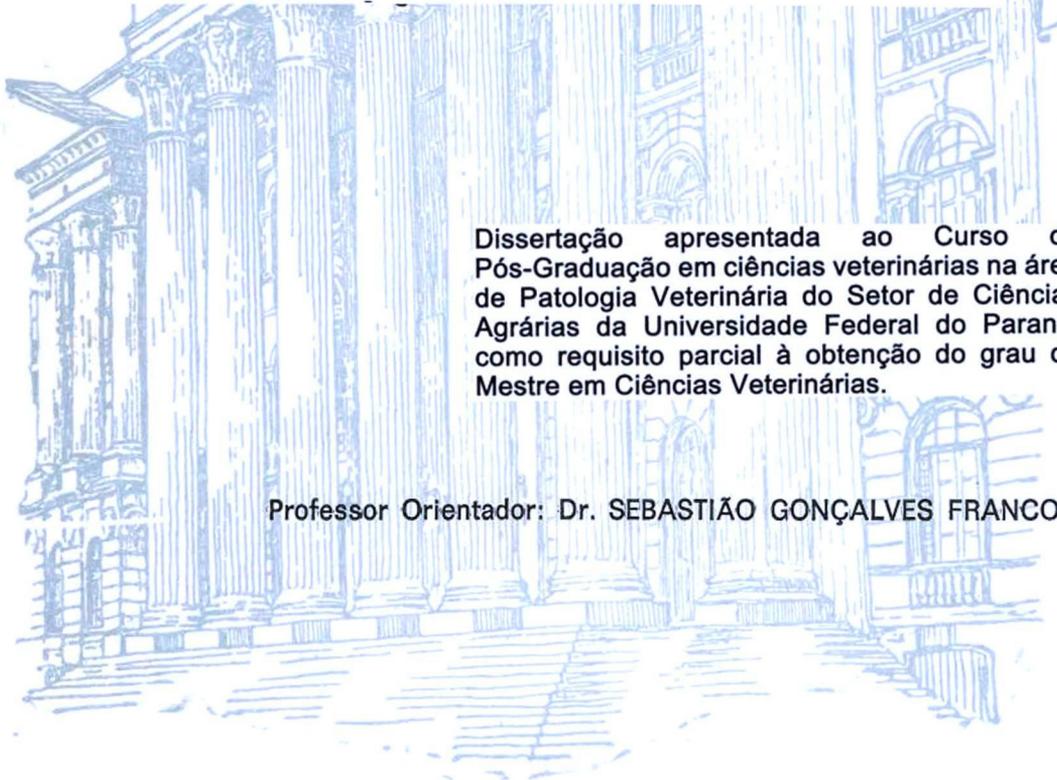


CRISTÓVÃO CÂMARA PEREIRA



EFEITO DA VACINAÇÃO PARA A DOENÇA DE GUMBORO, REALIZADA COM DUAS CEPAS VACINAIS E TRÊS VIAS DE APLICAÇÃO, SOBRE A PRODUÇÃO DE FRANGOS DE CORTE



Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em ciências veterinárias na área de Patologia Veterinária do Setor de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Ciências Veterinárias.

Professor Orientador: Dr. SEBASTIÃO GONÇALVES FRANCO

CURITIBA

1995

CRISTÓVÃO CÂMARA PEREIRA

EFEITO DA VACINAÇÃO PARA A DOENÇA DE
GUMBORO, REALIZADA COM DUAS CEPAS
VACINAIS E TRÊS VIAS DE APLICAÇÃO,
SOBRE A PRODUÇÃO DE FRANGOS DE CORTE

Dissertação apresentada ao Curso de
Pós-Graduação em ciências veterinárias na área
de Patologia Veterinária do Setor de Ciências
Agrárias da Universidade Federal do Paraná,
como requisito parcial à obtenção do grau de
Mestre em Ciências Veterinárias.

Professor Orientador: Dr. SEBASTIÃO GONÇALVES FRANCO

CURITIBA

1995

P436e Pereira, Cristóvão Câmara
Efeito da vacinação para a doença de Gumboro, realizada com duas cepas vacinais e três vias de aplicação, sobre a produção de frangos de corte / Cristóvão Câmara Pereira. - Curitiba, 1995. 65 p.: il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias.

Orientador: Sebastião Gonçalves Franco

1. Frango de corte - Doença. 2. Gumboro, Doença de. 3. Frango de corte - Vacinação. 4. Frango de corte - Produção. I. Franco, Sebastião Gonçalves. II. Título. III. Universidade Federal do Paraná.

CDU 636.5.033

Ministério da Educação
Universidade Federal do Paraná
Setor de Ciências Agrárias
Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias

A Comissão Examinadora, Abaixo Assinada, aprova a dissertação

**EFEITO DA VACINAÇÃO PARA A DOENÇA DE GUMBORO
REALIZADA COM DUAS CEPAS VACINAIS E TRÊS VIAS DE
APLICAÇÃO NA PRODUÇÃO DE FRANGOS DE CORTE.**

Elaborada por

CRISTÓVÃO CÂMARA PEREIRA

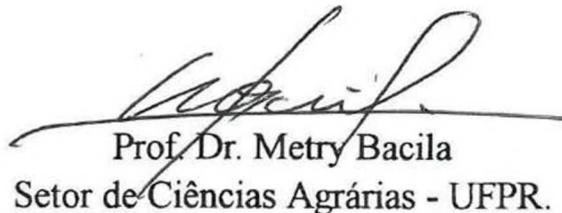
como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências Veterinárias,
Área de Patologia Veterinária.

Comissão examinadora:



Prof. Dr. Sebastião Gonçalves Franco
Setor de Ciências Agrárias - UFPR.

Prof. Dr. Yasuyoshi Hayashi
Setor de Ciências Biológicas - UFPR.



Prof. Dr. Metry Bacila
Setor de Ciências Agrárias - UFPR.

Dedico este trabalho com carinho
a meus pais Adalberto (in
memoriam) e Eliane e a todos os
meus amigos.

AGRADECIMENTOS

Ao curso de pós graduação em medicina veterinária, da Universidade Federal do Paraná.

A coordenação de aperfeiçoamento de pessoal de nível superior - CAPES pela bolsa de estudo concedida.

Ao professor Sebastião Gonçalves Franco, pela amizade, confiança, incentivo e valorosa orientação.

A Fernanda e Angela Segui, pelo esforço, dedicação e senso prático sempre presente e imprescindível para execução deste trabalho.

A professora Ida Cristina Gubert pela amizade e co-orientação.

Ao professor Ney Ferreira Neto pelo apoio e incentivo durante todo o experimento.

Ao departamento de estatística da UFPr pelo processamento estatístico dos dados.

Ao colega, Maurício Bacilla pela ajuda durante a execução do teste ELISA.

A professora Vanete Soccol, pelos conselhos e apoio constantes durante todo o decorrer deste trabalho.

A C.B.M pela doação das vacinas utilizadas neste experimento.

A Becton e Dickinson pela doação das seringas utilizadas durante a coleta de sangue .

A equipe de hematologia do Hospital das Clínicas, pela ajuda duran

te a execução do teste ELISA.

A equipe da BIOVET, e em especial ao Dr. Mansuetto, que durante todo o trabalho de pesquisa esteve presente, ajudando com a doação de vacinas e com referencial bibliográfico.

