bublôt et al., 2007). Outro problema que pode interferir na eficácia das vacinas é a presença de anticorpos (Acs) maternos provenientes da imunidade passiva no momento da vacinação dos pintinhos. Apesar desta proteção maternal ser essencial para proteger as aves nos seus primeiros dias de vida contra o desafio de campo, já está

comprovado que essa imunidade também age nos vírus vacinais interferindo no sucesso da vacinação (Winterfield & Thacker 1978, Pejkovski et al., 1979; Kumar et al., 2000; Alam et al., 2002).

Kumar et al. (2000), descreveu que progênes oriundas de matrizes bem vacinadas devem conter títulos relativamente altos de Acs, porém se sabe que existem variações no nível de anticorpos maternos (AMs) em pintinhos recém-eclodidos, assim como a taxa de declínio destes Acs, conforme o tipo de ave e o programa de vacinação utilizado nas matrizes (De Wit, 2001). Tal fato deve ser levado em consideração no desenvolvimento de um programa de vacinação em frangos de corte, pois no mesmo lote existirão aves com boa proteção e aves totalmente expostas. Este é um ponto muito importante, visto que na avicultura um mesmo lote de frangos de corte pode ser formado por pintinhos de diferentes origens que podem ter vindo de diferentes empresas, utilizando diferentes programas de vacinação nas reprodutoras e, se não bastasse, de diferentes idades de matrizes (Bernardino, 2001).

Segundo Fernandes (2012) a utilização de vacinas fortes (menos atenuadas) introduzidas após o aparecimento de surtos de vvIBDV, está sendo substituída por vacinas construídas a partir de novas tecnologias como as vacinas recombinantes ou associadas a Acs (imuno complexos) reduzindo problemas relacionados com lesão de BC e imunidade materna, mantendo a doença sob controle.

Normalmente quando se trata de vacinação são avaliados os parâmetros relacionados com a imunidade humoral a partir da titulação das matrizes e da progênie, porém hoje já se sabe que o vírus se replica em macrófagos (Khatri et al., 2005) e que a imunidade celular também tem um papel muito importante no controle da doença (Kim & Sharma, 2000). Buscando entender um pouco mais sobre a

relação do IBDV e a resposta imune envolvida na IBD e na vacinação o objetivo desta revisão é abordar brevemente sobre essa doença, sua patogenia e relação com a imunidade e aspectos específicos das vacinas compostas por imuno complexos (ICs) e recombinantes utilizadas atualmente pelo mercado avícola brasileiro (MAPA, 2013).

## **DOENÇA DE GUMBORO**

A IBD é causada pelo IBDV (*Infectious Bursal Disease Virus*). Esta virose caracteriza-se por ser aguda e altamente contagiosa, com severo efeito de imunossupressão que causa grandes perdas econômicas para a indústria avícola (Sharma et al., 2000).

A IBD tem distribuição mundial e o primeiro relato desta doença foi feito por Cosgrove (1962) nos Estados Unidos e no Brasil em 1972 (Nakano et al., 1972). Durante vários anos foi confundida com variantes de vírus de “Bronquite Infecciosa” devido às lesões renais observadas no campo, sendo posteriormente estabelecidos agentes etiológicos distintos (Eterradossi & Saif, 2008).

O vírus da IBD pode ser dividido em sorotipo 1 e sorotipo 2 (Gardin, 2000). Os vírus do sorotipo 1 são patogênicos para frangos e podem ser classificados em: estirpes virulentas clássicas, estirpes avirulentas, estirpes variantes antigênicas e estirpes muito virulentas. O vírus do sorotipo 2 é pouco virulento ou avirulento, tanto para perus como para galinhas (Bernardino & Leffer, 2009). McFerran et al. (1980) citado por Eterradossi & Saif (2008) mostraram que estes dois sorotipos apresentavam apenas 30% de relação entre eles.

O IBDV é um vírus não envelopado, com genoma caracterizado por um RNA fita-dupla consistindo em dois segmentos A e B. O segmento A codifica duas

proteínas estruturais (VP2 e VP3), uma autoprotease (VP4) e um pequeno peptídeo não estrutural (VP5) e a qual parcialmente se sobrepõe com a camada aberta de leitura (CAL) codificando VP234 (Lukert & Saif, 2003). Enquanto o segmento B codifica VP1, que esta ligada ao fim dos dois segmentos genômicos, sendo uma RNA polimerase viral RNA-dependente com múltiplas atividades enzimáticas (Lukert & Saif, 2003; Gao et al., 2011).

A poliproteína VP234 impede a divisão de células B provavelmente interferindo com o ciclo celular, pois não afeta a viabilidade celular (Peters et al, 2004). A literatura relata que a proteína VP2 é o principal antígeno protetor do vírus e contém epítomos antigênicos responsáveis pela indução de anticorpos neutralizantes (Becht et al., 1988, Fahey & Crooks, 1989; Bayliss et al., 1991; Le Gros et al., 2009; Zhou et al., 2010; Gardin et al., 2011). A proteína VP2 também tem seu papel ligado a apoptose quando expressa sozinha em RNA transfectado (Rodriguez-Lecompte et al., 2005). VP3 é uma proteína estrutural, multifuncional envolvida no ciclo do vírus e atua como base para montagem da partícula viral. VP4 é uma protease viral responsável pelo auto-processamento da poliproteína do IBDV (Müller et al., 2003). VP5 não é essencial para replicação viral, mas Gao et al. (2011) cita que esta parece estar envolvida com a liberação do vírus. Usando genética reversa Yao et al. (1998) mostrou que a deleção de VP5 não evitou a replicação viral *in vivo* mas preveniu o desenvolvimento de lesões na BC sugerindo um papel para VP5 na patogênese da IBD. Estudos *in vitro* sugeriram que em infecções precoces com VP5 ocorre um comportamento anti-apoptótico (Liu & Vakharia, 2006), mas durante estágios tardios VP5 se acumula na membrana plasmática e causa apoptose, por isso é considerada envolvida na liberação do vírus (Yao & Vakharia, 2001, Müller et al., 2003).

A resistência do IBDV no ambiente é outro fator importante que contribui para o surgimento de potenciais surtos da doença nas instalações de produção de frangos.

A ausência do envelope (membrana biológica), que medeia a interação de alguns vírus com a superfície das células hospedeiras, e pelo fato de serem dotados de um capsídeo protéico resistente a intempéries (Spilki et al., 2009), confere ao IBDV resistência a variações de pH e calor, persistindo em instalações contaminadas por mais de 100 dias (Bernardino & Leffer, 2009). Resende et al. (2010) avaliou o procedimento de fermentação de camas, amplamente utilizado nos sistemas produtivos de frangos, sobre a infectividade de IBDV e vírus da Doença de Newcastle (VDN) e identificou que tanto nos tratamentos utilizando cama descoberta quanto camas submetidas ao processo de fermentação houve inativação do VDN após 7 dias. Entretanto o IBDV permaneceu viável e com capacidade de causar doença. Além da resistência ao processo de fermentação, o vírus possui grande resistência aos processos de desinfecção química e física. Segundo Eterradosi & Saif (2008), certamente a natureza resistente deste vírus é uma das razões para sua persistência nas instalações avícolas, até mesmo quando os procedimentos de limpeza e desinfecção são seguidos.

## **VARIANTES DO IBDV**

Do ponto de vista antigênico, Gardin et al. (2011) citou que o seqüenciamento da proteína viral (VP) 2 permite a diferenciação do vírus em estirpes clássicas e variantes.

Cepas virulentas clássicas são associadas à mortalidade, hemorragia e presença de transudato em BC, enquanto que cepas variantes produzem poucos sinais clínicos (Cavanagh, 1992). Cepas avirulentas não causam doença clínica em

frangos e algumas são utilizadas na produção de vacinas. As cepas muito virulentas emergiram nos anos 80 e espalharam-se pelo mundo (Van Der Berg, 2000). Estas cepas causam lesões típicas da IBD e são antigenicamente similares as cepas clássicas (Cao et al, 1998).

Gelb Jr. et al. (2012) em estudo conduzido em 2007 na região de Delmarva nos EUA, recuperou 10 isolados de campo em plantéis que apresentavam histórico de baixo desempenho. A análise da proteína viral VP2 destes isolados demonstrou que todos eram semelhantes à variante Delaware. Cinco destes 10 isolados, os quais representavam diferentes clades moleculares da variante Delaware, foram selecionados para estudos em aves SPF, e produziram lesões compatíveis com essa variante. Porém quando se testou a ação de Acs monoclonais, que normalmente reconhecem as estirpes STC, Del E, GLS, RS593 e AL2, um dos isolados se mostrou não reativo. Seus estudos mostraram que essa variante, apesar das características virais de VP2 e potencial patogênico semelhantes à variante Delaware, era antigenicamente diferente da estirpe original, não sofrendo efeito da resposta vacinal utilizada contra aquela cepa.

Snyder (1990) descreveu que estirpes variantes a partir de isolados de surtos em frangos na mesma região, provocavam atrofia muito rápida da BC comparada às cepas clássicas vacinais. Na análise de Acs monoclonais da estirpe viral isolada nestes casos, este autor, revelou diferenças entre esta e as variantes descritas até aquele momento, e as classificou como estirpes GLS (Snyder, 1990). O autor sugeriu que, embora não provado, o aumento do uso de vacinas teve papel na emergência de cepas variantes.

Os resultados de seus estudos mostraram ainda que, na Península de Delmarva, os isolados de IBDV clássico foram 4% do total, o restante se dividiu

entre cepas variantes Delaware e GLS, enquanto que nos estados do oeste e noroeste a situação foi inversa, onde 94% consistiam de isolados com cepa clássica. Essas evidências epidemiológicas apoiam a visão que existe diferença entre variantes em diferentes regiões geográficas.

Banda & Villegas (2004) avaliando isolados de vvIBDVs de campo provenientes do Brasil, República Dominicana e Venezuela identificaram, que as estirpes oriundas da Venezuela eram mais similares as estirpes encontradas na Europa e Ásia que as estirpes oriundas do Brasil e República Dominicana. Estes autores sugeriram que estas diferenças podem ser relacionadas com diferentes práticas de manejo e condições ambientais de cada região geográfica.

Recentemente Silva et al. (2013) avaliou amostras oriundas das principais regiões produtoras de frangos do Brasil e, por meio de técnicas de RT-PCR, identificou que os isolados de IBDV foram introduzidos no Brasil principalmente da Holanda, no caso de estirpes muito virulentas (vvIBDV) e dos Estados Unidos, no caso das variantes clássicas (cvIBDV) e variantes antigênicas (avIBDV), provavelmente oriundos de importação de animais portadores sub-clínicos de IBD.

## **PATOGENIA**

IBDV infecta os frangos por via oral e inicialmente se replica nas células dos tecidos linfóides associados ao trato gastrintestinal (GALT) (Vervelde & Davison, 1997). A proteína VP2 do vírus clássico da IBDV inicialmente é mais prevalente na BC, seguida por baço e timo (Vervelde & Davison, 1997). Willians & Davison (2005) identificaram inicialmente o antígeno VP2 no limite cortico-medular da BC, o que segundo estes autores deve corresponder ao local de entrada do vírus. Estes autores ainda relataram que o vírus provavelmente é carregado para a BC por células

migratórias como, por exemplo, os macrófagos provenientes do local de replicação primária (intestino) e uma vez na medula da BC são capazes de colonizar folículos individuais.

Os sinais clínicos associados à doença aguda incluem anorexia, depressão, penas arrepiadas, diarreia, prostração e morte (Sharma et al., 2000). As lesões incluem atrofia e hemorragia da BC, desidratação e escurecimento dos músculos peitorais e hemorragias nos músculos da coxa e peito (Sharma et al., 2000, Eterradossi & Saif, 2008), pois o IBDV parece interferir nos mecanismos normais de coagulação. Zeryehum et al. (2012) avaliou a contagem de trombócitos e testes de coagulação em aves não inoculadas e inoculadas com uma estirpe de vvIBDV e observou que as aves infectadas tiveram alterações na coagulação sanguínea apresentando aos 3 e 4 dias pós-infecção trombocitopenia e aumento no tempo de tromboplastina, protrombina e no tempo de recalcificação do sangue total.

As lesões microscópicas de IBD ocorrem inicialmente nos tecidos linfóides. Porém as mudanças mais severas ocorrem na BC, a partir do dia 1 de infecção há degeneração e necrose dos linfócitos da região medular dos folículos bursais. Os linfócitos são substituídos por heterófilos, *debris* picnóticos e células hiperplásicas de tecido reticuloendotelial, e pode haver presença de hemorragia. O aumento da BC é causado por severo edema, hiperemia e acúmulo de heterófilos (Eterradossi & Saif, 2008)

Esta virose conduz a intensa imunossupressão causando grandes perdas econômicas para a indústria avícola (Kibenge et al, 1988; Sharma et al., 2000), pode aumentar a prevalência de infecções respiratórias virais e mortalidade devido aerossaculite e colisseptissemia secundária entre a 6<sup>o</sup> e 8<sup>o</sup> semanas. Desde a década de 70 já foi demonstrado por Hirai et al (1974) que o IBDV também pode

causar decréscimo na resposta humoral de anticorpos para vacinas de outras doenças, indicando que falhas vacinais também podem ocorrer.

Como a IBD é uma doença de aves jovens, a vacinação e a infecção podem estar muito próximas num momento que as aves, muitas vezes, não têm imunocompetência para responder de forma mais intensa a estas agressões antigênicas, sendo então a produção de Acs muito pobre neste curto período pós-infecção. Com esta dificuldade, a avaliação sorológica deve ser feita com critérios bem definidos (Di Fabio, 2001).

O principal alvo da replicação viral são os linfócitos B em divisão presentes na BC de aves (Rodenberg et al., 1994). Entre três e seis semanas após o nascimento quando a bolsa alcança o máximo desenvolvimento, os frangos são altamente susceptíveis ao vírus. Okoye & Uzoukwu (1990) utilizando pintinhos bursectomizados, mostraram que a BC não era elemento essencial para o estabelecimento do IBDV, mas era necessária para a presença dos sinais clínicos.

Células T são resistentes à infecção com IBDV, entretanto o timo sofre marcada atrofia e extensiva apoptose dos timócitos durante a fase aguda de infecção viral, porém não há evidencia que o vírus realmente se replique em células do timo (Sharma et al., 1989). O que se sabe é que os macrófagos por meio da produção de moléculas como o óxido nítrico, podem ter papel na destruição de células autólogas e células T (Böhlke, 1999). Um dos comuns efeitos imunossupressivos descritos para infecções por vírus de Marek, Reovírus, IBDV e o vírus da Reticuloendoteliose é a geração de macrófagos “supressores”, estas células suprimem a blastogênese de linfócitos T e são freqüentemente detectadas entre os três e 15 dias pós-infecção (Schat & Skinner, 2008).

Uma vez que o vírus esteja presente nas instalações avícolas, o que pode ocorrer principalmente devido à alta resistência do IBDV ao ambiente o contato com o agente pode raramente ser evitado, sendo a vacinação a única forma de prevenir as consequências negativas relacionadas com a doença (Gardin et al., 2011). O vírus não acomete seres humanos e não tem importância na saúde pública (Lukert & Saif, 1991).

### **O IBDV E RESPOSTA IMUNOLÓGICA**

A base molecular para supressão da resposta imunológica pelo IBDV é resultado de um conjunto complexo de interações entre as diferentes proteínas virais e as células B infectadas.

As células B são maturadas inicialmente na BC e predominam na maior parte dos órgãos linfóides de superfície como a glândula de Harder (80%) e tonsilas cecais (>50%) (Albini & Wick, 1974). Desde 1970 se sabe que a infecção por IBDV em frangos de até três semanas de idade causa dano severo na BC com depleção de linfócitos B expressando na superfície IgM, assim como no baço e no sangue periférico, afetando na maior parte as respostas primárias de Acs, mas não afetando células T CD4+ e CD8+ circulantes (Rodemberg et al., 1994; Schat & Skinner, 2008).

O dano na BC é transitório, os folículos são recolonizados com linfócitos e a arquitetura do tecido é restaurada, mas as respostas primárias de Acs permanecem deprimidas até cerca de sete semanas pós-infecção, mas também se recuperam. A duração do processo de recuperação depende da idade da infecção e da virulência da estirpe viral (Kim et al., 1999).

A supressão da imunidade humoral parece ser associada à lise dos linfócitos B (Sharma et al., 1989). A resposta imune humoral contra o vírus desafio ou vacinal da IBD é uma das bases de todo o processo de vacinação (Howie & Thorsen, 1981; Winterfield et al., 1980; Rautenschlein et al., 2003). Com o conhecimento da curva de títulos de Acs do lote de aves é possível determinar um programa vacinal de campo.

A concentração de títulos de AMs passados aos pintinhos pelas matrizes vacinadas, declina variavelmente ao longo do tempo entre tipos de aves devido a fatores relacionados ao metabolismo e taxa de crescimento. O título de AMs normalmente permanece o mesmo durante os primeiros 4 dias de vida; pois a absorção da gema compensa o decréscimo do título pelo metabolismo e crescimento; a partir dos 4 dias o título reduz 1 log<sub>2</sub> por período de meia vida. Em geral utiliza-se como via de regra um tempo de meia vida para os Acs de IBDV para frangos de corte de 3 a 3,5 dias, 4,5 dias para matrizes e 5,5 dias para poedeiras (De Wit, 2011).

Os Acs, mais especialmente os Acs neutralizantes, gerados na resposta imune humoral podem neutralizar o vírus diretamente (Van Den Berg et al., 2000). Gao et al., (2011) sugere a importância da vacinação como base para essa resposta.

Aves infectadas com IBDV mostram tanto imunossupressão humoral como celular. A imunidade celular tem papel importante no controle do agente, segundo Kim & Sharma (2000), aves infectadas com IBDV tratadas experimentalmente com ciclosporina A tiveram redução da infiltração intrabursal de células T, promovendo replicação viral na BC, mostrando que essas células têm papel importante na regulação da replicação viral nas aves. Porém, Rautenschlein et al. (2003) em seus resultados sugerem que somente a ação das células T na BC não pode ser

considerado um indicativo de resposta imune rápida e protetora, assim como, altos títulos de Acs neutralizantes sozinhos mostraram não ser suficientes na proteção contra a replicação dos vírus de IBDV utilizados, o que pode indicar associação da resposta humoral e celular no controle efetivo da doença.

As células T são maturadas no timo, mas podem estar presentes em outros órgãos normalmente como a BC. No sangue periférico, células T constituem cerca de 60-70% do total de linfócitos sendo o restante composto por células B e grandes linfócitos granulares sem marcadores de superfície ou proteínas associadas a membrana (*null cells*) (Albini & Wick, 1974). No baço, células T constituem cerca de 55% dos linfócitos e são predominantes no tecido linfóide periarteriolar, na polpa vermelha e nos sinus (Boyd & Ward, 1978).

Embora células T não sejam suscetíveis à infecção por IBDV, estas células são importantes componentes na imunopatogênese global do IBDV. Há um influxo de células CD4+ e CD8+ na BC entre um a 10 dias pós-infecção, possivelmente devido a apropriados sinais através de citocinas (Sharma et al., 2000; Willians & Davison, 2005; Carballeda et al., 2011). Essa presença de células T sugere que a imunidade celular pode ter importante papel na recuperação de uma infecção com IBDV.

Além do papel conhecido das células CD8+ na lise de células infectadas, contribuindo com o *clearance* viral, as células CD8+ e CD4+ da BC podem também contribuir na produção de óxido nítrico sintase II (NOS II) através da síntese de IFN- $\gamma$  ou outros fatores solúveis estimulantes na transcrição de NOS II nos macrófagos e subsequente produção de óxido nítrico (NO). O NO pode contribuir no desenvolvimento de lesão inflamatória, mas também pode estar envolvido na infra-regulação nas respostas mitogênicas de células T do baço, a qual é associada com a fase aguda de infecção por IBDV (Kim & Sharma, 2000). A secreção de NO pelos

macrófagos supressores talvez seja sua base de funcionamento, pois este inibe a ribonucleotídeo redutase da célula-alvo, no caso dos linfócitos impedindo sua proliferação (Böhlke, 1999).

Além da replicação em células B, IBDV pode também infectar e se replicar nos macrófagos. Khatri et al. (2005) encontrou RNA viral e proteínas utilizando técnicas de transcriptase reversa (RT-PCR) e imunistoquímica respectivamente, nos macrófagos da BC entre um a sete dias pós-infecção. O número absoluto de macrófagos na BC diminuiu significativamente aos três e cinco dias pós-infecção. O impacto atual na resposta imune nesta observação ainda não é claro.

Mais recentemente Khatri & Sharma (2009) demonstraram *in vitro* que uma estirpe clássica e uma variante-E de IBDV mostraram capacidade de se replicar em células tronco mesenquimais de frangos induzindo efeitos citopáticos. Tal fato poderia contribuir direta ou indiretamente para o acesso do vírus a outros de seus alvos conhecidos, favorecendo ocorrência da doença. Estes autores indicam que *in vivo* poderia haver transmissão do vírus na medula óssea a partir das células tronco mesenquimais para linfócitos B e macrófagos em diferentes estágios de diferenciação. Outro fato importante é que a ação dos vírus nas células tronco mesenquimais poderia levar a depleção das células que são responsáveis pela renovação celular e diferenciação em células especializadas e tecidos.

As citocinas são moléculas efetoras essenciais na imunidade inata e adquirida que iniciam e coordenam a resposta celular e humoral na erradicação de patógenos (Swaggerty et al., 2004). Durante a infecção por IBDV as citocinas pró-inflamatórias como interleucina IL-6, IL-1 $\beta$  e IL-8 são aumentadas em nível transcricional na BC e no baço, enquanto fatores de crescimento e transformação das citocinas anti-inflamatórias (TGF)- $\beta$ 4 estão diminuídas (Kim et al., 1998; Khatri et al., 2005). As

alterações na transcrição de citocinas são compatíveis com a inflamação na BC durante a infecção aguda. Entretanto, não está claro como essas mudanças tem papel na imunossupressão associada ao IBDV.

O baço das aves é um órgão linfóide secundário que fornece um microambiente essencial para interação entre células linfóides e não linfóides. A contribuição do baço nas aves para o sistema imune como um todo pode ser mais importante que nos mamíferos devido ao seu sistema de nódulos e vasos linfáticos serem pouco desenvolvidos (Oláh & Vervelde, 2008).

## **VACINAS**

O vírus da IBD é altamente infeccioso e bastante resistente à inativação. Por isso, apesar de medidas higiênicas estritas, a vacinação é inevitável em condições de alta pressão de infecção sendo obrigatória para a proteção do frango, durante as primeiras semanas após o nascimento (Muller et al., 2003).

Os principais objetivos da vacinação contra IBD são a redução dos sinais clínicos, lesões e consequências econômicas associadas à infecção. Apesar da imunidade humoral ser considerada por alguns autores como um importante fator para neutralizar o IBDV e proteger os frangos (Gao et al., 2011; Gardin et al., 2011), a imunidade celular gerada pela vacinação também pode ter importante papel na resposta a IBD. Degen et al. (2005) utilizando técnicas de RT-PCR, as quais permitem uma avaliação mais precisa da resposta imune induzida por vacinas vivas, demonstraram que um vírus de Newcastle foi capaz de induzir resposta Th1 (células T CD4+) em galinhas. Schijns et al., (2008) sugeriu que vacinas vivas que se repliquem intracelularmente também poderiam induzir esse tipo de resposta, como é o caso dos vírus de Newcastle, IBD, Marek, além dos coccídios e das salmonelas.

Não obstante a uma boa correlação entre os Acs neutralizantes de vírus e a proteção, vacinas vivas contra o IBDV também induzem uma resposta com células T CD8 que podem modular a patogênese do IBDV (Rautenschlein et al., 2002).

As vacinas disponíveis hoje para prevenção da IBD são as vacinas inativadas, as vacinas vivas atenuadas, as vacinas compostas por imuno complexos (ICs) e as vacinas recombinantes.

As vacinas inativadas são feitas a partir do vírus inteiro produzido em ovos embrionados ou cultura de células, os vírus são inativados e colocados em suspensão em emulsão oleosa como adjuvante, utilizadas normalmente para estimular a produção de Acs em matrizes para proteção passiva das progênes.

As vacinas vivas atenuadas contém o vírus vivo artificialmente atenuado disseminado em ovos ou culturas de células. Há diferentes tipos de vacinas atenuadas para IBD e podem variar de acordo com o título do vírus por dose e a natureza ou grau de atenuação da estirpe de IBDV selecionada. Conforme o grau de atenuação essas vacinas podem ser classificadas em suaves; que de acordo com Gardin et al. (2011) são pouco utilizadas hoje em dia devido ao seu alto grau de atenuação; intermediárias, intermediárias *plus* ou quentes, que são as mais próximas aos vírus de campo (OIE, 2011a).

Essas vacinas se apresentam sob forma liofilizada congelada e devem ser administradas via água de bebida, a via ocular, intra-nasal, spray e intramuscular. As vacinas suaves ou intermediárias são suscetíveis ao efeito dos AMs desta forma devem ser administradas somente quando estes AMs tenham diminuído (OIE, 2011a).

Vacinas intermediárias foram introduzidas em alguns países para controlar a vvIBDV, com elevado grau de sucesso. Estas vacinas podem ser utilizadas antes

das vacinas altamente atenuadas, assim fornecendo imunidade ativa precoce e reduzindo a janela de oportunidade das cepas de vvIBDV (Cavanagh, 1992).

As vacinas intermediárias ou intermediárias *plus* são utilizadas para proteger os frangos de corte e poedeiras. Algumas dessas vacinas são também utilizadas em matrizes se estas tiverem um alto risco de infecção natural com IBDV virulento. Contudo vacinas intermediárias também são suscetíveis à presença de AMs. Elas podem ser administradas ao primeiro dia de idade, sob forma de spray ou subcutânea, para proteger quaisquer aves no plantel. Seu uso ao primeiro dia é opcional pois algumas empresas preferem utilizar esse tipo de vacina somente no campo, embora seu uso no primeiro dia possa proteger aves que porventura nasçam com baixos títulos de AMs, prevenindo a doença em caso de desafios precoces (Bernardino, 2004). Isto também estabelece um reservatório de vírus vacinal no plantel que permite transmissão horizontal para outras aves quando os AMs declinam.

A segunda e terceira aplicação são normalmente administradas especialmente quando há alto risco de exposição às formas virulentas da doença ou quando as aves vacinadas exibirem taxas de AMs desiguais. Como um guia, a segunda dose é normalmente dada entre 10 e 14 dias de idade quando cerca de 10% do lote é suscetível ao IBD, e a terceira dose entre sete e 10 dias após a segunda vacinação. Normalmente essas doses de reforço são feitas sob forma de spray ou água de bebida e mais raramente por via ocular e via intramuscular (OIE, 2011a).

A vacinação com vírus vivo atenuado é usada mundialmente para controlar a IBD nos plantéis comerciais de aves. Um dos maiores problemas deste tipo de vacinação é a sensibilidade do agente vacinal aos AMs que normalmente estão presentes no momento da vacinação (Le Gros et al., 2009) e sua capacidade de

produzir imunossupressão. Por isso constantemente buscam-se novas formas de imunização das aves contra IBDV.

Entretanto quando se trata de vacinas vivas, um dos métodos que mais se adapta a realidade de cada empresa, consiste na utilização de fórmulas matemáticas para identificar o período de regressão do título de Acs de um lote de aves, estabelecendo assim o melhor período de vacinação reduzindo a possibilidade de interferência dos AMs com a vacina, como é o caso dos modelos propostos por Kouwenhoven (1995) e De Wit (2001).

As vacinas vivas do tipo imuno complexo, são produzidas por mixagem em proporções bem definidas, de uma suspensão de um IBDV atenuado produzido em ovos embrionados com Acs específicos produzidos em aves SPF inoculadas com IBDV. Este complexo é congelado, liofilizado e apresentado sob forma injetável, sendo reconstituído com diluente antes da injeção feita *in ovo* ou em aves de um dia (Gardin et al., 2011).

Mais recentemente estão sendo utilizadas vacinas recombinantes de IBDV, disponíveis comercialmente no Brasil utilizando um Herpes Vírus de Peru (HVT) como vetor, que é um vírus muito estável e seguro utilizado mundialmente para prevenção da doença de Marek. A proteína VP2 é extraída de um IBDV doador e é inserida no genoma do HVT, este ao se replicar expressa a proteína do IBDV e induz proteção do animal vacinado. O HVT utilizado na vacina é apatogênico e tem como hospedeiro natural às espécies aviárias (Zhou et al., 2010). Este vírus não é sensível aos AMs sensibilizados para IBD, principalmente por não existir o IBDV e também devido ao HVT utilizado como vacina permanecer em geral intracelular.

Outras vacinas recombinantes também têm sido descritas. Uma seqüência complementar de DNA (cDNA) codificando VP2 foi inserida no genoma de um

*fowlpox* vírus o qual foi utilizado para vacinar frangos (Bayliss et al., 1991). Utilizando o *fowlpox* vírus como vetor, a expressão de VP2 protegeu as aves da mortalidade, mas não de danos em BC quando desafiadas com uma cepa virulenta de IBDV (CS89). A VP2 também foi expressa em células de levedura (Jagadish et al., 1991), o produto foi capaz de induzir produção de Acs neutralizantes anti-VP2 quando injetados em poedeiras (Macreadie et al., 1990). As aves inoculadas com vacina a base de levedura expressando VP2 foram capazes de passar Acs para suas progênes, possivelmente implicando em proteção contra a estirpe de IBDV utilizada. Estes resultados confirmam a importância do papel de VP2 na indução de respostas imunes protetoras e são promissoras no desenvolvimento de vacinas modificadas geneticamente.

## **VACINAS COMPOSTAS POR IMUNO COMPLEXOS**

Em várias espécies, incluindo frangos, os ICs são formados durante resposta imune a um Ag introduzido por uma ligação com Acs específicos recém formados em resposta a esse Ag. Uma pequena proporção dos ICs ficam aprisionados nos folículos primários e secundários do tecido linfóide, ou zonas de células B (Jeurissen et al., 1998).

As células dendríticas foliculares (CDFs) fazem parte deste microambiente, estas células não hematopoéticas são diferentes das células dendríticas convencionais associadas com células T. São derivadas das células-tronco mesenquimais e são negativas para o MHC II, e não processam ou apresentam Ag como as células dendríticas convencionais. Ao invés disso, CDFs possuem receptores Fc e C3B que fixam o Ag na forma de ICs em suas superfícies por longos períodos para reconhecimento pelas células B. Acredita-se que o Ag preservado

desta forma tenha papel importante na geração de resposta imune humoral ao longo do tempo (Oláh & Vervelde, 2008).

De acordo com Jeurissen et al. (1998), ICs pré-formados *in vitro* mostraram-se 100 vezes mais eficientes na indução de resposta humoral *in vivo* que as proteínas nativas. Este potencial específico dos ICs levou a idéia de utilizá-lo como vacina.

Durante os últimos anos têm sido desenvolvidas vacinas contendo estes complexos (ICs) que são aplicados *in ovo* ou ao primeiro dia de idade, sendo capazes de proteger o vírus vacinal da ação dos AMs (Corley et al., 2002), mas não impedem a progressiva replicação viral (Vidal et al., 2009, Gardin, 2007). Segundo Gardin et al. (2011), devido a ligação natural com Acs específicos o IBDV vivo não é reconhecido pelo sistema imune do hospedeiro e também não é neutralizado pelos AMs. Depois de cerca de 3 semanas de vida quando a maioria dos AMs desapareceu, o vírus vacinal é liberado do complexo anticorpo-vírus e inicia sua replicação, a qual leva a indução de imunidade ativa. Este autor ressalta que a replicação do vírus vacinal pode iniciar precoce ou tardiamente, dependendo do nível inicial de AMs, a proteção por este tipo de vacina é similar ao obtido com vacinas vivas atenuadas do tipo intermediária *plus* administradas no período ótimo de vacinação, resultando em uma imunidade mais homogênea do plantel.

Vidal et al. (2009) avaliando duas vacinas comerciais compostas por ICs comparadas a um grupo não vacinado e um grupo vacinado com a cepa intermediária, em que todas as aves foram desafiadas aos 35 dias com a cepa padrão F52/70, encontrou, em todos os tratamentos, presença de sinais clínicos como diarreia, depressão e edema em BC, que foram menos evidentes nas aves vacinadas com ICs. Estatisticamente todos os tratamentos tiveram resultados iguais,

indicando que os resultados de vacinação com ICs foi semelhante ao da vacina intermediária e ao grupo de aves somente desafiado.