Em especial a todos que contribuíram para a realização deste trabalho.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA

1	TÍTULO OBTIDO DAS AVES TESTADAS COM SEIS DIAS DE IDADE	41
2	TÍTULO OBTIDO DE AVES COM 21 DIAS DE IDADE, VACINADAS POR DIFERENTES VIAS E CEPAS	44
3	CONVERSÃO ALIMENTAR OBTIDA DE AVES COM 21 DIAS DE IDADE, VACINADAS POR DIFERENTES VIAS E CEPAS	46
4	TÍTULO OBTIDO DE AVES COM 42 DIAS DE IDADE, VACINADAS POR DIFERENTES VIAS E CEPAS	51
5	TÍTULO OBTIDO DE AVES VACINADAS POR DIFERENTES CEPAS E VIAS	53
6	CONVERSÃO ALIMENTAR OBTIDA DE AVES VACINADAS POR DIFERENTES VIAS E CEPAS.....	56

LISTA DE TABELAS

TABELA

1	TÍTULOS MÉDIOS AOS 21 DIAS DE IDADE DE ACORDO COM OS DIFERENTES TRATAMENTOS	43
2	CONVERSÃO ALIMENTAR MÉDIA AOS 21 DIAS DE IDADE DE ACORDO COM OS DIFERENTES TRATAMENTOS	45
3	PESOS MÉDIOS EM QUILOS OBTIDOS DE 1200 AVES AOS 21 DIAS DE IDADE DE ACORDO COM OS DIFERENTES TRATAMENTOS.....	48
4	TÍTULOS MÉDIOS AOS 42 DIAS DE IDADE, DE ACORDO COM OS DIFERENTES TRATAMENTOS E CEPAS VACINAIS	49
5	CONVERSÃO ALIMENTAR AOS 42 DIAS DE IDADE DE ACORDO COM OS DIFERENTES TRATAMENTOS E CEPAS	55
6	PESOS MÉDIOS EM QUILOS OBTIDOS DE 1200 AVES AOS 42 DIAS DE IDADE DE ACORDO COM DIFERENTES TRATAMENTOS E CEPAS	57
7	MORTALIDADE DOS DIFERENTES TRATAMENTOS AOS 42 DIAS DE IDADE	58

LISTA DE ABREVIATURAS

DIB: Doença Infecciosa da Bolsa

VP1: Proteína viral número 1.

VP2: Proteína viral número 2.

VP3: Proteína viral número 4.

SPF: Animais de laboratório desprovidos de anticorpos específicos.

IgM: Imunoglobulina tipo M.

IgG: Imunoglobulina tipo G.

ELISA: Enzyme Linked Immunosorbent Assay,(Teste imuno enzimático).

RESUMO

O principal objetivo da presente pesquisa foi estudar a influência de três vias de aplicação e de duas cepas diferentes da vacina para a Doença Infecciosa da Bolsa, DIB sobre a soroconversão, ganho de peso, conversão alimentar e mortalidade de frangos de corte. Foram analisadas as variações de títulos das aves testadas, aos 7, 21 e 42 dias de idade. Os efeitos resultantes de diversas combinações de cepas vacinais e vias de aplicação foram analisados em 2400 frangos de corte de ambos os sexos. As vacinas utilizadas foram a "intermediária" e a "forte". Os títulos para a DIB foram mensurados através do teste ELISA e a conversão alimentar através dos dados de consumo de ração. A via de aplicação e a cepa vacinal que apresentaram melhores resultados aos 21 dias de idade foram "oral-intermediária" e aos 42 dias "nasal-intermediária". As outras combinações também apresentaram resultados que estão acima dos padrões mínimos de soroconversão necessários para a proteção contra DIB.

ABSTRACT

The main objective of the present research was to study the influence upon serumconversion, weight gain, feed conversion and mortality of broilers when submitted to three applications via two strains of BID vaccines. The titer variations shown by the broilers have been analyzed by ELISA test at the 7th, 21st and 42nd days. Effects obtained by diverse combinations of strains and application vias were tested in 2400 broilers of both sexes. The vaccine strains presented high and moderate virulence. BID titers were assayed by ELISA test and feed conversion by amount of feed consumed data. On the 21st day the best results were those presented by the broilers inoculated with moderate virulent oral via strain. On the 42nd day the best results were those which presented by nasal via and moderate virulent strain. The effects shown by other different combinations were also above the minimum serumconversion level which is desired if one wants to protection against BID.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 REVISÃO DE LITERATURA	17
2.1 A DOENÇA DE GUMBORO	17
2.2 CLASSIFICAÇÃO DO VIRUS DA DIB	18
2.3 EPIDEMIOLOGIA DO VIRUS DA DIB	18
2.4 CARACTERÍSTICAS DE RESISTÊNCIA DO VIRUS DA DIB	19
2.5 A DIB NO BRASIL	19
2.6 CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS DO VIRUS DA DIB	19
2.7 CULTURA EM CÉLULAS DE LABORATÓRIO DO VIRUS DA DIB	20
2.8 PERÍODO DE INCUBAÇÃO DO VIRUS DA DIB	21
2.9 CÉLULAS ALVO DO VIRUS DA DIB	22
2.10 FORMAS CLÍNICAS DA DIB	23
2.11 DIAGNÓSTICO DO VIRUS DA DIB	25
2.12 CONTROLE DA DIB	25
2.13 TESTES PARA DETECÇÃO DO VIRUS DA DIB	29
2.14 O TESTE ELISA	29
3 MATERIAL E MÉTODOS	31

3.1 O EXPERIMENTO	32
3.2 AS INSTALAÇÕES	33
3.3 RAÇÃO E CONVERSÃO ALIMENTAR	33
3.4 TRATAMENTOS E VIAS DE APLICAÇÃO	33
3.5 COLHEITA DE SANGUE	34
3.6 PROCESSAMENTO DO SANGUE	35
3.7 TESTE IMUNOENZIMÁTICO (ELISA)	36
3.7.1 Preparação da diluição do soro na placa de diluição	36
3.7.2 Preparação do soro controle positivo	36
3.7.3 Preparação da solução conjugada	36
3.7.4 Preparação da solução de lavagem	36
3.7.5 Preparação da solução substrato	37
3.7.6 Preparação da solução bloqueadora	37
3.7.7 Procedimentos para a execução do teste ELISA.....	37
3.7.8 Procedimento de lavagem da microplaca	37
3.7.9 Adição do conjugado, substrato e solução bloqueadora	37
3.7.10 Procedimentos para a leitura da microplaca	38
3.8 CÁLCULO DA MORTALIDADE	38
3.9 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	38
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	40
4.1 EFEITO DA VACINAÇÃO DAS MATRIZES SOBRE O TÍTULO DOS PIN- TAINHOS TESTADOS COM 6 DIAS DE IDADE	40
4.2 EFEITO DOS DIFERENTES TRATAMENTOS SOBRE O TÍTULO DAS AVES TESTADAS, COM 21 DIAS DE IDADE	41
4.3 CONVERSÃO ALIMENTAR OBTIDA DE AVES COM 21 DIAS SUBME- TIDAS AOS DIFERENTES TRATAMENTOS	45
4.4 EFEITO DOS DIFERENTES TRATAMENTOS SOBRE O TÍTULO DAS AVES COM 42 DIAS DE IDADE	49

4.5 CONVERSÃO ALIMENTAR DE AVES COM 42 DIAS DE IDADE, SUBMETIDAS AOS DIFERENTES TRATAMENTOS	54
4.6 MORTALIDADE DO LOTE TESTADO AOS 42 DIAS DE IDADE.....	58
5 CONCLUSÕES	59
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	60

1 - INTRODUÇÃO

A avicultura é hoje uma ótima alternativa para a produção de proteína de origem animal e sua exploração tem sido conduzida com sucesso em várias regiões do país, contribuindo com significativa parcela na produção pecuária.

O Brasil se destaca nessa atividade em âmbito internacional, sendo a avicultura uma boa opção a mais para o profissional que ingressa nessa área.

A avicultura brasileira experimentou apreciável evolução nos últimos anos pois em aproximadamente duas décadas a produção de carne de frango aumentou quase dez vezes, enquanto a população brasileira não chegou a dobrar, passando de 90 para 150 milhões de habitantes.

Até 1970, a avicultura brasileira era uma atividade de subsistência e sem qualquer tecnologia. Estima-se que a produção dessa época não ultrapassava 230 mil toneladas/ano. Nessa mesma década porém o panorama da avicultura brasileira começou a mudar devido à exigência da inspeção federal e estadual que motivou a modernização do setor.

Em 1973 o Brasil começou a exportar carne de frango, o que determinou a sofisticação dos parques industriais e dos sistemas de criação, chegando-se a uma produção de mais de 500 mil toneladas de carne de frango. Em 1980 a produção foi de 1,3 milhões de toneladas, em 1982 de 2,12 milhões e alcançando em 1990 a 3.480.000 toneladas. A

estimativa para 1995 é de mais de 4.000.000 toneladas .O Brasil é hoje responsável por 8% da produção mundial de aves, sendo o segundo maior produtor e exportador do mundo.

Paralelamente ao desenvolvimento da avicultura no Brasil, vem ocorrendo uma incidência crescente de enfermidades que acometem as aves, destacando-se entre elas a doença infecciosa da bolsa DIB, um dos mais sérios problemas avícolas em todo o mundo. Pesquisadores estão continuamente verificando a incidência de muitas doenças, em cuja origem o vírus da DIB está envolvido. Novas doenças apareceram, enquanto outras tiveram seu quadro clínico agravado como consequência de infecção precoce causada pelo vírus da DIB. Dentre elas destacam-se as doenças respiratórias, entéricas e dermatológicas.

O uso intensivo das instalações avícolas, especialmente para frangos de corte, tem contribuído para agravar o quadro da infecção precoce pelo vírus da DIB. O pequeno intervalo de tempo entre lotes de aves, a ausência de um isolamento adequado entre galpões que alojam aves de diferentes idades e o aumento da densidade de aves por metro quadrado, são fatores predisponentes para agravar o quadro de imunodepressão precoce em frangos de corte.

Conhecendo as características de resistência do vírus da DIB, torna-se imprescindível um bom programa de imunização para matrizes e para progênie. Atualmente, existem vacinas denominadas "intermediárias" que possuem uma virulência bastante atenuada e vacinas "fortes" que possuem virulência moderada.

Com o quadro hoje existente, sabendo-se que as amostras de vírus a nível de campo são altamente patogênicas, faz-se necessário alterar o programa de vacinação do frango de corte e das reprodutoras.

Com base nessas considerações, pode-se afirmar que a principal

dúvida quanto ao problema da DIB a nível mundial é, quando vacinar e qual a melhor cepa a ser utilizada, para promover a proteção das aves em um menor espaço de tempo. O programa de vacinação não deverá causar qualquer prejuízo de ordem imunológica e produtiva para o lote vacinado.

O objetivo deste trabalho, foi comparar o desempenho de duas cepas vacinais. A cepa forte, mais invasiva e virulenta e a cepa intermediária de virulência moderada. As vacinas foram administradas em frangos de corte de ambos os sexos, com sete dias de idade. A vacinação foi realizada através de três diferentes vias de aplicação; via oral, nasal e ocular. Com a execução deste protocolo, pôde-se avaliar a soroconversão das cepas vacinais utilizadas.

Outra questão estudada, foi a influência de diferentes vias de aplicação sobre parâmetros imunológicos e produtivos, para verificar a existência ou não da relação entre via de aplicação de vacina e assimilação dos nutrientes dentro dos parâmetros normais de aves criadas com fins comerciais.

2 - REVISÃO DE LITERATURA

2.1 A DOENÇA DE GUMBORO

A Doença Infecciosa da Bolsa, ou Doença de Gumboro foi citada pela primeira vez por COSGROVE (1962) , descrevendo-a como uma enfermidade que lesava a Bursa de Fabricius, causando sérias lesões a nível renal nas aves infectadas.

O nome "Doença de Gumboro" deve-se ao fato da enfermidade ter sido descrita inicialmente no município de Gumboro. Estado de Delaware, Estados Unidos. Os exames bacteriológicos foram negativos, levando a presumir-se que a enfermidade fosse causada por um vírus. Esta condição foi descrita como "nefrose aviária".

A incerteza sobre o agente etiológico dessa nefrose aviária aumentou quando,(WINTERFIELD & HITCHNER, 1962) isolaram duas cepas de vírus da bronquite infecciosa e as denominaram de Cepa Gray, por causarem a mesma síndrome da nefrose em aves.

Em testes laboratoriais esses agentes causaram moderada doença respiratória e lesões a nível renal que foram associada à essa síndrome. Conclusões semelhantes foram descritas por CUMMING (1963) na Austrália.

Como havia coincidência de sintomatologia, a entidade foi designada de DOENÇA DE GUMBORO. Posteriormente, foram constatadas algumas diferenças entre essas duas doenças: a DIB e bronquite infecciosa

das aves, a partir de estudos em ovos embrionados feitos por WINTERFIELD et al (1980).

2.2 CLASSIFICAÇÃO DO VIRUS DA DIB.

No início das pesquisas em relação ao vírus da DIB, o mesmo foi classificado como diplornavirus por HIRAI et al. (1974). Estudos posteriores vieram a classificá-lo como membro da Família Birnaviridae, bem como outros vírus encontrados em insetos, moluscos e peixes, (MULLER & BENCHT, 1982) .

2.3 EPIDEMIOLOGIA DO VIRUS DA DIB.

LANDGRAF et al. (1967) , observaram que após inoculação em ovos embrionados através da cavidade alantóide, ocorria mortalidade embrionária de 100% após a primeira passagem, 30% após a segunda, e sem ocorrência de mortalidade de embriões após a terceira. A inoculação do vírus da DIB em ovos embrionados com 10 dias de idade causou mortalidade a partir do terceiro dia após a inoculação, com o ápice de mortalidade ocorrendo no 5 dia. Foram observadas as seguintes lesões: congestão e petéquias cutâneas; hemorragias nas juntas dos dedos do pé e região da cabeça; petéquias hepáticas; congestão abdominal, (HITCHER et al, 1978) .

O vírus da DIB é altamente contagioso com grande capacidade de disseminação em um plantel. A transmissão se dá por via oral e, com muito menos intensidade por secreções e aerosol, de acordo com BENTON et al. (1967).

2.4 CARACTERÍSTICAS DE RESISTÊNCIA DO VIRUS DA DIB.

BENTON et al. (1967) , estudaram as propriedades físico químicas do vírus da DIB e citaram que o mesmo resistiu à temperatura de 37°C, durante 5 horas e 56°C durante 3 horas.

Soluções de 2% de cloramina, halamida, formaldeído ou glutaraldeído demonstraram ser eficientes contra o vírus da DIB, (MEULEMANS & HALEN, 1984).

O vírus foi inibido por formalina, o mesmo não ocorrendo com eter, clorofórmio, fenol e thiomerosal. A capacidade de infecção não se alterou após exposição por 21 dias a 25°C e por 90 min, a 60°C, manteve-se inalterado por congelamento -20°C por 3 anos,(YOUNG, 1987). Esses mesmos autores concluíram que somente o iodo a 100% durante 2 minutos a 23°C apresenta alguns resultados na destruição do vírus.

2.5 A DIB NO BRASIL

Desde a primeira descrição da DIB, nos Estados Unidos, por COSGROVE (1962) , a doença de Gumboro tem sido identificada em quase todas as partes do mundo. No Brasil a DIB foi relatada pela primeira vez por NAKANO et al. (1972) , e posteriormente por TOMOIA (1979).

2.6 CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS DO VIRUS DA DIB.

O vírus da DIB, tem um genoma constituído por dois segmentos de RNA com peso molecular de $2,5 \times 10^6$ e $2,2 \times 10^6$ de acordo com STEGER et al. (1980) . Os capsômeros são arranjados em simetria 5:3:2 e não possuem envelope segundo HIRAI et al. (1974).