## **VACINAS RECOMBINANTES**

Outra tecnologia de vacina que também pretende atuar diminuindo o efeito dos AMs é a utilização de vacinas recombinantes que utilizam um vetor (que pode ser composto por uma cepa viral não causadora de doenças) expressando genes responsáveis pela resposta imune efetiva contra o vírus desejado (Hsieh et al., 2010; Gardin et al., 2011).

Avanços na biologia molecular e genética nos anos 70 iniciaram o desenvolvimento de tecnologia DNA recombinante. Desde então, o impacto desta tecnologia é tal que ela desempenha um papel vital na investigação científica, bem como no diagnóstico e tratamento de doenças (OIE, 2011b). Os objetivos da tecnologia DNA recombinante inclui identificar, isolar, modificar e re-expressar genes em outros hospedeiros ou organismos.

Chang et al. (2003) utilizaram essa proteína amplificada, utilizando como vetor um plasmídeo eucariótico (pCR3.1) sob forma de vacina, inoculadas em pintos de 1 dia. Aos 21 dias estes animais foram submetidos a desafio com IBDV padrão, onde se verificou que as aves vacinadas não apresentaram sinais clínicos de IBD (mortalidade e atrofia de BC) demonstrando proteção contra a ação do vírus.

A via de aplicação do IBDV também pode ocasionar interferência na resposta protetora contra o patógeno. Sheppard et al. (1998) usando também um adenovírus (FAV 10) expressando VP2 do IBDV inoculou este vírus em aves utilizando como via de acesso o saco conjuntival e não detectou anticorpos contra VP2 nestas aves. Porém este autor utilizando vacinação por via sistêmica (intravenosa, intraperitoneal,

subcutânea ou intramuscular) dessa mesma vacina experimental conseguiu altos títulos de Acs neutralizantes e protegeu as aves contra o desafio viral. Segundo esse autor a vacinação de frangos via saco conjuntival é essencialmente um tipo de vacinação oral, pois o fluido é drenado para a cavidade naso-faríngea sendo engolido pela ave, e neste caso a ineficiência do FAV-10 em cruzar o trato gastrintestinal ocorreu provavelmente devido a diferenças nas regiões de ligação dos receptores celulares presentes na mucosa intestinal. Entretanto na vacinação sistêmica o FAV-10 conseguiu se ligar e infectar as células de outros órgãos e subsequentemente replicar.

Como ainda não está muito claro a ação destas diferentes tecnologias de vacinas contra a IBD é importante que mais estudos sejam realizados para se conhecer melhor os efeitos do uso destas tecnologias sob situações reais de campo, como por exemplo, o período de contato da ave com o agente viral relacionado a resposta imune das aves principalmente.

## **CONSIDERAÇÕES FINAIS**

A IBD é uma das mais importantes doenças imunossupressoras de aves de produção. Conforme as pesquisas se intensificam mais os mecanismos de invasividade do vírus e ativação da resposta imune vão sendo conhecidos.

A vacinação ainda é o método de escolha para proteção dos plantéis contra a IBD, principalmente no que tange a redução dos efeitos imunossupressores e perdas econômicas da indústria. É importante que se busque informações consistentes sobre a heterogeneidade das estirpes de IBDV presentes em uma determinada região, pois ainda existem vacinas que não são capazes de gerar proteção contra algumas cepas variantes de campo.

Na avaliação da efetividade de um programa vacinal normalmente leva-se em conta a imunidade humoral (título de Acs) que conhecidamente tem papel fundamental na proteção das aves contra o IBDV, mas já se sabe que a imunidade celular também pode ter papel importante na eliminação e controle do IBDV durante infecções de campo. Assim se faz necessário identificar e comparar as alterações na resposta imune celular levando em conta os principais tipos de vacinas atualmente utilizados a campo, podendo assim identificar outras rotas de proteção ativadas pela vacinação. O período de contato das aves com o IBDV também pode determinar diferentes formas de apresentação da doença, desta forma é de grande importância avaliar se aves vacinadas e não vacinadas podem apresentar essas diferenças tanto na resposta imune humoral quanto celular.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALAM, J.; RAHMAN, M.M.; SIL, B.K. et al.. Effect of maternally derived antibody on vaccination against infectious bursal disease (Gumboro) with live vaccine in broiler. **International Journal of Poultry Science** 1(4):98-101, 2002.

ALBINI, B.; WICK, G. Delineation of B- and T-lymphoid cells in the chicken. **Journal of Immunology**, 112:444-450, 1974.

AVISITE. Vaxxitek HVT+IBD atinge a marca de 28 milhões de frangos de corte imunizados. **Avisite, Clippings - Empresas**, 30/11/2012. 2012. Disponível em: <<http://www.avisite.com.br/clipping/index.php?codclipping=20013>>, acesso em 21/03/2013.

BANDA, A; VILLEGAS, P. Genetic Characterization of Very Virulent Infectious Bursal Disease Viruses from Latin America. **Avian Diseases** 48(3):540-549, 2004.

BARBOSA, T.M.C.; TURPIN, E.; VERDI, R. et al. Caracterización Molecular del Virus de La Enfermedad de Gumboro en Casos Diagnosticados en América Latina em 2010. In: XXII Congresso Latinoamericano de Avicultura, 2011, **Anais...** Buenos Aires - Argentina, 2011.

BAYLISS, C. D., PETERS, R. W., COOK, J. K. A. et al. (1991). A recombinant fowlpox virus that expresses the VP2 antigen of infectious bursal disease virus induces protection against mortality caused by the virus. **Archives of Virology** 120:193-205, 1991.

BECHT, H., MULLER, H.; MULLER, H. K. Comparative studies on structural and antigenic properties of two serotypes of infectious bursal disease virus . **Journal of General Virology** 69:631-40, 1988.

BERNARDINO, A. Controle da Doença de Gumboro – Proposta Fort. Dodge.in: II SIMPÓSIO DA DOENÇA DE GUMBORO, **Anais...** Campinas, pp.143 – 156, 2001.

BERNARDINO, A. Programas de Vacinação. In: MENDES, A.A.; NÄÄS, I.A.; MACARI, M. **Produção de Frangos de Corte**. Campinas: Fundação APINCO de Ciência e Tecnologia Avícolas, pp. 179-203, 2004.

BERNARDINO, A.; LEFFER, E. Doença Infecciosa da Bolsa de Fabrício. In: BERCHIERI JÚNIOR, et al. **Doenças das Aves**, 2 ed. Campinas: Fundação APINCO de Ciência e Tecnologia Avícolas, pp. 651-673, 2009.

BÖHLKE, M. Imunosupressão induzida pela malária: existe um papel para o óxido nítrico? **Revista Brasileira de Alergia e Imunopatologia** 22(6):173-178, 1999.

BOYD, R.L.; WARD, HA. Lymphoid antigenic determinants of the chicken. Cellular representation and tissue localization. **Immunology**, 34:9-17, 1978.

BUBLOT, M.; PRITCHARD, N.; LE GROSS, F.X. et al. Use of vectored vaccine against Infectious Bursal Disease of Chickens in the face of high-titred maternally derived antibody. **Journal of Comparative Pathology** 137:81-84, 2007.

CAO, Y.C., YEUNG, W.S., LAW, M. et al. Molecular characterization of seven Chinese isolates of infectious bursal disease virus: classical, very virulent, and variant strains. **Avian Diseases** 42:340–351, 1998.

CARBALLEDA, J.M.; ZOTH, S.C.; GOMEZ, E. et al. Activation of the immune response against Infectious Bursal Disease Virus after intramuscular inoculation of an intermediate strain. **Immunobiology** 216:1028-1033, 2011.

CAVANAGH, D. Recent Advances in Avian Virology. **British Veterinary Journal** 148:199, 1992.

CHANG, H.C.; LIN, T.L.; WU, C.C. DNA vaccination with plasmids containing various fragments of large segment genome of infectious bursal disease virus. **Vaccine** 21(5-6): 507-513, 2003.

CHEN, H.Y., ZHOU, Q., ZHANG, M.F. et al. Sequence analysis of the VP2 hypervariable region of nine infectious Bursal disease virus isolates from Mainland China. **Avian Diseases** 42:762-769, 1998.

CORLEY, M.; GIAMBRONE, J.J.; DORMITÓRIO, T.V. Evaluation of the immune response and detection of infectious bursal disease viruses by Reverse Transcriptase – Polymerase Chain Reaction and Enzyme-Linked Immunosorbent Assay after in ovo vaccination of commercial broilers. **Avian Diseases** 46: 803-809, 2002.

COSGROVE, A.S. An apparently new disease of chickens-avian nephrosis. **Avian Diseases** 6:385-389, 1962.

DEGEN, W.G.J.; DAAL, N.; ROTHWELL, L.; KAISER, P.; SCHIJNS, V.E.J.C. Th1/Th2 polarization by viral and helminth infection in birds. **Veterinary Microbiology**, 105:163–167, 2005

DE WIT, J.J. Gumboro Disease: Estimation of optimal time of vaccination by the Deventer formula. Proceedings of the 3rd meeting of working group 3 of COST action 839: passive protection and vaccination (current and future possibilities) in the presence of maternally derived antibody, **Pulawy**, pp: 21-28, 2001.

DI FABIO, J. Diagnóstico Sorológico da Doença de Gumboro. In: II Simpósio da Doença de Gumboro, 2001, **Anais...** Campinas: FACTA, pp. 78-91, 2001.

DI FÁBIO, J. A doença de gumboro, formas de controle e como avaliar a proteção. In: III SIMPÓSIO DE SANIDADE AVÍCULA DA UFSM, 2002 Santa Maria, RS. **Anais...** Santa Maria, pp. 16-19, 2002.

ETERRADOSSI, N.; SAIF, Y.M.; Infectious Bursal Disease. In: SAIF, Y.M. et al. **Diseases of Poultry**, 12 ed. Blackwell Publishing, pp.185-208, 2008.

FAHEY, K. J.; CROOKS, J. A conformational immunogen on VP2 of infectious bursal disease virus that induces virus-neutralizing antibodies that passively protect chickens. **Journal of General Virology**, 70:1473-1481, 1989.

FERNANDES, M.J.B. Identificação Molecular do Virus da Doença de Gumboro. **Instituto Biológico**. SP. 2012. Disponível em: <[http://www.biologico.sp.gov.br/artigos\\_ok.php?id\\_artigo=140](http://www.biologico.sp.gov.br/artigos_ok.php?id_artigo=140)>, acesso em 20/03/2012.

GAO, L.; QI, X.; LI, K. et al. Development of a tailored vaccine against challenge with very virulent infectious bursal disease virus of chickens using reverse genetics. **Vaccine**, 29: 5550-5557, 2011.

GARDIN, Y. Gumboro: Cepas muito virulentas – patogenia e controle. In: CONFERÊNCIA APINCO DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA AVÍCOLA, Campinas. **Anais...** Campinas – Brasil, pp.59-78, 2000.

GARDIN, Y.; PALYA, V.; SESTI, L. et al. Hallazgos recientes de la enfermedad de Gumboro: los lotes mal vacunados no están protegidos!. In: XX Congresso Latinoamericano de Avicultura, 2007. **Anais...** Porto Alegre – Brasil, pp. 125-131, 2007.

GARDIN, Y.; PALYA, V.; CAZABAN, C. et al. Vaccines and Vaccinations Against Gumboro Disease: The Key Points. In: XXII Congresso Latinoamericano de Avicultura, 2011. **Anais...** Buenos Aires – Argentina, 2011.

GELB JR., J.; JACKWOOD, D.J.; MUNDT, E. et al. Characterization of Infectious Bursal Disease Viruses Isolated in 2007 from Delmarva Commercial Broiler Chickens. **Avian Diseases** 56(1):82-89, 2012.

HIRAI, K.; SHIMAKURA, S.; KAWAMOTO, E. et al. The immunodepressive effect of Infectious Bursal Disease Virus in Chickens. **Avian Diseases** 18:50-57, 1974.

HOWIE, R.; THORSEN, J. An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for infectious bursal disease virus. **Canadian Journal of Comparative Medicine** 45:51-55, 1981.

HSIEH, M.K., WU, C.C.; LIN, T.L. DNA-mediated vaccination conferring protection against infectious bursal disease in broiler chickens in the presence of maternal antibody. **Vaccine** 28:3936-3943, 2010.

JAGADISH, M. N., VAUGHAN, P. R., IRVING, R. A. et al. Expression and characterization of infectious bursal disease virus polyprotein in yeast . **Gene** 95:179-86, 1991.

JEURISSEN, S.H.M.; JANSE, E.M.; LHERBACH, P.R. et al. The working mechanism of an immune complex vaccine that protects chickens against infectious bursal disease. **Immunology**. 95:494-500, 1998.

KIBENGE, F. S. B.; DHILLOW A. S; RUSSEL, R.G. Biochemistry and immunology of infectious bursal disease virus **Journal of General Virology** 69:1757-1775, 1988.

KIM, I.J.; KARACA, K., PERTILE, T.L. et al. Enhanced expression of cytokine genes in spleen macrophages during acute infection with infectious bursal disease virus in chickens. **Veterinary Immunology and Immunopathology**. 61:331–341, 1998.

KIM, I.J.; GAGIC, M.; SHARMA, J.M. Recovery of antibody-producing ability and lymphocyte repopulation of bursal follicles in chickens exposed to infectious bursal disease virus. **Avian Diseases** 43:401–413, 1999.

KIM, I.J.; SHARMA, J.M. IBDV-induced bursal T lymphocytes inhibit mitogenic response of normal splenocytes. **Veterinary Immunology and Immunopathology** 74:47–57, 2000.

KHATRI, M.; PALMQUIST, J.M.; CHA, R.M. et al. Infection and activation of bursal macrophages by virulent infectious bursal disease virus. **Virus Research** 113:44–50, 2005.

KHATRI, M.; SHARMA, J.M. Susceptibility of chicken mesenchymal stem cells to infectious bursal disease. **Journal of Virological Methods** 160:197-199, 2009.

KOUWENHOVEN B. El control de la enfermedad de gumboro muy virulenta en Holanda. **World Poultry - suplemento**, pp.15-16, 1995.

KUMAR, K.; SINGH, K.C.P.; PRASAD, C.B. Immune response to intermediate strain IBD vaccine at different levels of maternal antibody in broiler chickens. **Tropical Animal Health and Production**, 32:357-360, 2000.

LE GROS, FX; DANCER, A; GIACOMINI, C. et al. Field efficacy trial of a novel HVT-IBD vector vaccine for 1-day-old broilers. **Vaccine** 27:592-596, 2009.

LIU, M.; VAKHARIA, V.N. Nonstructural protein of infectious bursal disease virus inhibits apoptosis at the early stage of virus infection. **Journal of Virology** 80:3369–3377, 2006.

LUKERT, P.D.; SAIF, Y.M. Infectious bursal Disease. In: ALNAK, B.W.; BARNES, H.J.; BEARD, C.W.; YODER, H.W. **Diseases of Poultry**. 9.ed. Ames: Iowa State University Press, pp. 648-663, 1991.

LUKERT, P.D., SAIF, Y.M. Infectious bursal disease virus. In: SAIF, Y.M et al. **Diseases of Poultry**, 11 ed. Ames: Iowa State University Press, pp. 161–179, 2003.

MACREADIE, I. G., VAUGHAN, P. R., CHAPMAN, A. J., et al. Passive protection against infectious bursal disease virus by viral VP2 expressed in yeast . **Vaccine** 8:549-552, 1990.

MAPA - MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. Lista de Produtos com Licenças Vigentes 03/2013. **Coordenação de Fiscalização de Produtos Veterinários - Relatório de Produtos com Licença Vigente**, pp.1-196, 2013. Disponível em: <[http://www.agricultura.gov.br/arq\\_editor/file/Registros\\_Autorizacao/listas%20de%20produtos/RPROVIG03.pdf](http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/file/Registros_Autorizacao/listas%20de%20produtos/RPROVIG03.pdf)>, acesso em 20/03/2013.

MCFERRAN, J.B.; MCNULTY, M.S.; MCKILLOP, E.R.; CONNER, T.J.; MCCRECKEN, R.M.; COLLINS, D.S., ALLAN, G.M. Isolation and serological studies with infectious bursal disease viruses from fowl, turkey and duck: Demonstration of a second serotype. **Avian Pathology** 9:395-404, 1980.