A maioria das amostras do vírus da DIB obtidas de galinha pertencem ao sorotipo 1, enquanto que as obtidas de perus pertencem ao sorotipo 2. Os dois sorotipos apresentam reação cruzada no teste de imunofluorescência, segundo ROSEMBERG, (1989). A produção de vacinas inativadas ou vivas contém o sorotipo 1, segundo OKOYE, (1984).

Segundo DOBOS, (1979) VP2 (proteína viral nº2), é o componente viral que aparece com maior abundância, fazendo parte de 51% do sorotipo 1. VP3 aparece com 40%, VP4 com 3% e VP1 com 3%.

De acordo com KIBENGE et al. (1987), entre as diferentes cepas, a VP2, possui a maior variação de tamanho. FAHEY et al. (1985), demonstraram a existência de uma relação entre o tamanho da VP2 e a patogenicidade do vírus da DIB. AZAD et al. (1987), constataram a ocorrência de uma região da VP2 que confere maior proteção ao hospedeiro sendo responsável pela produção de anticorpos neutralizantes.

BENCHT et al. (1988), demonstraram que VP3 é o antígeno responsável pela especificidade de grupo. E a existência de pelo menos dois epitopos, isto é a porção proteica responsável pela imunogenicidade, sendo um deles estritamente sorotipo específico, em VP3.

HUDSON et al. (1988), constataram que VP1 é o menor componente interno do vírus. Anticorpos monoclonais 17/82 e 1/A6 direcionados contra VP2 do vírus da DIB, mostraram atividade neutralizante, o que não ocorreu com anticorpos monoclonais 27/B1, direcionados contra VP3, indicando que VP2 é a proteína estrutural mais importante para a adsorção viral, (AZAD et al, 1987)

2.7 CULTURA EM CÉCULAS DE LABORATÓRIO DO VIRUS DA DIB.

Em cultura de células adaptadas, o vírus da DIB cresce em

várias linhagens de células de mamíferos como RK-13, VERO, BGM-70 e células M4- segundo PETEK et al. (1973) .

O período latente do vírus da DIB, em cultura de rim de embrião de galinha é de 4 à 6 horas, segundo BENCHT (1980) . A síntese dos polipeptídeos específicos do vírus da DIB em células linfóides de galinhas acontece em aproximadamente 90 minutos após a infecção in vitro. Os polipeptídeos virais maduros têm sido encontrados em culturas de células 6 horas após a infecção, segundo MULLER e BENCHT, (1982) .

2.8 PERÍODO DE INCUBAÇÃO DO VIRUS DA DIB.

Segundo pesquisas realizadas por EDGAR et al. (1979), foram isoladas amostras contendo vírus da DIB em galpões sem uso por mais de um ano. HOWIE et al. (1981) , indicaram que insetos podem estar relacionados com a transmissão e a difusão do vírus da DIB.

VALDEZ et al. (1979), detectaram através de imunofluorescência, o vírus da DIB no duodeno e nos rins de gansos inoculados experimentalmente por via oral, 12 horas após a inoculação e no baço e bolsa, 24 horas após a inoculação. Encontrou-se também o vírus da DIB em fezes de galinhas inoculadas por via oral, no primeiro dia após a inoculação bem como na bolsa no duodeno e tonsilas fecais dez dias após a inoculação. Os autores concluíram que esses são os melhores órgãos para o diagnóstico através do método de imunofluorescência.

KAUFER e WEIS, (1976) , demonstraram que o período de incubação da DIB é de 2 à 3 dias. Os mesmos autores concluíram que após a inoculação intra-bursal com o vírus da DIB, ocorre intensa multiplicação viral em linfócitos e macrófagos. MÜLLER et al.(1979), estudando as características infecciosas do vírus da DIB , observaram

que aves infectadas oralmente, apresentaram concentração viral nos macrófagos e células linfóides do ceco. Posteriormente o vírus foi detectado em macrófagos e em células linfóides do duodeno e do jejuno. Dez horas após a inoculação foi encontrado também no fígado. A partir desse órgão, o vírus disseminou-se no organismo através da circulação.

2.9 CÉLULAS ALVO DO VIRUS DA DIB.

MULLER et al. (1979), estudando dois grupos de aves infectadas experimentalmente pelo vírus da DIB, constataram que houve 100% de mortalidade em aves SPF, (aves sem anticorpos específicos para a DIB), com quatro semanas de idade. O grupo de aves que foi "bursectomizado" antes da infecção, apresentou uma discreta necrose dos tecidos linfóides. Os autores concluíram que um grande número de células altamente susceptíveis são fundamentais para o desenvolvimento de uma infecção aguda.

Outros avanços no conhecimento desse problema foram conseguidos por CURSIFEN, (1980), que concluiu que o vírus da DIB não se multiplica somente no linfócitos T, ou nos linfócitos B periféricos. Ótimas condições para a multiplicação viral são obtidas pelos linfócitos maduros da bolsa. Entretanto as diferentes populações de células diferem na capacidade de produção de vírus infectantes.

BENCTH, (1980), propôs que o desenvolvimento dos sinais clínicos da DIB parecem depender da quantidade de linfócitos B. Entretanto SCHAT et al. (1981), concluíram que embriões bursectomizados não foram capazes de produzir resposta imunológica primária e secundária, mas a grande maioria das aves apresentou lesões hemorrágicas nos músculos do trato intestinal em contraste ao grupo controle que não apresentou lesões

nesses órgãos.

NAKAI e HIRAI, (1981) , sugeriram que a superfície da IgM e linfócitos são as estruturas alvo para a infecção do vírus da DIB. GELG et al. (1979) , citaram que o interferon é produzido em todas as partes do embrião, iniciando-se 48 a 72 horas depois da infecção. Títulos máximos foram encontrados 72 horas pós infecção no embrião e na membrana corioalantóide, e 120 horas após a infecção no fluído alantoamniótico.

2.10 FORMAS CLÍNICAS DA DIB.

Segundo GIAMBRONE, (1986), a DIB apresenta-se sob duas formas: a) a forma clínica, observada em aves susceptíveis, e b) a forma sub-clínica. Esta ultima é a responsável pelos danos provocados nos plantéis avícolas em razão da queda no seu rendimento e na sua viabilidade.

De acordo com COSGROVE, (1962), a DIB provoca o aparecimento de penas arrepiadas, diarreia aquosa, tremores e prostração, em 10 a 20% do lote. As aves submetidas à necrópsia apresentam desidratação, hemorragias nos músculos da perna, enfarte hepático, rins hipertrofiados com presença de uratos e aumento do volume da bolsa.

HITCHNER, (1978) , relatou que a Bursa de Fabricius aumenta de volume no terceiro dia após a inoculação. Tendo seu tamanho normal duplicado após o 4^o dia. O mesmo autor cita que a bolsa apresenta uma camada gelatinosa na superfície da mucosa e a alta mortalidade está relacionada com o crescimento fisiológico da mesma. Após o desenvolvimento dessas lesões ocorre degeneração do tecido linfóide da bolsa e redução do seu volume, apresentando coloração acinzentada, segundo ROSEMBERG, (1989).

SIVANANDAN et al. (1979) , descreveram lesões a nível de baço, timo e glândulas de Harder. As lesões estavam mais concentradas no baço, onde constataram esplénomegalia e petéquias dispostas em toda a superfície do órgão.

LEY et al. (1983) , estudando as lesões histopatológicas provocadas pelo vírus da DIB, em aves SPF de cinco semanas de idade, constataram que:

- aos três dias após a inoculação, a Bursa de Fabricius apresentava-se tornada por grande número de folículos, linfócitos e macrófagos;

- a presença de heterófilos dentro dos folículos, com predominância no interior dos espaços interfoliculares com ocorrência de edema;

- pequenas áreas de necrose no interior dos folículos linfóides formando espaços com grande quantidade de material eosinófilo;

- macrófagos e células plasmáticas aos sete dias após a inoculação, com grande quantidade de tecido conjuntivo;

- aos dez dias após a inoculação, o tecido conjuntivo interfolicular mostrava-se sem grandes alterações, com poucos heterófilos e células linfóides;

- aos quatorze dias após a inoculação, os folículos estavam divididos por uma camada de células mononucleares e tecido conjuntivo, sendo que a maioria dessas células eram fibroblastos e macrófagos.

Segundo GIAMBRONE, (1986) o vírus da DIB, provoca imunodepressão, aumentando a incidência de enfermidades como: doença de Newcastle, doença de Marek, bronquite infecciosa, anemia infecciosa, eimeriose, salmonelose, alterando o epitélio da bolsa, apresentando hiperplasia de células epiteliais.

ROSEMBERG et al. (1987) , observaram que aves SPF com quatro semanas de idade, inoculadas com duas variantes virais pelo vírus da DIB, apresentaram somente atrofia da bolsa, não ocorrendo mortalidade.

2.11 DIAGNÓSTICO DO VÍRUS DA DIB.

O vírus da DIB faz parte de um grupo de antígenos que podem ser detectados através de precipitação em gel de agar, anticorpos fluorescentes e teste ELISA, segundo ALLAN et al. (1984) .Além do grupo comum de antígenos, cada vírus da DIB contém um antígeno ou antígenos responsáveis pela especificidade do sorotipo. Os sorotipos são identificados pelos testes de neutralização com um antisoro sorotipo específico, (McFERRAM et al.1980). A resposta imune tem efeito imunossupressor contra muitos antígenos, segundo ALLAN et al.(1972) , mas induz à produção de altos níveis de anticorpos contra o vírus da DIB.

2.12 CONTROLE DA DIB.

A melhor forma de controle de DIB é através da imunização das matrizes e dos pintainhos, sendo que a vacinação de matrizes é mais difundida para a proteção da progênie, (LUCIO et al. 1980) . O mesmo autor estudou a imunossupressão induzida pelo vírus da DIB. Neste experimento utilizaram-se aves livres de antígenos específicos, SPF, desafiadas em 7, 14, 21, 28, 35 e 42 dias de idade, com uma amostra de campo do vírus da DIB. (73688) obtida de frangos de corte e uma amostra vacinal do vírus da DIB, bastante invasiva, denominada "forte". Ambas amostras foram administradas através da via ocular. Os títulos dos anticorpos contra o vírus da DIB, foram mensurados durante os desafios,

(inoculação de antígenos no grupo de aves vacinadas), e quatro semanas após. Concluiu-se que a amostra "forte" apresentou-se tão patogênica quanto a amostra de campo (73688) e a resposta imune ativa, frente a amostras do vírus da DIB, foi bastante deprimida. Os autores concluíram também que não ocorre resposta imune se o vírus da DIB não se multiplicar na bolsa já que níveis de anticorpos necessários para neutralizar o vírus da DIB, variam com a capacidade de infecção da amostra.

Contrariando com autores supra-citados, OKOIE E UZOUKWU, (1990), demonstraram que a bolsa não é essencial para o estabelecimento da DIB, mas é importante para a infecção clínica. Após uma exposição de campo ou vacinação com vírus da DIB, obtêm-se títulos maiores que 1:1000, segundo LUKERT e HITCHER, (1984), entretanto, respostas fracas detectadas através do teste ELISA e soroneutralização, foram obtidas em aves adultas imunizadas com vacinas inativadas do vírus da DIB. Duas explicações têm sido apresentadas: a primeira é a pequena massa antigênica inoculada nas aves; a segunda é devido à diminuição da imunogenicidade em função do processo de purificação que talvez provoque destruição ou alteração de conformação do epítipo, devido ao tratamento químico, FAHEY et al. (1986).

A partir de 1985 ocorreu rápido desenvolvimento na produção e na utilização de vacinas para a prevenção da DIB, GIAMBRONE, (1986). Segundo o mesmo autor, nos E.U.A faz-se a administração de uma vacina da DIB denominada "suave", no primeiro dia de idade, e uma vacina denominada "intermediária" aos dez dias de idade.

Na criação comercial de frangos de corte, segundo COSGROVE, (1962), devido à estabilidade do vírus da DIB no meio ambiente, o controle através de métodos sanitários e isolamento de lotes contaminados não é prático.

O principal método de controle é através da vacinação. Dos dois sorotipos do vírus da DIB reconhecidos nos Estados Unidos e Europa, somente o sorotipo 1 e suas variantes têm sido causadoras de doença. As vacinas atuais são produzidas a partir do sorotipo 1.

A principal ênfase para o controle da DIB é através da vacinação de matrizes, com objetivo de produzir pintainhos com imunidade passiva durante a fase de maior susceptibilidade à DIB. Os anticorpos existentes no saco vitelínico protegem a progênie contra uma infecção subclínica precoce. Aves adultas apresentam-se refratárias à infecção natural pelo vírus da DIB, razão pela qual, produtos de uso parenteral altamente antigênicos, como vacinas inativadas com adjuvante oleoso, são usadas para aumentar a imunidade em matrizes previamente sensibilizadas pela exposição natural ao vírus vivo.

Segundo WINTERFIELD et al. (1980) o nível da imunidade passiva é variável e imprevisível; uma prática comercial bastante utilizada é a vacinação de todos os pintainhos contra o vírus da DIB, nas primeiras três semanas de idade. As vacinas totalmente atenuadas não induzem imunidade em aves, na presença de anticorpos maternos.

As vacinas inativadas são ineficientes na indução da imunidade ativa em aves com anticorpos maternos, e as vacinas atuais atenuadas, variam com relação à segurança e eficácia (THORNTON & PATTISON, 1975).

As vacinas acima mencionadas são classificadas como "suaves", quando são altamente atenuadas e "intermediárias" quando possuem virulência moderada. Nos Estados Unidos as vacinas mais utilizadas são as "intermediárias", segundo GIAMBRONE, (1986).

Segundo ROSEMBERG & CLAUD. (1987), aves inoculadas com vacinas produzidas com o sorotipo 1 não são protegidas contra uma

infecção causada por viroses variantes do vírus da DIB. Estão sendo desenvolvidas nos Estados Unidos pesquisas para a produção de vacinas variantes atenuadas, através da passagem em cultura de células, (ROSMBERG, 1989) .

Segundo GIAMBRONE, (1986), a administração da vacina da DIB no primeiro dia de idade, em pintainhos com grande quantidade de anticorpos maternos, causará queda anormal no título de anticorpos maternalmente derivados, fato que poderá ser amenizado aplicando-se o reforço com 10 dias de idade.

MANFREDINI et al. (1989) , estudando a eficiência da vacinação para a DIB em aves, de linhagem comercial com 1 dia de idade e aves SPF, concluíram que 14 dias após a vacinação ocorreu a formação de anticorpos nas aves SPF. As aves portadoras de anticorpos maternos não apresentaram título.

SILVA et al. (1989) , estudando a vacina para DIB, constataram que a cepa forte induziu a elevação dos títulos de anticorpos em aves protegidas maternalmente, a partir de 14 dias de idade. Os frangos do lote vacinado para a DIB, responderam à aplicação da vacina de Newcastle, produzindo títulos mais elevados em relação àquelas aves que não receberam a vacina para a DIB.

2.13 TESTES PARA A DETECÇÃO DO VIRUS DA DIB.

Atualmente os testes mais utilizados para a detecção de anticorpos contra o vírus da DIB, são:

- Precipitação em gel de agar, HIRAI e SHIMAKURA, (1972);
- Teste de virusneutralização, NAQI et al.(1980) ;
- Imunofluorescência, ALLAN et al. (1984) ;

- ELISA, SOLANO et al. (1985) ;

Segundo TIZARD. (1985) , as imunoglobulinas diferem em sua capacidade de reação nas provas sorológicas, podendo aparecer em maior ou menor quantidade, e em períodos diferentes após a infecção. O ELISA é uma técnica moderna e possui vantagens sobre outros testes, tais como:

- facilidade de capturar o antígeno em lugar dos procedimentos lentos e dispendiosos de cultivo celular;

- seus resultados podem ser avaliados quantitativamente;

- a técnica pode ser automatizada e os resultados podem ser processados e interpretados por computador.