MORAES, H.L.S. **Doença Infecciosa Bursal: Estudo sobre amostras vacinais e de campo, imunidade maternal e desafio com amostra muito virulenta do vírus.** 2004. Porto Alegre, 95f. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias) – Curso de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

MÜLLER, H., MD. R., ISLAM, R., RAUE. Research on infectious bursal disease - the past, the present and the future. **Veterinary Microbiology** 97:153–165, 2003.

NAKANO, M.; PORTUGAL, M.A.S.C.; SALIBA, A.M. et al. A ocorrência de doença de Gumboro no Brasil. Diagnóstico anatomopatológico. **Biológico** 38:60-66, 1972.

OKOYE, J. O. A.; UZOUKWU, M. Pathogenesis of infectious bursal disease in embryonally bursectomised chickens. **Avian Pathology** 19:555-69, 1990.

OLÁH, I., VERVELDE, L. Structure of the avian lymphoid system. In: DAVISON, F., KASPERS, B., SCHAT, K.A. **Avian Immunology**, 1st ed. Academic Press, Elsevier Ltd., pp. 13–50, 2008.

OIE. Infectious Bursal Disease (Gumboro Disease). In: **Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals 2008**. 6th ed., ch. 2.3.12, pp. 549-565, 2011a. Disponível em: <[http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health\\_standards/tahm/2.03.12\\_IBD.pdf](http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.03.12_IBD.pdf)>, acesso em 07/04/2012.

OIE. Biotechnology in the Diagnosis of Infectious Diseases and Vaccine Development. In: **Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals 2008**. 6th ed., ch. 1.1.7., pp. 1-25, 2011b. Disponível em: <[http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health\\_standards/tahm/1.1.07\\_BIOTECHNOLOGY.pdf](http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/1.1.07_BIOTECHNOLOGY.pdf)>, acesso em 07/04/2012.

PEJKOVSKI, c., DAVELLAR, F.G., KOUWENHOVEN, B. Immunosuppressive effect of infectious disease virus on vaccination against infectious bronchitis. **Avian Pathology** 8:95-106, 1979.

PETERS, M.A., LIN, T.L.; WU, C.C. Infectious bursal disease virus polyprotein expression arrests growth and mitogenic stimulation of B lymphocytes. **Archives of Virology** 149:2413-2426, 2004.

RAUTENSCHLEIN, S.; YEH, H.Y.; SHARMA, J.M. The role of T cells in protection by an inactivated infectious bursal disease virus vaccine. **Veterinary Immunology and Immunopathology** 89:159-167, 2002.

RAUTENSCHLEIN, S.; YEH, H.Y.; SHARMA, J.M. Comparative immunopathogenesis of mild, intermediate, and virulent strains of classic infectious bursal disease virus. **Avian Diseases** 47:66-78, 2003.

RESENDE, F.M.S.; GALVÃO, C.Z.; RIOS, R.L. et al. Efeito da Fermentação da Cama de Aviário sobre a Infecciosidade dos Vírus das Doenças de Newcastle e Gumboro. In: Conferência APINCO 2010 de Ciência e Tecnologia Avícolas, 2010. **Anais...** Santos – Brasil, 2010.

RODRIGUEZ-LECOMPTE, J.C., NINO-FONG, R., LOPEZ, A. et al. Infectious bursal disease virus (IBDV) induces apoptosis in chicken B cells. **Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases** 28:321-337, 2005.

RODENBERG, J.K., SHARMA, J.M., BELZER, S.W. et al. Flow cytometric analysis of B cell and T cell subpopulations in specific-pathogen-free chickens infected with infectious Bursal disease virus. **Avian Diseases** 38:16-21, 1994.

SCHAT K.A.; SKINNER, M.A. Avian Immunosuppressive Diseases and Immune Evasion. In: DAVISON, F.; KASPERS, B.; SCHAT, K.A. **Avian Immunology**, 1st ed. Academic Press, Elsevier Ltd. pp. 299-322, 2008.

SCHIJNS, V.E.J.C.; SHARMA, J.; TARPEY, I. Practical Aspects of Poultry Vaccination. In: DAVISON, F., KASPERS, B., SCHAT, K.A. **Avian Immunology**, 1st ed. Academic Press, Elsevier Ltd., pp. 373–393, 2008.

SHARMA, J.M.; DOHMS, J.E.; METZ, A.L. Comparative pathogenesis of serotype 1 and variant serotype 1 isolates of infectious bursal disease virus and their effect on humoral and cellular immune competence of specific pathogen-free chickens. **Avian Diseases**, 33:112-124, 1989.

SHARMA, J.M.; KIM, I.J.; RAUTENSCHLEIN, S. et al. Infectious bursal disease virus of chickens: pathogenesis and immunosuppression. **Developmental & Comparative Immunology** 24(2-3): 223-235, 2000.

SHEPPARD, M.; WERNER, W.; TSATAS, E. et al. Fowl adenovirus recombinant expressing VP2 of infectious bursal disease virus induces protective immunity against bursal disease. **Archives of Virology** 143:915-930, 1998.

SILVA, F.M.F.; VIDIGAL, P.M.P.; MYRRHA, L.W.; FIETTO, J.L.R.; SILVA JR., A.; ALMEIDA, M.R. Tracking the molecular epidemiology of Brazilian Infectious bursal disease virus (IBDV) isolates. **Infection, Genetics and Evolution** 13:18-26, 2013.

SNYDER, D.B. Changes in the Field status of Infectious Bursal Disease Virus. **Avian Pathology** 19:419-423, 1990.

SPIILKI, F.R.; OLIVEIRA, L.K.; VECCHIA, A.D. et al. Detecção e Desinfecção de Vírus em Dejetos de Ruminantes. **Revista de Conhecimento Online**, 1 (1):1-11, 2009. Disponível em: <<http://www.feevale.br/site/files/documentos/pdf/32677.pdf>>, acesso em 20/03/2013.

SWAGGERTY, C.L., KOGUT, M.H., FERRO, P.J. et al. Differential cytokine mRNA expression in heterophils isolated from Salmonella resistant and -susceptible chickens. **Immunology** 113:139-148, 2004.

TESSARI, E. N. C.; CARDOSO, A. L. S. P.; CASTRO, A. G. M. et al. Avaliação sorológica comparativa entre dois esquemas de vacinação contra D.I.B. (Doença Infecciosa da Bursa). **Arquivo Instituto Biológico** 67(2):161-165, 2000.

VAN DEN BERG, T.P., ETERRADOSSI, N., TOQUIN, D. et al. 2000. Infectious bursal disease (Gumboro disease). **Revue Scientifique et Technique** 19:509-543, 2000.

VAN DER BERG, T.P. Acute infectious bursal disease in poultry:a review. **Avian Pathology**; 29(1):175-194, 2000.

VARGAS, G. D.; FISHER, G.; HÜBNER, S. et al. Ocorrência da Doença de Gumboro em Frangos de Corte no Sul do Brasil. In: XX Congresso Latinoamericano de Avicultura, XX, 2007. **Anais...** Porto Alegre – Brasil, pp. 191-193, 2007.

VERVELDE, L., DAVISON, T.F. Comparison of the in situ changes in lymphoid cells during infection with infectious bursal disease virus in chickens of different ages. **Avian Pathology** 26: 803-821, 1997.

VIDAL K.A.; ICOCHEA, A.D'A., PERALES, R.C. et al. Evaluación de dos vacunas comerciales conteniendo el complejo antígeno anticuerpo contra La infección bursal em pollos de carne. **Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú**, 20 (1):90-101, 2009.

WILLIAMS, A.E.; DAVISON, T.F. Enhanced immunopathology induced by very virulent infectious bursal disease virus. **Avian Pathology** 34(1):4-14, 2005.

WINTERFIELD, R.W.; THACKER, H.L. Immune Response and Pathogenic of Different Strains of Infectious Bursal Disease Virus Applied as Vaccines. **Avian Diseases** 5:253-260, 1978.

WINTERFIELD, R.W.; DHILLON, A.S.; THACKER, H.L. et al. Immune response of white Leghorn chicks from vaccination with different strains of infectious bursal disease virus and in the presence of maternal antibodies. **Avian Diseases** 24:179-188, 1980.

YAO, K., GOODWIN, M.A.; VAKHARIA, V.N. Generation of a mutant infectious bursal disease virus that does not cause bursal lesions. **Journal of Virology** 72:2647-2654, 1998.

YAO, K.; VAKHARIA, V.N. Induction of apoptosis *in vitro* by the 17-kDa nonstructural protein of infectious bursal disease virus: possible role in viral pathogenesis. **Virology** 285:50-58, 2001.

ZERYEHUM, T.; BEJO-HAIR, M.; RASEDEE, A. Hemorrhagic and Clotting Abnormalities in Infectious Bursal Disease in Specific-Pathogen-Free Chicks. **World Applied Sciences Journal** 16(1):1123-1130, 2012.

ZHOU, X.; WANG, D.; XIONG, J. et al. Protection of chickens, with or without maternal antibodies, against IBDV infection by a recombinant IBDV-VP2 protein. **Vaccine** 28: 3990-3996, 2010.

## **CAPÍTULO 2**

**COMPARAÇÃO DA RESPOSTA IMUNOLÓGICA DE AVES  
VACINADAS OU NÃO COM IMUNO COMPLEXOS DO VÍRUS  
DA DOENÇA DE GUMBORO DESAFIADAS AOS 21 OU 28  
DIAS DE IDADE COM UMA CEPA FORTE**

## **Comparação da Resposta Imunológica de Aves Vacinadas ou Não com Imuno Complexos do Vírus da Doença de Gumboro, Desafiadas aos 21 ou 28 dias de Idade com uma Cepa Forte**

*(Comparison of Immune Response of Birds Vaccinated or Not with Immune Complexes of Gumboro Disease Virus Challenged at 21 or 28 days of age with a strong strain)*

Patrick Westphal Ferreira

### **RESUMO**

A imunossupressão causada pela Doença de Gumboro continua sendo uma constante causa de perdas para a avicultura moderna. Novas tecnologias em vacinas vêm sendo desenvolvidas com o objetivo de reduzir essas perdas e proteger o plantel avícola. O objetivo deste estudo foi avaliar a resposta imune-patológica de aves vacinadas ou não com imuno complexos (ICs) do vírus de Gumboro desafiadas com uma cepa vacinal forte Moulthrop G603 em diferentes períodos (21 ou 28 dias de vida). Foram realizadas análises macroscópicas e histológicas da bolsa cloacal (BC) e avaliação da presença de células imunológicas com uso de imunistoquímica no baço (linfócitos B, T CD4+ e CD8+) e BC (linfócitos T CD3+) e de citometria de fluxo no sangue (linfócitos B, T CD4 de mucosa e T CD8 ativados). As análises realizadas aos 35 dias de vida mostraram que aves desafiadas aos 28 dias apresentaram maior área de BC, maior área de linfócitos T CD4+ e relação CD4:CD8 em baço, porém menor concentração de linfócitos T CD4+ de mucosa e Linfócitos B circulantes comparadas a aves desafiadas aos 21 dias ( $P < 0,05$ ). Aves vacinadas mostraram menor área de BC e menor concentração de linfócitos T CD8+ em baço comparadas a aves não vacinadas.

**Palavras-Chave:** IBDV, linfócito T, bolsa cloacal, imuno complexos.

**ABSTRACT**

Immunosuppression induced by Gumboro Disease remains a constant cause of losses for the modern poultry. New technologies in vaccine design have been developed in order to reduce these losses and protect the poultry flock. The aim of this study was to evaluate the immune-pathological response of birds vaccinated or not with immune complexes (ICs) of Gumboro Disease virus challenged with a strong vaccine strain Moulthrop G603 in different periods (21 or 28 days). Were performed macroscopic and histological analyzes of the cloacal bursa (BC) and to evaluate the presence of immune cells; immunohistochemical analyzes in the spleen tissue (B lymphocytes, T CD4+ and T CD8+ lymphocytes) and BC (T CD3+ lymphocytes) and flow cytometry to evaluate the blood immune cell subpopulations (B lymphocytes, mucosal T CD4+ and activated T CD8+ lymphocytes). The analyzes performed at 35 days showed that birds challenged at 28 days had a larger area of BC, the largest area of T CD4+ lymphocytes and CD4:CD8 ratio in the spleen, but lower concentrations of mucosal T CD4+ cells and B lymphocytes circulating compared to birds challenged at 21 days ( $P < 0,05$ ). Vaccinated birds showed lower BC area and lower concentration of T CD8+ cells in spleen compared to unvaccinated birds.

**Keywords:** IBDV, T lymphocyte, cloacal bursal, immune complex.

## INTRODUÇÃO

As doenças imunossupressoras ainda são constante causa de perdas econômicas para a avicultura moderna. Dentre estas, a Doença Infecciosa da Bolsa Cloacal (IBD) ou Doença de Gumboro, é uma das mais importantes doenças virais em frangos (Gardin et al., 2011). O agente IBDV (*Infectious Bursal Disease Virus*) é muito resistente no ambiente sendo uma das razões para sua persistência nas instalações avícolas (Etteradossi & Saif, 2008).

A IBD é uma das doenças economicamente mais importantes que afetam a produção comercial de frangos ao redor do mundo (Muller et al., 2012). O impacto econômico relacionado com essa doença inclui perdas devido à morbidade e mortalidade, assim como, a imunossupressão que predispõe as aves a outros patógenos e falhas vacinais. As perdas também são influenciadas pela patogenicidade da estirpe viral e a suscetibilidade do plantel avícola ao agente, além do ambiente e das práticas de manejo (Khatri et al., 2005; Ashraf, 2005).

Além disso, a patogênese e a resposta imune para o IBDV pode variar dependendo da idade da ave afetada e da maturidade do seu sistema imune (Rautenschlein et al., 2007). O vírus pode causar mortalidade de 20% ou mais em frangos a partir de três semanas de idade, e mais importante, pode causar uma severa e prolongada imunossupressão em frangos infectados precocemente, resultando em infecções secundárias nos plantéis não protegidos (Corley et al., 2002; Lukert & Saif, 2003; Balamurugan & Kataria, 2006; Schat & Skinner, 2008). Estudos com foco na patogênese comparando diferentes grupos de idade sobre condições experimentais são limitados (Nakamura et al., 1992; Rautenschlein & Haase, 2005). Está bem estabelecido que em aves com mais de duas semanas de idade, a infecção com IBDV induz um acúmulo de linfócitos T na Bolsa Cloacal (BC),

o alvo principal do vírus, coincidindo com a replicação viral (Rautenschlein et al., 2007). Estas são células T intrabursais ativadas e com papel possivelmente relacionado ao *clearance* viral e, conseqüentemente na recuperação bursal (Sharma et al., 2000; Willians & Davison, 2005; Carballeda et al., 2011).

Rautenschlein & Haase (2005) em seus estudos mostraram que a atividade das células T pode variar em grupos por idade. Aves vacinadas *in ovo* com uma cepa intermediária de IBDV não mostraram ou atrasaram o acúmulo de células T na bolsa cloacal em comparação com aves vacinadas aos 14 dias pós-inoculação. Além disso, aves vacinadas *in ovo* se recuperaram mais rapidamente das lesões induzidas pelo IBDV na bolsa cloacal que aves vacinadas pós-nascimento.

O controle desta enfermidade é realizado principalmente por meio de programas de biossegurança e vacinação em matrizes e frangos de corte, deixando o sistema imune das aves preparado para um possível contato com o agente viral de campo. Porém mesmo a vacinação com vírus atenuado pode levar a imunossupressão (Sahar et al., 2004), principalmente relacionado à depleção de BC. Tal imunossupressão, pode se refletir em perdas econômicas no final da cadeia produtiva. Além disso, a vacinação de frangos de corte pode sofrer efeito de anticorpos maternos (AMs), impedindo ou diminuindo seu potencial de gerar uma resposta imune efetiva.

A interferência dos AMs com a inoculação da vacina ainda permanece como maior problema na vacinação contra IBD com vacinas vivas (Block et al., 2007), embora sua função na proteção dos pintinhos nas primeiras semanas de vida seja muito importante. Com intuito de auxiliar na prevenção da IBD de forma mais efetiva, novas tecnologias e vacinas de segunda geração têm sido desenvolvidas e introduzidas no mercado (Meeusen et al., 2007), como vacinas recombinantes ou o

vírus associado a Acs (imuno complexos) podendo reduzir problemas relacionados com lesão de bolsa cloacal e imunidade materna, mantendo a doença sob controle (Fernandes, 2012).

Estudos têm sido conduzidos avaliando a resposta imunológica de aves desafiadas com a doença de Gumboro, indicando que a patogênese do IBDV poderia variar dependendo da idade da ave infectada, as razões para essa diferença ainda não são claras e existem poucos estudos comparando diferentes períodos de desafio, e se existem ou não interferência da vacinação na ação do IBDV.