2.14 O TESTE ELISA.

A prova de immunoadsorção enzimática, mais conhecida como ELISA, derivada de seu nome em inglês (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay), ensaio este capaz de detectar uma grande quantidade de substâncias sendo 25 vezes mais sensível que o teste de precipitação em gel de agar. Estudos demonstraram que o teste de ELISA é mais eficiente em estágios iniciais da infecção, em relação ao teste de soroneutralização viral,(MARQUARDT et al. 1980) , bem como uma grande quantidade de organismos, (LUCIO, 1980) . O teste de ELISA, por sua facilidade e rapidez de utilização converteu-se em técnica amplamente utilizada para a monitoria sorológica dos plantéis, (GIAMBRONE, 1986). O teste de ELISA é principalmente utilizado para a detecção de anticorpos da classe IgG, devido à predominância desses anticorpos no soro durante o curso da doença, (NICHOLAS & THORNTON. 1986) .

O teste ELISA utiliza placas de cloreto de polivinila ou poliestireno, com 96 poços com fundo plano. A utilização de soros de aves

em diluições menores que 1:100, produzem absorvâncias inespecíficas muito elevadas, devido à afinidade das imunoglobulinas de aves pelas microplacas, (ROMERO, 1989) . A enzima utilizada no conjugado com antisoro varia entre os laboratórios e de um modo geral a peroxidase é mais sensível para ensaios colorimétricos, enquanto a B-galactosidase possui maior sensibilidade em ensaios fluorimétricos, (ROMERO ,1989) . Os títulos expressos pelo teste de ELISA, não correspondem a um título de outro sistema, (ROMERO, 1989) .

Os recentes avanços no conhecimento da estrutura molecular e da imunologia da DIB, serão a base para o desenvolvimento de vacinas atenuadas . As vacinas formadas por partículas virais imunogênicas, poderão ser preparadas diretamente a partir do vírus através de técnicas de recombinação do DNA. Isto permitirá a produção em larga escala de polipeptídeos protetores específicos. Peptídeos sintéticos que possuem os determinantes antigênicos protetores para o vírus da DIB.

Outros método para a produção de vacinas através de técnicas de recombinação do DNA , utilizando a inserção de genes imunógenos do vírus da DIB, em vetores virais vivos, como o vírus da varíola aviária, (BOYLE & COUPAR. 1986) . Essas vacinas recombinantes poderão ser econômicas e eficientes.

Com relação ao vírus da DIB, será necessário identificar a parte do vírus responsável pela virulência para criar vacinas vivas modificadas que sejam imunogênicas tanto quanto seguras para sua utilização.

3 - MATERIAL E MÉTODOS

O principal objetivo da presente pesquisa, foi estudar a influência de três vias de aplicação e duas cepas diferentes da vacina para a DIB, sobre a soroconversão, conversão alimentar e mortalidade de frangos de corte.

O experimento consistiu em vacinar seis grupos de aves, com dois tipos de vacina, (cepa forte e intermediária). A vacinação foi realizada através de três vias de administração, (via oral, nasal e ocular), aos 7 dias de idade. Algumas aves de cada grupo foram aleatoriamente escolhidas para a mensuração dos anticorpos para DIB. Foram realizadas colheitas de sangue aos 6, 21 e 42 dias de idade. O sangue foi colhido através de punção cardíaca. Posteriormente o mesmo foi centrifugado e mantido sob congelamento para posterior titulação através do método ELISA.

O teste ELISA foi executado no Centro de Diagnóstico Marcos Henrietti. Situado no setor de Ciências Agrárias da UFPr, em Curitiba. Utilizou-se, para a leitura das microplacas o espectrofotômetro modelo LT 340 ATC, com filtro se 405-410 nm.

O ensaio foi idealizado para mensurar a quantidade de anticorpos para a DIB contido em uma amostra de soro. As microplacas continham antígenos para a DIB. O soro das aves testadas continha anticorpos específicos anti DIB. Logo após o soro a ser testado ficar a

temperatura ambiente para descongelamento, o mesmo foi diluído em solução Buffer. Posteriormente o soro das aves do experimento foi colocado em uma microplaca recoberta por antígenos da DIB. Os anticorpos específicos do soro, formaram complexos antígeno-anticorpo, com os antígenos existentes na microplaca. Adicionou-se à microplaca uma solução conjugada contendo; peroxidase e imunoglobulina anti soro de galinha, em cada poço da microplaca. O complexo antígeno-anticorpo que permaneceu aderido a placa após a lavagem ligou-se a solução conjugada. Após breve período de incubação, a solução conjugada não ligada ao complexo antígeno-anticorpo foi removida através de mais uma lavagem. Posteriormente a solução substrato contendo uma substância cromogênica, ABTS (solução substrato de peróxido de hidrogênio), foi adicionado a cada poço da microplaca. A substância cromogênica muda de cor. Passando do cristalino ao verde azulado, aproximadamente 15 minutos após, e é diretamente proporcional ao nível de anticorpos da DIB existentes no soro. Logo em seguida adicionou-se a solução bloqueadora para finalizar a reação. A microplaca está pronta para ser colocada na leitora de placa de ELISA.

3.1 O EXPERIMENTO

O experimento foi realizado no Centro de Estações Experimentais da UFPr localizado no município de Pinhais-Ctba, no período de 01 de Outubro a 20 de Dezembro de 1993.

Foram utilizados 2400 pintos de um dia da linhagem Arbor-Acres, provenientes de matrizes da mesma faixa etária e igual período de postura, as quais haviam recebido uma dose de vacina oleosa para a doença infecciosa da bolsa no início do período de postura.

3.2 - INSTALAÇÕES

As aves foram criadas em galpão dividido em 24 boxes previamente higienizados, bem como os comedouros e bebedouros.

Cada box foi equipado com dois comedouros tubulares, dois bebedouros pendulares e continha 100 pintinhos.

3.3 - RAÇÃO E CONVERSÃO ALIMENTAR

As aves receberam ração inicial do primeiro ao vigésimo primeiro dia de idade e do vigésimo segundo ao quadragésimo segundo dia de idade receberam ração de crescimento, à vontade. A ração fornecida foi anotada em uma ficha para posteriormente ser calculado o consumo e a conversão alimentar no período de troca de ração e no final do experimento, quando 50% das aves foram pesadas e assim obtido o peso médio do lote. A conversão alimentar média para os períodos de 1-21 e 21-42 dias foi calculada através da relação entre o consumo médio e o peso médio de cada tratamento.

3.4 - TRATAMENTOS E VIAS DE APLICAÇÃO

O experimento constou de três tratamentos com dois tipos de cepas (forte e intermediária) e três vias de aplicação (oral, nasal e ocular). A vacinação foi realizada no sétimo dia de vida das aves.

O experimento foi conduzido em um delineamento inteiramente

casualizado em esquema fatorial através de dois tipos de cepas e três vias de inoculação, com quatro repetições cada.

Os tratamentos foram:

- vacina forte e via de aplicação oral
- vacina forte e via de aplicação nasal
- vacina forte e via de aplicação ocular

- vacina intermediária e via de aplicação oral
- vacina intermediária e via de aplicação nasal
- vacina intermediária e via de aplicação ocular

Cada tratamento foi ministrado em 400 aves.

A administração oral foi feita diluindo o conteúdo liofilizado em 20 litros de água. Neste caso as aves permaneceram sob jejum hídrico duas horas antes da administração da vacina.

A administração da vacina pela via ocular e nasal foi realizada utilizando a mesma proporção de doses por número de aves como na vacinação oral. Logo o frasco de vacinas de 1000 doses foi diluído em 29,70 ml, sendo administrados 0,028 ml para cada ave. Esta diluição foi utilizada tanto para a via ocular quanto para a via nasal.

3.5 - COLHEITA DE SANGUE

O experimento teve início quando as aves completaram 6 dias de idade, sendo realizada a primeira colheita de sangue de uma amostra aleatória de cinco aves de cada box. A retirada do sangue foi feita com seringas descartáveis, sendo o mesmo posteriormente estocado em frascos de vidro previamente identificados para cada box. Após a colheita os os frascos foram deixados em temperatura ambiente durante trinta minutos e em seguida transferidos para o refrigerador.

O objetivo da realização da colheita de sangue no sexto dia de idade, foi para que se pudesse detectar e quantificar os anticorpos maternos (imunidade passiva) antes que fosse feita a vacinação.

A colheita de sangue foi feita aleatoriamente, através de punção cardíaca.

As colheitas seguintes foram realizadas aos vinte e um e quarenta e dois dias de idade. O procedimento durante as três coletas de sangue foi rigorosamente o mesmo.

Encerrada a colheita de sangue, as amostras foram acondicionadas em caixas de isopor e transportadas para o laboratório de imunologia, no Centro Politécnico da UFPr, onde foram realizadas as outras etapas do experimento.

3.6 - PROCESSAMENTO DO SANGUE

Nesta etapa o sangue colhido é centrifugado a 1500 rpm. O objetivo da centrifugação foi o de obter um soro mais limpo e puro já que em muitas amostras o soro havia se aderido ao coágulo sanguíneo, dificultando assim a retirada do mesmo do recipiente que se encontrava, para a sua utilização.

O soro, foi colocado em frascos plásticos com tampa de pressão e rosca, apropriados para congelamento e devidamente identificados.

Todas as amostras de soro foram obtidas em duplicatas para maior segurança e em seguida congeladas.

3.7 - TESTE IMUNOENZIMÁTICO (ELISA)

O teste imunoenzimático - ELISA foi escolhido para a detecção de anticorpos da DIB nas amostras de soro sanguíneo. Os valores obtidos do teste ELISA, representaram uma comparação dos níveis de anticorpos de cada amostra de soro de aves do campo testadas com o soro normal e soro positivo. Um título "0" significou que a amostra de soro continha níveis significantes e detectáveis de anticorpos quando comparadas com o soro controle positivo e soro controle normal.

3.7.1 - Preparação da diluição do soro na placa de diluição

Primeiramente adicionou-se 300 microlitros de Buffer em cada um dos 96 poços da microplaca, utilizando uma micropipeta. Em seguida adicionou-se 6 microlitros do soro a ser testado, em cada poço. Esta etapa teve início no poço A4 e terminou no H9, movendo-se da esquerda para a direita. Foram adicionados 6 microlitros do soro controle normal, produzindo uma diluição de 1:50, nos poços A2, H10 e H12. Os soros permaneceram na placa de diluição durante 5 minutos antes de serem transferidos para a placa de ELISA.

3.7.2 - Preparação do soro controle positivo

Diluiu-se o soro controle positivo na solução de Buffer na proporção 1:50, misturando-se 6 microlitros do soro controle positivo em 300 microlitros da solução Buffer. Foram necessários 150 microlitros de soro controle diluído para cada placa de ELISA.

3.7.3 - Preparação da solução conjugada.

Diluiu-se 100 microlitros da solução conjugada, em 10 ml de solução Buffer. Cada microplaca necessitou de 10ml desta solução.

3.7.4 - Preparação da solução de lavagem

Diluiu-se 20 ml da solução de lavagem em 380 ml de água destilada. Foram necessários 400 ml desta solução para cada microplaca.

3.7.5 - Preparação da solução substrato

A solução substrato não necessitou de diluição. Cada microplaca demandou de 10 ml desta solução, que para melhor resultado necessitou estar equilibrada com a temperatura ambiente antes do uso.

3.7.6 - Preparação da solução bloqueadora

Diluiu-se 2.5 ml da solução bloqueadora concentrada em 10 ml de água destilada, cada microplaca requereu aproximadamente 12,5 ml de solução bloqueadora.

3.7.7 - Procedimentos para a execução do teste ELISA

Assim que os reagentes e a diluição do soro ficaram prontos, foi iniciado então o preparo da placa de ELISA.

Adicionou-se 50 microlitros da solução Buffer em cada um dos 96 poços da placa, em seguida adicionou-se 50 microlitros do soro controle positivo nos poços A1, A3 e H11, sempre descartando a ponteira da pipeta. Utilizando uma pipeta multicanal transferiu-se 50 microlitros das amostras de soro diluído e soro controle normal da placa de diluição de soro para os poços correspondentes da placa de ELISA. Durante 15 minutos, a placa de ELISA ficou encubando para que as reações se processassem à temperatura ambiente.

3.7.8 - Procedimentos de lavagem da microplaca.

Utilizando uma pipeta multicanal, foram descartados 300 microlitros da solução de lavagem em cada um dos 96 poços. A solução de lavagem ficou nos poços durante 3 minutos. O processo de lavagem foi uma etapa crítica no procedimento do teste ELISA. O processo foi repetido duas vezes mais.

3.7.9 - Adição do conjugado, substrato e solução bloqueadora.

Usando uma pipeta multicanal, colocou-se 100 microlitros da solução do conjugado em cada um dos 96 poços da microplaca descartando as ponteiros, após 15 minutos lavou-se novamente a microplaca conforme descrito anteriormente. Utilizando uma pipeta multicanal colocou-se 100 microlitros da solução bloqueadora em cada um dos 96 poços da microplaca, após as bolhas de ar se dissiparem a microplaca ficou pronta para ser interpretada.

3.7.10 - Procedimentos para a leitura da microplaca

O filtro para a leitura era de 405-410 nm. A média da absorbância do soro controle positivo foi calculada utilizando-se os valores do soro controle normal obtidos através da leitura dos poços; A2, H10 e H12, posteriormente subtraiu-se os valores da média do soro controle normal dos valores da média do soro controle positivo. Esta diferença foi o valor do soro controle positivo. O valor da amostra do soro foi calculada subtraindo-se o valor da amostra da média dos valores do soro controle positivo, o valor resultante foi dividido pelo valor do soro controle positivo. O título da amostra foi calculado da seguinte maneira: \log_{10} do título = $(1.172 \times \log_{10}$ da amostra + 3.614).

3.8 - MORTALIDADE

Após a última colheita de sangue foi realizada a somatória do número de aves mortas, de causas não identificadas dos diferentes tratamentos. As aves que morreram devido a procedimentos relacionados com a colheita de sangue e pesagens realizadas durante o experimento, não foram somadas.

3.9 - DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Para este experimento o uso de um estudo inferencial foi preterido em relação ao descritivo, visto que o planejamento deste e os resultados obtidos não foram favoráveis a aplicações de técnicas estatísticas, tais como análise de variância e análise de regressão. Porém vale ressaltar a importância da estatística descritiva para relatar os principais resultados obtidos no experimento, através de gráficos e tabelas.

4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 - EFEITO DA VACINAÇÃO DAS MATRIZES SOBRE O TÍTULO DOS PINTAINHOS TESTADOS COM SEIS DIAS DE IDADE.

A figura 1. ilustra os títulos obtidos das aves submetidas ao teste, com seis dias de idade. As aves nesta fase do experimento ainda não haviam recebido vacinas.