O presente estudo foi desenvolvido com o objetivo de comparar a dinâmica de células imunológicas, no sangue e tecidos, de aves desafiadas em diferentes períodos de vida com uma estirpe forte de IBDV, submetidas ou não a vacinação com imuno complexos (ICs) do vírus vivo da doença de Gumboro.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### **Animais e Ambiente**

Foram alojados 100 pintinhos, machos provenientes de matrizes linhagem fêmeas (Cobb®), do 1° ao 35° dia de idade, divididas em um experimento fatorial 2X2, composto por dois tratamentos (aves vacinadas com ICs ou não) e dois períodos de desafio (21 ou 28 dias) de acordo com a tabela 1.

**Tabela 1.** Descrição do delineamento experimental e tratamentos.

Tratamentos	Desafio*	
	21 dias	28 dias
Não Vacinado (N/V)	B1	B3
Vacinado (V)**	B2	B4

\*Desafio com dose dupla de vacina comercial Bursa-Vac® contra doença de Gumboro composta pela cepa Moulthrop G603 (cepa forte), via ocular.

\*\*Grupo Vacinado: CEVAC® Transmune IBD é composta pela cepa Winterfield 2512 G-61, da Doença Infecciosa Bursal, vírus vivo no complexo de anticorpos IBD, sobre fórmula liofilizada. Utilizando dose recomendada pelo fabricante por via subcutânea ao 1º dia de vida.

A água e o alimento foram fornecidos *ad libitum* e consistiu de dieta balanceada à base de milho e soja formulada conforme recomendado pelo NRC (1994).

As aves foram pesadas individualmente no primeiro dia para que ocorresse a distribuição proporcional em relação ao peso corporal entre os tratamentos, permitindo parcelas iguais entre os mesmos. Cada tratamento foi alojado em salas idênticas com pressão negativa e com temperatura controlada de acordo com a fase de desenvolvimento das aves. Todas as salas passaram por processo de limpeza e desinfecção prévia e a cama de maravalha utilizada foi previamente esterilizada em autoclave 121°/15 minutos. Esse experimento foi conduzido com a aprovação do Comitê de Ética Animal do Setor de Ciências Agrárias da UFPR, Protocolo nº 020/2011.

Ao primeiro dia foram coletados soros de 20 aves para avaliação de anticorpos contra Doença de Gumboro, visando identificar a imunidade materna transferida aos pintinhos.

### **Vacinação e Desafio**

No alojamento, as aves dos grupos B2 e B4 foram vacinadas com CEVAC® Transmune IBD partida: 902/10, na dose recomendada pelo fabricante e aplicada

sob via subcutânea com auxílio de uma seringa de 1mL, conforme descrito na tabela 1. Essa dose refere-se a 0,1mL de vacina com título mínimo de proteção de 65PD<sub>90</sub> (dose de vacina que protege 90% dos animais desafiados).

As aves foram desafiadas com dose dupla de vacina comercial Bursa-Vac® Intervet® partida: 363/11, contra doença de Gumboro composta com a cepa Moulthrop G603 – cepa forte, via ocular, aos 21 ou 28 dias de idade conforme tratamentos apresentados na Tabela 1. Cada ave recebeu por dose um título médio mínimo de  $2 \times 10^{1,3}$ DIOE<sub>50</sub> (dose Infectante 50% em ovos embrionados), conforme descrição do fabricante.

### **Avaliação Clínica e Macroscópica**

Ao longo de todo o período experimental as aves foram avaliadas diariamente para presença de sinais clínicos e mortalidade.

Aos 35 dias, todas as aves foram eutanasiadas por deslocamento cervical para análise macroscópica dos órgãos (lesões em sacos aéreos, traquéia, fígado, musculatura e rins) também sendo realizada a medição de bolsa cloacal com auxílio de um paquímetro.

As observações macroscópicas foram avaliadas levando em conta lesões típicas da doença de Gumboro previamente descritas por Eterradosi & Saif, 2008, onde o grau de severidade das lesões (GSDG) recebeu maior classificação quanto mais patognomônicas fossem em relação a essa doença. As lesões avaliadas à necropsia receberam escores entre 0 e 3, conforme a intensidade apresentada. Os valores de escores foram multiplicados pelo GSDG estabelecendo um valor máximo para cada tipo de lesão conforme descrito na tabela 2.

**Tabela 2.** Classificação do grau de severidade das lesões macroscópicas avaliadas.

<b>Alteração Patológica</b>	<b>GSDG*</b>	<b>Escore Máximo</b>
Hemorragia Muscular	2	6
Alterações Renais	2	6
Alterações Hepáticas	1	3
Aerossaculite	1	3
Alterações na Traqueia	1	3
<b>Escore final</b>		<b>21</b>

\* GSDG – Grau de severidade relacionado a doença de Gumboro.

- Descrição: O escore para cada lesão foi obtido pela multiplicação do GSDG pelo escore de lesões observadas à necropsia (0 = ausência de lesão, 1 = lesão leve, 2 = lesão moderada e 3 = lesão severa).

- O escore final para as lesões macroscópicas foi obtido por meio da soma dos resultados determinados pelos escores individuais, podendo atingir um máximo de 21 pontos.

## **Histologia**

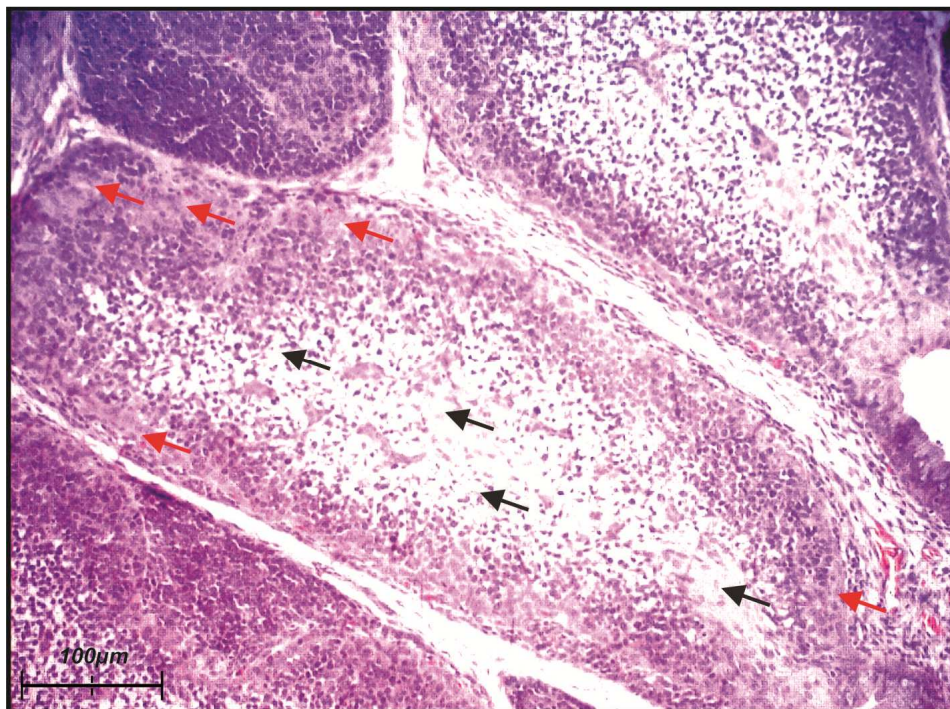
Durante a necropsia foram coletadas bolsas cloacais de 10 aves por tratamento que foram acondicionadas em formol tamponado 10% para análise histológica em coloração de HE de acordo com Luna et al. (1968). Foram avaliados quatro campos por fragmento de bolsa em aumento de 10X em microscópio óptico (Olympus America INC., NY, USA), totalizando 40 avaliações por tratamento. Foram avaliadas levando em conta principalmente, perda de arquitetura tecidual, presença de vacuolização e substituição de tecido normal por tecido conjuntivo (figura 1).

Como todas as aves foram desafiadas, para a análise das alterações histológicas na bolsa cloacal e presença de células CD3+, foi utilizado um grupo controle negativo (B0) não desafiado para comparação.

## **Controle Negativo (B0)**

As aves do controle negativo (B0) eram da mesma origem e linhagem conforme descrito acima, e foram criadas sob as mesmas condições, porém não receberam desafio nem vacinação. O processamento histológico foi o mesmo

realizado nas aves desafiadas, sendo que os resultados da avaliação dos tecidos dessas aves estavam de acordo com os padrões normais descritos na literatura para histologia de bolsa cloacal (Aughey & Frye, 2001; Bacha Jr. & Bacha, 2003).



**Figura 1.** Avaliação de escore de folículo de bolsa cloacal considerando regiões com vacuolização celular (seta preta) e substituição de tecido íntegro por tecido conjuntivo (seta vermelha). Galinha, bolsa cloacal, HE, aumento de 10x.

A metodologia para avaliação histológica da BC foi realizada de acordo com método anteriormente publicado por Kolf-Clauw et al., (2009), adaptado para o tecido da bolsa cloacal. Onde as lesões bursais previamente descritas em literatura receberam escores conforme grau de intensidade de 0-3, multiplicado pelo grau de severidade relacionado à doença de Gumboro (GSDG), estabelecendo-se assim uma pontuação lesional por animal que poderia variar de 0-18, conforme tabela 3.

**Tabela 3.** Classificação dos escores de lesão *versus* grau de severidade das lesões avaliadas em Bolsa Cloacal na Histopatologia.

<b>Alteração Patológica</b>	<b>GSDG*</b>	<b>Escore Máximo</b>
Vacuolização celular, núcleos picnóticos e perda de estrutura dos folículos	3	9
Substituição de tecido íntegro por tecido conjuntivo	3	9
<b>Escore final</b>		<b>18</b>

\* GSDG – Grau de Severidade em relação a Doença de Gumboro

- Descrição: O escore para cada lesão foi obtido pela multiplicação do GSDG pelo escore de lesões observadas à necropsia (0 = ausência de lesão, 1 = lesão leve, 2 = lesão moderada e 3 = lesão severa).

- O escore final para os sinais típicos de IBD no tecido da BC foi obtido por meio da soma dos escores individuais, podendo atingir um máximo de 18 pontos.

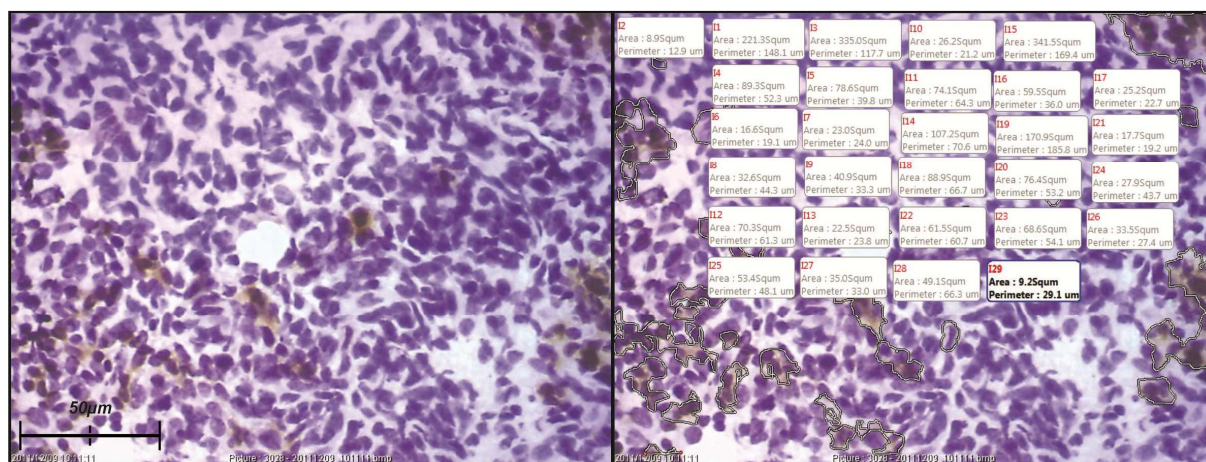
### **Imunoistoquímica**

Para as análises de linfócitos T CD3+, as amostras foram incluídas em parafina, seccionadas com 5µm de espessura e fixadas em lâminas carregadas positivamente. As seções foram desparafinadas em xilol a 60°C por 20 minutos e rehidratadas em água e álcool. A recuperação antigênica foi realizada com Tampão Citrato pH 6,0 em banho-maria a 100°C por 10 minutos e o bloqueio da peroxidase endógena com peróxido de hidrogênio 3% e proteína bloqueadora por 8 minutos. O anticorpo primário utilizado foi Anti-CD3 (CD3 Dako® 1:750), incubado em refrigerador “*overnight*”. Para detecção da reação foram utilizados anticorpos secundários anti-camundongo e anti-coelho combinados num mesmo sistema de amplificação, kit ADVANCE®, por 30 minutos. Para revelação da reação utilizou-se cromógeno, kit DAB®, por 30 segundos. As lâminas foram contra-coradas com Hematoxilina de Meyer, lavadas em água com posterior desidratação e montagem das mesmas.

Para as análises de linfócitos B, T CD4+ e CD8+, as amostras foram incluídas em gel Tissue-Tek O. C. T. (Miles, Elkhart IN, US), congeladas em nitrogênio líquido, seccionadas com 5µm de espessura em um aparelho criostato e fixadas em lâminas carregadas positivamente em acetona 100%. Em seguida foi realizada a re-hidratação com PBS 0,1M pH 7,6, bloqueio da peroxidase endógena com peróxido de hidrogênio 3% por 5 minutos e proteína bloqueadora por 8 minutos. Os anticorpos primários utilizados foram Anti-CD4 (CT-4 Southern Biotech® 1:200), Anti-CD8 (CT-8 Southern Biotech® 1:200) e Anti-Linfócito B (Bu1 Southern Biotech® 1:100) incubados por 90 minutos a 37°C. Para detecção da reação foi utilizado anticorpos secundários anti-camundongo e anti-coelho combinados num mesmo sistema de amplificação, kit ADVANCE®, por 30 minutos. Para revelação da reação utilizou-se cromógeno, kit DAB®, por 30 segundos. As lâminas foram contra-coradas com Hematoxilina de Meyer, lavadas em água com posterior desidratação e montagem das mesmas.

Para a mensuração das quantidades de linfócitos B, células T CD4+ e CD8+, foram analisados 15 campos microscópicos por tratamento em aumento de 40x, onde as subáreas ocupadas pelas células marcadas em marrom recebiam valores por meio de software analisador de imagens (Motic Image Plus 2.0 – Motic China Group Co. 2006), ao final estas subáreas eram somadas obtendo-se a área<sup>2</sup> total ocupada por linfócitos num campo microscópico com área<sup>2</sup> total de 24.100µm<sup>2</sup>, conforme demonstrado na figura 2.

A mensuração das células CD3+ em BC foi realizada por meio de contagem do número de células coradas em campo microscópico de 100x. Foram analisadas contagens de 20 campos/grupo.



**Figura 2.** Exemplo de mensuração de área<sup>2</sup> de linfócitos T CD8+ em baço. Foram avaliados 15 campos microscópicos e as subáreas calculadas pelo software foram somadas para obtenção da área total de linfócitos ocupada em um campo 24.100μm<sup>2</sup>. Galinha, baço, Imunoistoquímica, aumento de 40x.

### Citometria de Fluxo

Foram coletadas amostras de para análise de citometria de fluxo conforme metodologia previamente descrita por Beirão et al. (2012). Sendo realizada coleta de sangue de seis aves por grupo experimental, no 1<sup>o</sup> dia de vida, aos 3 dias antes do desafio (3d AD) e 7 dias pós desafio (7d PD) para avaliar a presença dos linfócitos B, CD4 de mucosa e CD8 ativados circulantes.

As amostras foram analisadas utilizando os anticorpos CD4+TCRVb1+ (CD4 de mucosa), CD8+CD28- (CD8 ativado) e Bu1 (Linfócitos B). Os resultados foram transformados como porcentagem de células positivas em relação ao total de células leucocitárias de cada animal.

### Análise Estatística

Todos os dados coletados foram analisados pelo programa estatístico Statistix 9.0 for Windows Copyright© 2008. Os resultados foram submetidos ao teste de normalidade de Shapiro-Wilk. Somente os resultados de citometria apresentaram distribuição normal e foram analisados como fatorial 2 (vacinações com ICs ou não

vacinados) X 2 (desafiados aos 21 ou aos 28 dias de vida) X 2 (coleta 3d AD ou 7d PD), utilizando ANOVA e em seguida comparados pelo teste de Tukey ( $P < 0,05$ ). Os demais parâmetros analisados não apresentaram distribuição normal, sendo submetidos ao teste não paramétrico de Kruskal-Wallis ( $P < 0,05$ ), analisando-se os animais desafiados aos 21 dias *versus* desafiados aos 28 dias e animais vacinados *versus* não vacinados.

## RESULTADOS

Durante todo o período do experimento não houve sinais clínicos e mortalidades relacionadas à doença de Gumboro, conforme descrito por Eterradossi & Saif, (2008).

As aves apresentaram ao primeiro dia de idade no exame sorológico um título médio de 1.617,21 para doença de Gumboro. Os títulos avaliados foram submetidos à fórmula de Deventer de acordo com De Wit (2001), e mostraram uma boa uniformidade de títulos com cerca de cinco dias de diferença entre a vacinação da ave com menor título para a ave com maior título, a fórmula também mostrou que a data ideal para vacinação com resposta de 75% das aves, com uma vacina do tipo intermediária *plus* seria aos 13 dias de idade, coincidindo com a queda dos anticorpos maternos a níveis que não interferissem com o vírus vacinal.

### **Escores de Lesão Histológica e Infiltração de Linfócitos T CD3+ em BC**

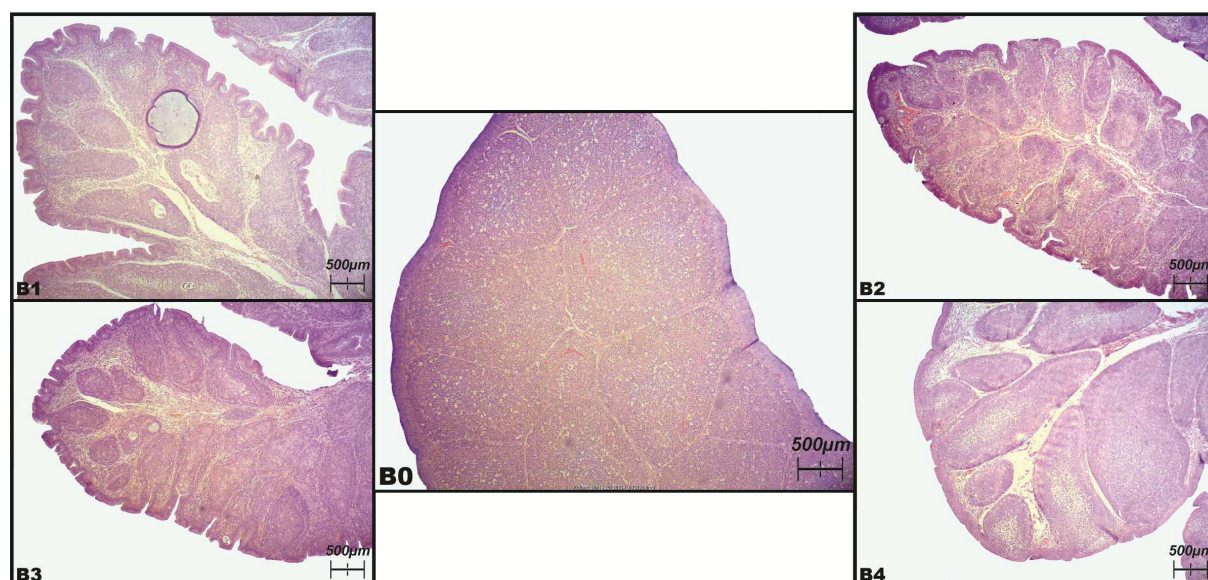
Na tabela 4 encontram-se os resultados das médias referentes ao escore de lesão histológica e quantidade de células T CD3+/campo microscópico (100x) em BC, separados por tratamento, avaliados aos 35 dias de idade das aves. As avaliações de escore foram realizadas de acordo com os padrões definidos e

classificados na tabela 3, onde B0 constitui-se de um controle negativo seguindo os padrões descritos na literatura.

**Tabela 4.** Média e Desvio Padrão dos escores de lesão em Bolsa Cloacal analisadas na histopatologia multiplicado por grau de severidade (GSDG) comparando o desafio aos 21 dias com o desafio aos 28 dias, entre aves vacinadas e não vacinadas, avaliados aos 35 dias de idade das aves.

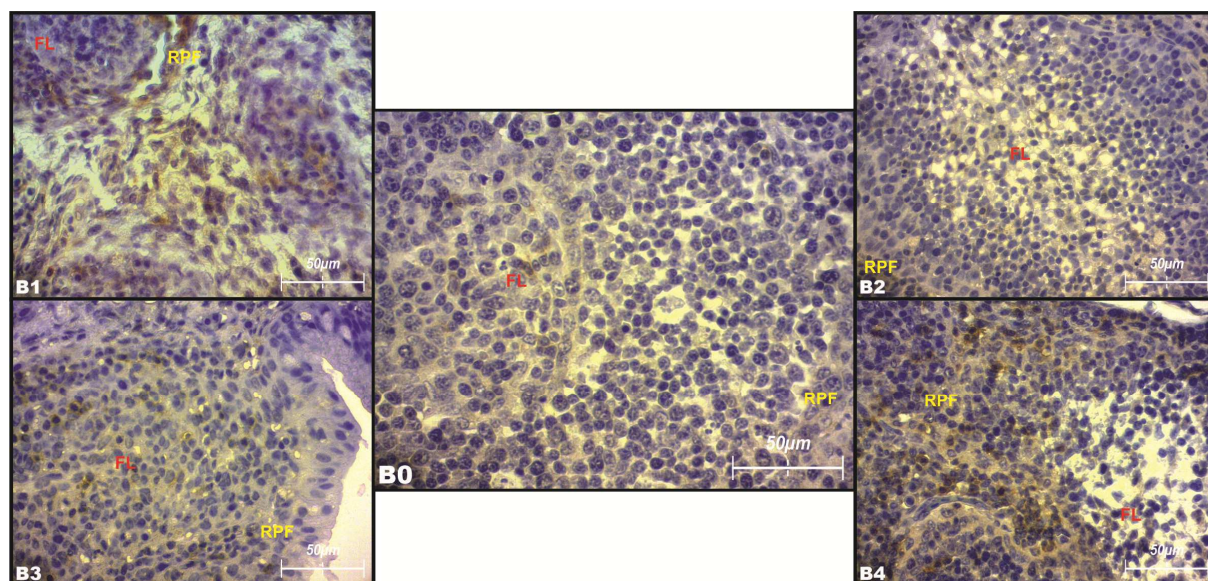
		Tratamento	Escore	Células CD3+/Campo
Desafio	21 dias	Aves não vacinadas e não desafiadas	8,10±2,81	0,75±1,16
		Aves não vacinadas desafiadas	10,35±2,87	38,35±47,37
		Aves vacinadas desafiadas	11,62±2,27	22,90±20,00
	28 dias	Aves não vacinadas desafiadas	11,02±2,66	32,00±19,54
		Aves vacinadas desafiadas	11,32±3,29	40,85±31,93

O B0 apresentou visualmente menor grau de lesões degenerativas, assim como uma menor infiltração de linfócitos T CD3+ em BC, comparado com os demais tratamentos, conforme demonstrado nas figuras 3 e 4.



**Figura 3.** Avaliação dos Escores de bolsa cloacal da Histopatologia. B0: Aves não vacinadas e não desafiadas – sem alterações no tecido bursal, folículos íntegros sem sinal de degeneração celular; B1: sem vacinação e desafio aos 21 dias; B2: vacinação CEVAC® Transmune IBD (SC) e desafio aos 21 dias; B3: sem vacinação

e desafio aos 28 dias e B4: vacinação CEVAC® Transmune IBD (SC) e desafio aos 28 dias – tecido bursal apresentando diversos graus de atrofia de folículos, vacuolização, degeneração folicular e substituição de tecido íntegro por tecido conjuntivo. Galinha, bolsa cloacal, HE, aumento de 4x.



**Figura 4.** Distribuição de Linfócitos T CD3+ em bolsa cloacal aos 35 dias nos diferentes tratamentos. B0 – Aves não vacinadas e não desafiadas – pouca infiltração de células T CD3+ em BC; B1: sem vacinação e desafio aos 21 dias; B2: vacinação CEVAC® Transmune IBD (SC) e desafio aos 21 dias; B3: sem vacinação e desafio aos 28 dias e B4: vacinação CEVAC® Transmune IBD (SC) e desafio aos 28 dias – tecido bursal apresentando maior infiltração de linfócitos T CD3+ tanto na região dos folículos (FL) como na região perifolicular (RPF). Galinha, bolsa cloacal, Imunoistoquímica, aumento de 40x.

### Desafio 21 dias X 28 dias

Na tabela 5 estão representados os resultados comparando os dois diferentes períodos de desafio (21 e 28 dias), referentes à análise macroscópica do estado geral das aves à necropsia, avaliadas e classificadas de acordo com o descrito na tabela 2 e o tamanho em cm<sup>2</sup> de área de BC. Estão também representados os resultados da avaliação histológica, classificados conforme exemplificado na tabela 3, e quantidade de células T CD3+ em BC, assim como a área (µm<sup>2</sup>)/campo microscópico ocupada por linfócitos B, T CD4+ e T CD8+ em baço. Os resultados de escore estão representados sob forma de mediana, os demais resultados sob forma

de média  $\pm$  desvio padrão. Todos os dados apresentados foram comparados pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis ( $P < 0,05$ ).

Estes resultados indicam que as aves desafiadas aos 28 dias apresentaram maior tamanho de BC, e maior concentração de linfócitos T CD4+ em baço e relação CD4/CD8 em comparação com aves desafiadas aos 21 dias. Os demais parâmetros avaliados não apresentaram diferença estatística.

**Tabela 5.** Comparação entre aves desafiadas aos 21 ou 28 dias para resultados de necropsia, área e histologia de bolsa cloacal, contagem de linfócitos T CD3+ na bolsa e linfócitos B, CD4+ e CD8+ no baço.

	Parâmetro Avaliado	Desafio		Valor de P
		21 dias	28 dias	
Bolsa Cloacal	Escore de Necropsia**	4,00	3,00	0,0807
	Area <sup>2</sup> (cm <sup>2</sup> )	1,67 $\pm$ 0,37	2,01 $\pm$ 0,55	0,0028*
	Escore de Alterações Histológicas**	12,00	12,00	0,9039
	Linfócitos T CD3+/campo	30,63 $\pm$ 36,73	36,42 $\pm$ 26,51	0,0603
Baço	Área Linfócito B ( $\mu$ m <sup>2</sup> )	4965,50 $\pm$ 3243,00	5642,80 $\pm$ 3515,10	0,4247
	Área Linfócito T CD4+ ( $\mu$ m <sup>2</sup> )	1506,90 $\pm$ 2207,70	2836,30 $\pm$ 1371,50	0,0000*
	Área Linfócito T CD8+ ( $\mu$ m <sup>2</sup> )	4284,90 $\pm$ 3050,30	4384,10 $\pm$ 2539,60	0,7614
	Relação CD4/CD8	0,30	0,78	0,0027*

\* Valores diferem significativamente pelo teste de Kruskal-Wallis ( $P < 0,05$ ).

\*\* Escores representados sob forma de mediana.

### Não Vacinados X Vacinados

Na tabela 6 estão apresentados os parâmetros comparando aves não vacinadas *versus* aves vacinadas com ICs. Os resultados de escore de necropsia e de lesões histológicas estão representados sob forma de mediana, os demais resultados sob forma de média  $\pm$  desvio padrão. Todos os dados apresentados foram comparados pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis ( $P < 0,05$ ).

As aves vacinadas com ICs, avaliadas aos 35 dias, apresentaram tamanho de BC e área ocupada por linfócitos T CD8+ em baço significativamente menor em

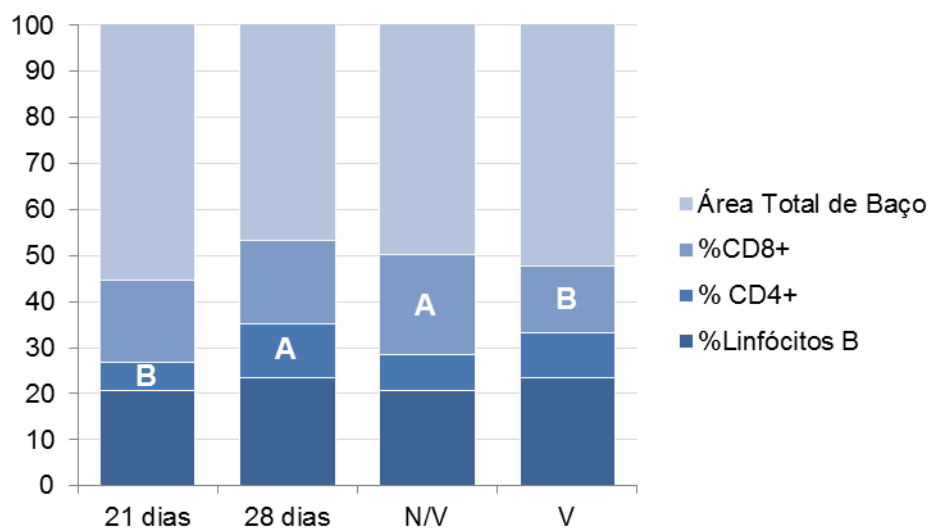
comparação com as aves não vacinadas. Os demais parâmetros avaliados mesmo numericamente diferentes não apresentaram diferença estatística.

**Tabela 6.** Comparação entre aves desafiadas não vacinadas *versus* vacinadas com ICs para resultados de necropsia, área e histologia de bolsa cloacal, contagem de linfócitos T CD3+ na bolsa e linfócitos B, CD4+ e CD8+ no baço.

	Parâmetro Avaliado	Vacinação		Valor de <i>P</i>
		Não	Sim	
<b>Bolsa Cloacal</b>	Escore de Necropsia**	4,00	3,00	0,2528
	Área <sup>2</sup> (cm <sup>2</sup> )	1,95±0,53	1,69±0,42	0,0217*
	Escore de Histologia**	10,50	12,00	0,0685
	Linfócitos T CD3+/campo	35,17±35,91	31,87±27,82	0,9962
<b>Baço</b>	Área Linfócito B (µm <sup>2</sup> )	4983,50±3612,50	5624,90±3138,10	0,3912
	Área Linfócito T CD4+ (µm <sup>2</sup> )	1886,90±1782,50	2377,70±2122,40	0,3975
	Área Linfócito T CD8+ (µm <sup>2</sup> )	5214,50±2768,40	3479,60±2590,10	0,0106*
	Relação CD4/CD8	0,36	0,78	0,0641

\* Valores diferem significativamente pelo teste de Kruskal-Wallis ( $P < 0,05$ ).

\*\* Escores representados sob forma de mediana.



**Figura 5.** Porcentagem de área de baço ocupada pelas células T CD4+, CD8+ e Linfócitos B, levando em conta os dois períodos de desafio e aves não vacinadas (N/V) e vacinadas (V) com imuno complexos (ICs). As letras A e B dentro das colunas referem-se à diferença estatística pelo teste do Kruskal-Wallis ( $P < 0,05$ ) entre grupos avaliados.

A figura 5 ilustra as diferenças na porcentagem de linfócitos B, T CD4+ e CD8+ por campo de baço. Em geral a concentração de linfócitos se manteve em média próximo aos 50% da área total do baço, sendo que dessa quantidade a maioria era composta por linfócitos T. Aves desafiadas aos 28 dias apresentaram maior área de linfócitos T CD4+ que aves desafiadas aos 21 dias. E aves não vacinadas apresentaram maior concentração de linfócitos T CD8+ em baço do que aves vacinadas com ICs.

### **Citometria de Fluxo**

O resultado da porcentagem de células sanguíneas avaliadas por citometria de fluxo no primeiro dia de vida das aves mostraram semelhança estatística entre os tratamentos indicando igualdade entre os grupos de animais analisados.

A tabela 7 representa os resultados da citometria de fluxo nas diferentes coletas, comparando os dois diferentes períodos de desafio (21 ou 28 dias), vacinação com ICs ou não e as coletas realizadas 3 dias antes do desafio (AD) ou 7 dias pós-desafio (PD) e interação entre estes parâmetros.

Pode-se observar que aves desafiadas aos 21 dias apresentaram maior porcentagem de linfócitos B e T CD4 de mucosa comparados com aves desafiadas aos 28 dias ( $P < 0,05$ ), havendo uma relação inversa entre células T CD8 ativadas que mostram maior concentração no sangue de aves desafiadas aos 28 dias.

Aves vacinadas com ICs apresentaram menor quantidade de linfócitos B e T CD4 de mucosa ( $P < 0,05$ ) quando comparadas com aves não vacinadas. Há um aumento nas porcentagens de células T CD4 de mucosa e T CD8 ativadas após o desafio (7d PD) quando comparadas com porcentagens circulantes apresentadas antes do desafio (3d AD).

**Tabela 7.** Médias e desvio padrão das porcentagens celulares identificadas no soro das aves nas diferentes coletas (1º dia de vida, 3 dias antes do desafio e 7 dias pós desafio) analisadas na citometria de fluxo.

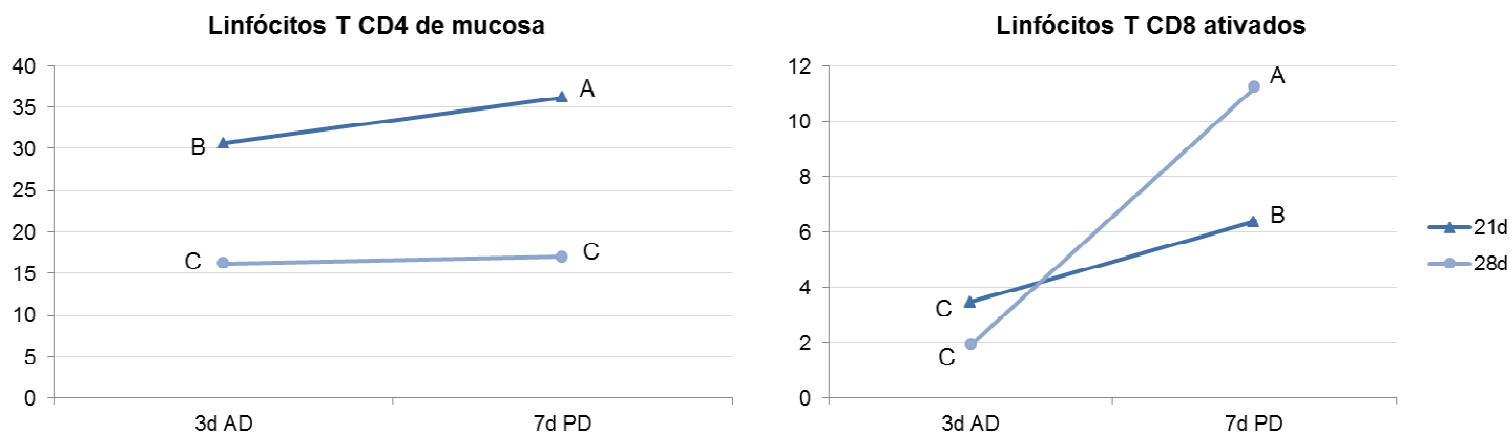
	Tratamento	Células		
		T CD4 (mucosa)	T CD8 (ativado)	Linfócito B
<b>Desafio</b>	21 dias	32,68±5,93	4,92±3,20	10,18±3,30
	28 dias	16,63±4,06	6,57±5,25	2,55±1,25
<b>Vacinação</b>	Não Vacinado	25,62±10,65	6,42±4,52	7,22±5,14
	Vacinado	22,52±8,34	5,07±4,23	5,51±3,86
<b>Coleta</b>	3 dias AD	22,48±8,33	2,68±1,73	6,30±4,83
	7 dias PD	25,38±10,49	8,80±4,09	6,44±4,42
<b>Desafio*Coleta</b>	21d*3d AD	30,67	3,46 <sup>C</sup>	10,40
	21d*7d PD	36,20	6,38 <sup>B</sup>	9,97
	28d*3d AD	16,23	1,92 <sup>C</sup>	2,19
	28d*7d PD	17,03	11,23 <sup>A</sup>	2,91
<b>Desafio*Vacina</b>	21d*N/V	37,19	5,40	11,60
	21d*V	29,68	4,44	8,77
	28d*N/V	17,91	7,44	2,85
	28d*V	15,36	5,70	2,25
		Probabilidades		
<b>Desafio</b>		0,0000	0,0324	0,0000
<b>Vacina</b>		0,0002	0,0788	0,0176
<b>Coleta</b>		0,0143	0,0000	0,8391
<b>Desafio*Coleta</b>		0,0621	0,0001	0,4119
<b>Desafio*Vacina</b>		0,0516	0,6064	0,1152
<b>Coleta*Vacina</b>		0,5496	0,3182	0,8578
<b>Desafio*Coleta*Vacina</b>		0,8678	0,6695	0,6418

- Valores seguidos das letras <sup>ABC</sup> na mesma coluna diferem significativamente pelo teste de Tukey ( $P < 0,05$ ).

- **Legenda:** AD – antes do desafio; PD – pós-desafio; N/V – não vacinado e V – vacinado.

Houve interação entre as datas de desafio *versus* as datas de coleta para linfócitos T CD4 de mucosa ( $P=0,06$ ) e T CD8 ativados ( $P < 0,05$ ), onde se verifica que aves desafiadas aos 21 dias apresentaram maior quantidade de células T CD4+

mucosa no sangue tanto 3d AD quanto 7d PD quando comparadas às aves desafiadas aos 28 dias nos mesmos períodos. Enquanto que para células CD8+ tanto aves desafiadas aos 21 ou 28 dias apresentam aumento destas células 7d PD quando comparada as coletas realizadas 3d AD, sendo este aumento mais evidente nas aves desafiadas aos 28 dias, conforme demonstrado na figura 6.



**Figura 6.** Comportamento dos linfócitos T CD4 de mucosa e T CD8 ativados circulantes de aves desafiadas aos 21 ou aos 28 dias, ao longo das coletas realizadas 3 dias antes do desafio (3d AD) e 7 dias pós-desafio (7d PD).

## DISCUSSÃO

Brandt et al., (2001) cita que amostras clássicas de VDIB isoladas nos EUA nos primórdios de 1960, tais como as de Edgar 2512 e as de Irwin Moulthrop induzem lesões hemorrágicas acompanhadas por depleção total das células B dos folículos e determinam mortalidades entre 30 e 60% em aves jovens. Padilha, (2005) avaliando a patogenicidade de vacinas comercializadas no Brasil, em aves SPF (*specific pathogen free*), identificou que vacinas intermediárias *plus* e vacinas fortes são capazes de promover severos danos a BC, promovendo alta depleção linfocitária próxima aos 90%. Estas vacinas também são capazes de causar lesões histológicas similares às causadas pelos vírus patogênicos de campo, sendo assim compatíveis

com a doença. Durante o período do experimento, apesar do desafio com o uso de cepa forte vacinal do IBDV, não houve mortalidade, além disso, à necropsia foram encontradas poucas alterações macroscópicas sugestivas da doença como gelatinização e hemorragia da BC. Estes resultados concordam com trabalhos anteriores onde também não se observou mortalidade quando se utilizou estirpes virais vacinais clássicas ou de alta-virulência, sob condições experimentais (Haddad et al., 1997; Sharma et al., 2000; Rautenschlein et al., 2003; Vidal et al., 2009). Por outro lado, as aves desafiadas com a cepa forte vacinal, vacinadas ou não com ICs, apresentaram menor tamanho de BC e lesões histológicas compatíveis com a depleção linfóide causada pelo IBDV quando comparadas ao grupo B0 (não vacinado e não desafiado). A medição do tamanho ou peso da BC é um protocolo comum para aferição do estado imunológico de aves (Heckert et al., 2002, Bolis et al., 2003).

#### **Desafio 21 dias X 28 dias**

As aves desafiadas aos 28 dias mostraram maior área de BC ( $P < 0,05$ ) em comparação com as aves desafiadas aos 21 dias, porém essa alteração no tamanho não pôde ser relacionada com os escores de lesão de BC na histologia, pois ambos os períodos de desafio apresentaram graus de lesões semelhantes. Tanto aos 21 quanto aos 28 dias de desafio as aves mostraram em média 67% de depleção do tecido linfóide de BC. Enquanto que as aves do grupo não vacinado e não desafiado (B0), apresentaram escores de lesão de BC em média 20% menores e com menor infiltração de células T CD3+ que aves dos demais grupos (aproximadamente 50 vezes menos linfócitos T presentes na BC).

Tais valores estão de acordo com a literatura, que indica esse aumento no influxo de células T na BC de aves desafiadas ou vacinadas contra IBDV desde o

primeiro dia PD, sendo que estes valores podem se manter até cerca de 12 semanas (Sharma et al., 2000; Corley et al., 2002; Pawelec et al., 2004; Willians & Davison, 2005; Carballeda et al., 2011).

Kim et al. (2004) identificou atrofia de BC, por meio de índice bursal em aves inoculadas com uma estirpe altamente virulenta de IBDV SH/92 comparadas com aves não desafiadas ( $P < 0,05$ ), estes resultados puderam ser relacionados com as lesões encontradas na histologia onde o grupo controle sem contato com o vírus vacinal ou desafio mostrou BC com maior índice bursal e menores graus de lesão quando comparados a aves inoculadas com a estirpe altamente virulenta.

Vervelde & Davison (1997) detectaram em aves desafiadas aos 21 dias com uma estirpe vvIBDV, rápida depleção de linfócitos B e influxo de células T CD4+ e CD8+ na BC aos 4 dias pós desafio, sendo que aos 8 dias PD, estes autores identificaram início de recuperação do tecido bursal. Em nossos resultados essa recuperação não se mostrou evidente levando em conta que os dois tratamentos avaliados não mostraram diferença estatística na avaliação histológica, apresentando ambos escore 12,00 para lesões histológicas em BC.

Outro fato observado foi que aves desafiadas aos 28 dias apresentaram maior infiltração de células T CD4+ em baço, que se mostraram quase duas vezes maiores nestas aves que em aves desafiadas aos 21 dias. O aumento de células T CD4+ no baço também foi responsável pela alta relação CD4:CD8 em baço das aves desafiadas aos 28 dias. Ashraf (2005) reporta que a BC e o baço tem substancialmente a mais alta concentração de IBDV comparados com qualquer outro tecido.

Por outro lado, aves desafiadas aos 28 dias apresentaram menor quantidade de células T CD4 de mucosa e maior quantidade de células T CD8 ativadas 7d PD no sangue quando comparadas às aves desafiadas aos 21 dias.

Jeurissen et al. (1998) comparando a estirpe viral V877 complexada ou não, aplicada *in ovo* aos 18 dias de incubação, identificou que aves vacinadas com o vírus complexado aos 7 dias pós-vacinação, apresentaram presença moderada do vírus tanto em BC quanto em baço. Aos 10 dias pós-vacinação o pico de multiplicação do vírus vacinal foi correlacionado com o grau de depleção linfóide observado na BC. Aos 14 dias PD a quantidade de partículas virais observadas começou a diminuir tanto em bolsa, quanto em baço e timo. Abdel-Alim & Saif (2001) avaliaram a persistência do IBDV por meio de técnica de RT-PCR em aves SPF, estes autores identificaram em aves inoculadas aos 14 ou 21 dias, a presença do vírus em BC por duas semanas pós-inoculação e a presença de RNA viral na terceira semana. Considerando esses fatos de literatura, nossos resultados histológicos de baço mostram que as aves desafiadas aos 28 dias foram avaliadas aos 7 dias PD, onde poderia estar ocorrendo o grau máximo de multiplicação viral na BC e baço, com simultâneo aumento dos linfócitos T, enquanto que aves desafiadas aos 21 dias, foram avaliadas aos 14 dias PD, e poderiam estar mostrando sinais de recuperação relacionada a diminuição das partículas virais.

Entretanto, quando se avalia o efeito da interação ( $P=0,06$ ) entre o período de desafio e as coletas de sangue para a citometria, verifica-se que aves desafiadas aos 21 dias apresentaram maior quantidade de células T CD4+ mucosa no sangue tanto 3d AD quanto 7d PD quando comparadas às aves desafiadas aos 28 dias nos mesmos períodos. Bessay et al. (1996) sugere que durante desafios infecciosos ocorre uma redução dos linfócitos circulantes indicando migração destes para os

tecidos linfóides e locais de infecção. Realmente nas aves desafiadas aos 28 dias, verifica-se maior quantidade de células CD4+ no baço comparado com aves desafiadas aos 21 dias, quando foram avaliados os tecidos das aves aos 35 dias de vida. Porém como essa diminuição de células CD4 de mucosa circulantes são observadas mesmo antes do desafio, são necessários mais estudos que expliquem esse fato.

Para células CD8+ ativadas circulantes tanto aves desafiadas aos 21 ou 28 dias apresentam aumento 7d PD quando comparada as coletas realizadas 3d AD, entretanto as aves desafiadas aos 28 dias apresentam aumento 10X maior dessas células no sangue aos 7d PD quando comparada aos valores 3d AD e aves desafiadas aos 21 dias apresentam um aumento de somente 2X em relação ao existente aos 3d AD. De acordo com Beirão et al. (2012) a quantidade de linfócitos T ativados tende a seguir padrão oposto ao de linfócitos T de mucosas durante uma infecção aguda. Nessas situações, em infecções por IBDV, há tipicamente forte aumento na porcentagem e contagem total de células circulantes ativadas. Esse resultado pode indicar que no desafio aos 28 dias, ocorreu uma resposta aguda mais pronunciada do que a verificada nas aves desafiadas aos 21 dias.

### **Não Vacinados X Vacinados**

As aves vacinadas apresentaram o tamanho de bolsa cloacal menor ( $P<0,05$ ), comparadas com aves não vacinadas, porém não houve diferença quanto ao escore de lesão histológica entre os tratamentos. Padilha (2005) avaliando lesões bursais promovidas por oito vacinas comerciais, a partir dos seus resultados da análise de escores histopatológicos de lesão bursal e de diâmetro de bolsa, observou que não existiu nenhuma correlação entre os dois parâmetros quando as vacinas foram

analisadas separadamente. Segundo este autor a bursometria é um exame menos sensível para avaliação vacinal do que o exame histopatológico.

León et al., 2012 obtiveram maior escore de lesão na avaliação histológica de BC em aves não vacinadas, enquanto nossos resultados mostraram que aves vacinadas ou não apresentaram escores de lesões histológicas estatisticamente iguais. Vidal et al. (2009) identificaram que aves vacinadas somente com ICs sem desafio apresentaram maior atrofia bursal e lesões de BC histológicas quando comparados ao um grupo controle negativo e um grupo que recebeu um programa de vacinação convencional duplo composto por uma estirpe viral suave e outra intermediária.

Kelemen et al. (2000) cita que estirpes virais altamente imunogênicas associadas aos ICs tem efeitos imunossupressores muito inferiores quando comparados com amostras de vírus sozinhas. Nossos resultados demonstraram que aves somente desafiadas com uma estirpe viral forte (Moulthrop G603), não importando o período do desafio, apresentaram semelhança estatística quanto à depleção do tecido bursal comparados a aves vacinadas e desafiadas, indicando que a vacina não foi capaz de prevenir lesões em BC.

No presente estudo, aves, vacinadas ou não, desafiadas mostraram quantidade estatisticamente igual de células B e T CD4+ em baço não havendo diferença na presença deste tipo celular neste órgão linfóide secundário. Porém, aves não vacinadas apresentaram presença de células T CD8+ maior no tecido do baço ( $P < 0,05$ ) quando comparadas com aves vacinadas com ICs e desafiadas.

As células T CD8+ poderiam ser as responsáveis pela rápida eliminação do vírus e recuperação das aves (Doherty et al., 1992) e podem migrar para os tecidos linfóides e sítios de infecção após desafio (Bessay et al, 1996). O aumento de

células T CD8+ no baço de aves somente desafiadas pode estar associado a maior quantidade de vírus presente neste tecido, levando em conta que essas aves ainda poderiam não ter desenvolvido resposta específica para o desafio, ao contrário das aves vacinadas.

Em adição, foi verificada uma interação ( $P=0,05$ ) entre o período de desafio e a vacinação ou não com ICs para células T CD4+ (mucosa), onde aves desafiadas aos 21 dias não vacinadas apresentaram maior concentração destas células no sangue em comparação com aves vacinadas, já aves desafiadas aos 28 dias não apresentam diferenças entre aves vacinadas com ICs e não vacinadas na concentração destas células.

Também é importante levar em conta a razão CD4:CD8, que é descrita na literatura como sendo associada à imunocompetência (Bridle et al., 2006), que se mostrou numericamente maior ( $P=0,064$ ) em aves vacinadas com ICs comparadas a aves somente desafiadas, essa relação tende a ser reduzida em aves infectadas (Beirão et al, 2012).

As aves não vacinadas apresentaram maior concentração de células de linfócitos B no sangue do que aves vacinadas ( $P<0,05$ ). A literatura cita (Sharma et al., 1989; Rodenberg et al., 1994; Corley et al., 2002; Schat & Skinner, 2008; Hussan et al., 2009) que o número de linfócitos B pode reduzir durante a infecção por IBDV, pois estas células são o alvo desse vírus, e nesse estudo, apesar de ser verificada essa diferença no sangue não foi observada diferença no tecido do baço. Sendo assim necessários maiores estudos para esclarecer este fato.

## CONCLUSÃO

O desafio não foi capaz de reproduzir nas aves sinais clínicos típicos da doença de Gumboro entre os diferentes grupos avaliados, porém foi capaz de induzir imunossupressão representada pela depleção do tecido bursal.

Aves desafiadas aos 21 dias apresentaram maior quantidade de células CD4+ de mucosa no sangue que aves desafiadas aos 28 dias antes e depois do desafio, menor quantidade de células CD4+ no baço e menor tamanho de bolsa cloacal nas aves aos 35 dias de vida.

Apesar de, neste estudo, não ser possível evidenciar a capacidade protetora clínica da vacina ao IBDV, é possível verificar que a vacina não preveniu a ocorrência de lesões microscópicas na BC das aves desafiadas aos 21 e aos 28 dias, e que estas aves vacinadas apresentaram menor infiltração de células CD8+ no baço em aves desafiadas aos 21 ou 28 dias e menor quantidade de células CD4 de mucosa no sangue de aves desafiadas aos 21 dias.

Pode-se concluir que diferentes períodos de contato das aves com o vírus desafio foi capaz de estimular diferentes tipos de resposta imune celular e atrofia em bolsa cloacal, além disso a vacinação com ICs determinou uma menor concentração de alguns tipos de células imunes não importando a data em que as aves foram desafiadas.

As vacinas compostas por imuno complexos são uma alternativa de controle para a doença de Gumboro, porém são necessários mais estudos com o objetivo de avaliar a efetividade de sua resposta frente a desafios de campo avaliados em diferentes períodos de infecção.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDEL-ALIM, G.A.; SAIF, Y.M. Detection and persistence of infectious bursal disease virus in specific-pathogen-free and commercial broiler chickens. **Avian Diseases** 45(3):646-654, 2001.
- ASHRAF, S. **Studies on Infectious Bursal Disease Virus**. 2005. Ohio, 216f. Dissertation (Doctor of Philosophy), The Ohio State University.
- AUGHEY, E.; FRYE, F.L. Lymphatic System. In: AUGHEY, E. & FRYE, F.L. **Comparative Veterinary Histology – With Clinical Correlates**, Manson Publishing, p. 258, 2001.
- BACHA JR., W.J.; BACHA, L.M. Sistema Linfático. In: BACHA JR., W.J. & BACHA, L.M. **Atlas Colorido de Histologia Veterinária**, 2 ed., Roca, pp. 111-138, 2003.
- BALAMURUGAN, V.; KATARIA, J.M. Economically Important Non-oncogenic Immunosuppressive Viral Diseases of Chicken-Current Status. **Veterinary Research Communications** 30:541–566, 2006.
- BEIRÃO, B.C.; FÁVARO, C.J.R.; NAKAO, L.S.; CARON, L.F.; ZANATA, S.M.; MERCADANTE, A.F.. Flow Cytometric Immune Profiling of Specific-Pathogen-Free Chickens Before and After Infectious Challenges. **Veterinary immunology and immunopathology** 145 (1-2):32-41, 2012.
- BESSAY, M., LE VERN, Y., KERBOEUF, D., YVORE, P., QUERE, P. Changes in intestinal intra-epithelial and systemic T-cell subpopulations after an Eimeria infection in chickens: comparative study between E acervulina and E tenella. **Veterinary Research** 27:503–514, 1996.
- BLOCK, H.; MEYER-BLOCK, K.; REBESKI, D.E.; SCHARR, H.; DE WIT, S.; ROHN, K.; RAUTENSCHLEIN, S. A field study on the significance of vaccination against infectious bursal disease virus (IBDV) at the optimal time point in broiler flocks with maternally derived IBDV antibodies. **Avian Pathology** 36: 401-409, 2007.
- BOLIS, D.A.; PAGANINI, F.J.; SIMON, V.A.; ZUANAZE, M.F.; SCANAVINI NETO, H.; CORREA, A.R.A.; ITO, N.M.K. Gumboro disease: evaluation of serological and anatomopathological responses in vaccinated broiler chickens challenged with very virulent virus strain. **Revista Brasileira de Ciência Avícola** 5(2):137-146, 2003.
- BRANDT, M.; YAO, K.; LIU, M. et al.. Molecular determinants of virulence, cell tropism. And pathogenic phenotype of infectious bursal disease virus. **Journal of Virology** 75(24):11974-11982, 2001.
- BRIDLE, B.W., JULIAN, R., SHEWEN, P.E., VAILLANCOURT, J.P., KAUSHIK, A.K. T lymphocyte subpopulations diverge in commercially raised chickens. **Canadian Journal of Veterinary Research** 70:183-190, 2006.
- CARBALLEDA, J.M.; ZOTH, S.C.; GOMEZ, E. et al. Activation of the immune response against Infectious Bursal Disease Virus after intramuscular inoculation of an intermediate strain. **Immunobiology** 216:1028-1033, 2011.

- CORLEY, M.; GIAMBRONE, J.J.; DORMITÓRIO, T.V. Evaluation of the immune response and detection of infectious bursal disease viruses by Reverse Transcriptase – Polymerase Chain Reaction and Enzyme-Linked Immunosorbent Assay after in ovo vaccination of commercial broilers. **Avian Diseases** 46: 803-809, 2002.
- DE WIT, J.J. Gumboro Disease: Estimation of optimal time of vaccination by the Deventer formula. Proceedings of the 3rd meeting of working group 3 of COST action 839: passive protection and vaccination (current and future possibilities) in the presence of maternally derived antibody, **Pulawy**, pp: 21-28, 2001.
- DOHERTY, P.C.; ALLAN, W.; EICHELBERGER, M. Roles of  $\alpha\beta$  and  $\gamma\delta$  T cell subsets in viral immunity. **Annual Review of Immunology**, 10:123–151, 1992.
- ETERRADOSSI, N.; SAIF, Y.M.; Infectious Bursal Disease. In: SAIF, Y.M. et al. **Diseases of Poultry**, 12 ed., Blackwell Publishing, pp.185-208, 2008.
- FERNANDES, M.J.B. Identificação Molecular do Virus da Doença de Gumboro. **Instituto Biológico**. SP. 2012. Disponível em: <[http://www.biologico.sp.gov.br/artigos\\_ok.php?id\\_artigo=140](http://www.biologico.sp.gov.br/artigos_ok.php?id_artigo=140)>, acesso em 20/03/2012.
- GARDIN, Y.; PALYA, V.; CAZABAN, C. et al. Vaccines and Vaccinations Against Gumboro Disease: The Key Points. In: XXII Congresso Latinoamericano de Avicultura, 2011. **Anais...** Buenos Aires – Argentina, 2011.
- HADDAD, E. E., C. E. WHITFILL, A. P. AVAKIAN, C. A. RICKS, P. D. ANDREWS, J. A. THOMA AND P. S. WAKENELL. Efficacy of a novel infectious bursal disease virus immune complex vaccine in broiler chickens. **Avian Diseases** 41:882-9, 1997.
- HECKERT, R.; ESTEVEZ, I.; RUSSEK-COHEN, E.; PETTIT-RILEY, R. Effects of density and perch availability on the immune status of broilers. **Poultry Science** 81(4):451-457, 2002.
- HUSSAN, M., KHAN, M., LUCKY, N. Immunohistochemical study of the post-natal development of lymphoid tissues and mucosa of broilers. **Bangladesh Journal of Veterinary Medicine** 7:253–258, 2009.
- JEURISSEN, S.H.M; JANSE, E.M.; LEHRBACH, P.R.; HADDAD, E.E.; AVAKIAN, A.; WHITFILL, C.E. The working mechanism of an immune complex vaccine that protects chickens against infectious bursal disease. **Immunology** 95:494-500, 1998.
- KELEMEN, M.; FORGÁCH, K.; IVÁN, J.; PALYA, V.; SÜVEGES, T.; TÓTH, B.; MÉSZÁROS, J. Pathological and immunological study of an in ovo complex vaccine against infectious bursal disease. **Acta Vet Hungarica** 48(4):443-54, 2000.
- KHATRI, M.; PALMQUIST, J.M.; CHA, R.M.; SHARMA, J.M. Infection and activation of bursal macrophages by virulent infectious bursal disease virus. **Virus Research** 113:44-50, 2005.
- KIM, S.J. SUNG, H.W., HAN, J.H. et al. Protection against very virulent infectious bursal disease virus in chickens immunized with DNA vaccines. **Veterinary Microbiology** 101:39–51, 2004.

KOLF-CLAUW, M.; CASTELLOTE, J.; JOLY, B.; BOURGES-ABELLA, N.; RAYMOND-LETRON, I.; PINTON, P.; OSWALD, I.P. Development of a pig jejunal explants culture for studying the gastrointestinal toxicity of the mycotoxin desoxygenivalenol: histopathological analysis. **Toxicology in Vitro** 23: 1580-1584, 2009.

LEÓN, N.; ICOCHEA, E.; GONZÁLEZ, R.; PERALES, R. Nivel de Protección de uma Vacuna Intermedia contra la Enfermedad de Gumboro em Aves de Postura. **Revista del Investigaciones Veterinarias del Perú** 23(4):477-483, 2012.

LUKERT, P.D., SAIF, Y.M. Infectious bursal disease virus. In: SAIF, Y.M et al. **Diseases of Poultry**, 11 ed. Ames: Iowa State University Press, pp. 161–179, 2003.

LUNA, L.G. **Manual of histologic staining methods of the army force Institute of Pathology**. 3 ed. New York, Mc. Graw, 1968.

MEEUSEN, E.N.T., WALKER, J., PETERS, A., PASTORET, P.-P. & JUNGENSEN, G. Current status of veterinary vaccines. **Clinical Microbiology Reviews** 20: 489-510, 2007.

MÜLLER, H.; MUNDT, E.; ETERRADOSSI, N.; ISLAM, M.R. Current status of vaccines against infectious bursal disease. **Avian Pathology** 41(2):133-139, 2012.

NAKAMURA, T., OTAKI, Y., NUNOYA, T. Immunosuppressive effect of a highly virulent infectious bursal disease virus isolated in Japan. **Avian Diseases**. 36: 891–896, 1992.

NATIONAL RESEARCH CONCIL - NRC. **Nutrient requirements of poultry**. 9th rev.ed. National Academy Press: Washington, D.C. 1994.

PADILHA, A.P. **Doença Infecciosa Bursal: Avaliação da Patogenicidade de Vacinas Comercializadas no Brasil em Aves Livres de Patógenos Específicos**. 2005. Porto Alegre, 41f. Dissertação (Mestre em Ciências Veterinárias), Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

PAWELEC, G.; AKBAR, A.; CARUSO, C.; EFFROS, R.; GRUBECK-LOEBENSTEIN, B.; WIKBY, A. Is immunosenescence infectious? **Trends in Immunology** 25(8):406-410, 2004.

RAUTENSCHLEIN, S.; YEH, H.; SHARMA, J. Comparative immunopathogenesis of mild, intermediate, and virulent strains of classic Infectious Bursal Disease virus. **Avian Diseases** 47: 66-78, 2003.

RAUTENSCHLEIN, S., HAASE, C. Differences in the immunopathogenesis of infectious bursal disease virus (IBDV) following in ovo and post-hatch vaccination of chickens. **Veterinary Immunology and Immunopathology** 106: 139–150, 2005.

RAUTENSCHLEIN, S.; VON SAMSON-HIMMELSTJERNA, G.; HAASE, C. A comparison of immune responses to infection with virulent infectious bursal disease virus (IBDV) between specific-pathogen-free chickens infected at 12 and 28 days of age. **Veterinary Immunology and Immunopathology** 115: 251-260, 2007.

RODENBERG, J.K.; SHARMA, J.M.; BALZER, S.; NORDGREN, R.; NAQI, S. Flow cytometric analysis of B-cell and T-cell subpopulations in specific pathogen-free chickens infected with infectious bursal disease virus. **Avian Diseases**, 38:16-21, 1994.

SAHAR, M. O.; MAHASIN, A. S. A. A.; RAHMAN, E. A. Residual pathogenic effects of Infectious Bursal Disease Vaccines containing intermediate and hot strains of the Virus in broiler chickens. **International Journal of Poultry Science** 3(6):415-418, 2004.

SCHAT K.A.; SKINNER, M.A. Avian Immunosuppressive Diseases and Immune Evasion. In: DAVISON, F.; KASPERS, B.; SCHAT, K.A. **Avian Immunology**, 1st ed. Academic Press, Elsevier Ltd. pp. 299-322, 2008.

SHARMA, J.M.; DOHMS, J.E.; METZ, A.L. Comparative pathogenesis of serotype 1 and variant serotype 1 isolates of infectious bursal disease virus and their effect on humoral and cellular immune competence of specific pathogen-free chickens. **Avian Diseases**, 33:112-124, 1989.

SHARMA, J.M.; KIM, I.J.; RAUTENSCHLEIN, S. et al. Infectious bursal disease virus of chickens: pathogenesis and immunosuppression. **Developmental & Comparative Immunology** 24(2-3): 223-235, 2000.

VERVELDE, L., DAVISON, T.F. Comparison of the in situ changes in lymphoid cells during infection with infectious bursal disease virus in chickens of different ages. **Avian Pathology** 26: 803-821, 1997.

VIDAL K.A.; ICOCHEA, A.D'A., PERALES, R.C. et al. Evaluación de dos vacunas comerciales conteniendo el complejo antígeno anticuerpo contra La infección bursal em pollos de carne. **Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú**, 20 (1):90-101, 2009.

WILLIAMS, A.E.; DAVISON, T.F. Enhanced immunopathology induced by very virulent infectious bursal disease virus. **Avian Pathology** 34(1):4-14, 2005.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Doenças imunossupressoras como a Doença de Gumboro ainda constituem uma grande preocupação na avicultura brasileira. A vacinação continua sendo a melhor forma de controle dessa enfermidade. O advento de novas tecnologias em vacinação é mais uma alternativa para aperfeiçoar o processo de controle destas doenças.

Porém o grande desafio dos novos conceitos de vacinação é reduzir a imunossupressão causada pelas estirpes virais utilizadas nas vacinas. Vírus menos patogênicos para o tecido bursal podem implicar em respostas imunes menos intensas, fazendo com que o contato da ave vacinada com uma estirpe de campo altamente virulenta possa induzir a enfermidade.

Desta forma o ideal seria achar um equilíbrio entre a imunossupressão causada pelas vacinas comerciais e a produção satisfatória de resposta imunológica contra desafios de campo, reduzindo desta forma as perdas econômicas com essa doença.

Vacinas compostas por imuno complexos vêm sendo utilizadas como alternativas no controle da doença e com resultados interessantes, porém o vírus complexado também tem possibilidade de causar imunossupressão.

O período de contato da ave com o vírus também pode interferir na resposta imunológica, o período de janela imunológica entre a queda de anticorpos maternos e a produção de seus próprios anticorpos é muito importante, pois é nesse espaço de tempo que o vírus de campo se utiliza para causar a doença. Hoje é cada vez mais comum a busca de uma vacina cada vez mais precoce realizada de maneira mais controlada e uniforme.

Este experimento mostrou que a vacinação com imuno complexos pode causar depleção linfóide na bolsa, porém é capaz de diminuir a mobilização de células ativadas para o baço e células CD4 de mucosa na corrente circulatória. Foi observado também que aves desafiadas aos 28 dias mobilizaram maior quantidade de células CD4+ para o baço e maior quantidade de células CD8 ativadas no sangue.

São necessários mais estudos para melhor entender esse efeito da vacina e do desafio mais tardio sobre proteção clínica e parâmetros zootécnicos das aves, para justificar o benefício econômico dessa tecnologia.