Os títulos obtidos das aves na primeira semana de idade, indicaram que os pintainhos receberam uma quantidade de anticorpos maternalmente derivados bastante baixa e desuniforme. Esta irregularidade é percebida quando se observa os valores da média, título máximo e desvio padrão. Em decorrência deste fato, observou-se que das 110 aves testadas; 45 aves, ou 40,9% apresentaram títulos abaixo do limite mínimo de proteção para esta faixa etária que corresponderia a um título igual ou superior a 500, de acordo com SNYDER et al.(1984), sessenta e cinco aves ou 59,1% apresentaram títulos superiores a 500.

O fato da média ficar acima de 500, ocorreu devido a irregularidade dos títulos obtidos, que variaram de zero até 2335 elevando o desvio padrão e a média .

SNYDER et al.(1984) , estudando métodos para a detecção de viroses através de ensaios de laboratório constatou que aves que

apresentavam títulos variando de 500-1000 mostravam-se protegidas de um desafio pelo vírus da DIB. Enquanto que as aves que apresentaram títulos abaixo de 500 mostravam-se susceptíveis a um desafio pelo vírus da DIB.

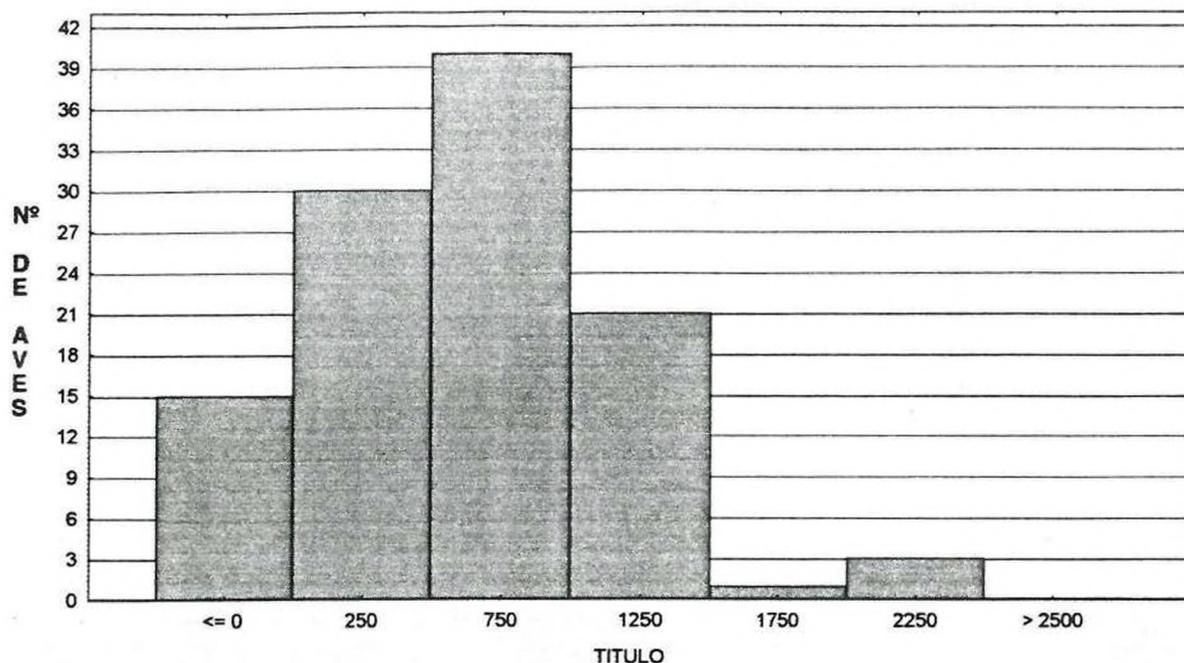


Fig. 1. Título de anticorpos da DIB em aves testadas com seis dias de idade. Número de aves, 110. Média dos títulos 619, maior título 2335 e desvio padrão 488.

4.2 - EFEITO DOS DIFERENTES TRATAMENTOS SOBRE O TÍTULO DAS AVES TESTADAS COM 21 DIAS DE IDADE.

Os títulos obtidos de aves com 21 dias de idade de acordo com os diferentes tratamentos, encontram-se nas tabelas 1 e figura 2.

A Tabela 1 ilustra os resultados obtidos de aves com 21 dias de idade, as aves receberam vacinas aos sete dias de idade.

Os títulos, que na primeira semana já não eram altos suficientes

para a proteção de 40,9% das aves de uma infecção subclínica precoce, apresentaram queda substancial, deixando as aves submetidas ao teste em um nível subprotetor, portanto susceptíveis à infecção precoce pelo vírus da DIB. Em relação às diferentes vias de aplicação de vacina, não foi encontrada muita diferença entre as aves submetidas aos diferentes tratamentos até esta idade. O maior título de anticorpos foi obtido com a vacinação feita por via oral, utilizando cepa intermediária, seguido pela via ocular utilizando a a mesma cepa. A via de aplicação nasal, mostrou-se pouco recomendada pois o nível de proteção que ela proporcionou foi muito baixo.

Pode-se observar ainda que a cepa forte, administrada por via ocular e oral não induziu a formação de anticorpos contra o vírus da DIB pois os mesmos apresentaram-se abaixo do limite mínimo de proteção para esta faixa etária, que é de aproximadamente 500 de acordo com SNYDER et al.(1984). Através destes resultados, pode-se observar também que em presença de níveis desuniformes de anticorpos maternos contra a DIB, a cepa intermediária foi capaz de produzir uma soroconversão melhor, mesmo quando utilizada por diferentes vias de aplicação, em frangos de corte com 21 dias de idade. Os resultados superiores apresentados pela via oral e cepa intermediária podem ser explicados pela menor virulência da vacina com a cepa intermediária e pela ingestão de um número diferenciado de partículas vacinais. A quantidade variável de antígenos vacinais, ingeridos através da vacinação feita pela via oral, pode ser responsável pela produção antecipada de anticorpos contra o vírus da DIB apresentada por esta via aos 21 dias de idade em relação aos demais tratamentos.

Para frangos de corte com 21 dias de idade, a quantidade de anticorpos apresentada pelas aves submetidas ao teste, mostra-se insuficiente para a proteção das mesmas contra uma infecção provocada pelo vírus da DIB, de acordo com SNYDER et al. (1984).

MANFREDINI et al. (1990) , estudando a vacinação contra a DIB no primeiro dia de vida em aves SPF e comerciais, constatou que as aves comerciais que apresentaram título médio no primeiro dia de aproximadamente 600, não responderam sob o ponto de vista sorológico a qualquer vacinação no primeiro dia de idade. Os mesmos autores também constataram que a queda no nível dos anticorpos maternos aconteceu na mesma velocidade que ocorreu com as aves expostas ao vírus vacinal.

As mesmas observações foram encontradas por NAQI et al. (1982) , quando estudou os efeitos dos anticorpos maternos sobre a imunização. Neste experimento estes autores constataram que aves portadoras de altos títulos para a DIB não demonstraram resposta às vacinações comerciais e apresentaram-se refratárias às cepas patogênicas de campo. Entretanto aves com baixos níveis de anticorpos maternos responderam fraca e lentamente à vacinação.

TABELA 1. Títulos médios obtidos aos 21 dias de idade das aves vacinadas aos 7 dias de idade, de acordo com os diferentes tratamentos.

Cepa Vacinal	Via de Inoculação			
	Nasal	Ocular	Oral	Média
Cepa Forte	24,5	15,75	20,3	20,20
Cepa Intermediária	10,91	56,4	170,4	79,4

A figura 2 ilustra os títulos obtidos de aves com 21 dias de idade vacinadas por diferentes vias e cepas. Esta figura apresenta uma visão global dos diferentes títulos das aves submetidas a diferentes tratamentos. Os melhores resultados foram obtidos pela cepa intermediária e via oral.

Foram testadas 72 aves, deste total 60,9 aves ou 84,7% apresentaram título abaixo de 100.

Em todos os tratamentos ocorreu uma diminuição do nível de

anticorpos em relação a primeira mensuração realizada quatorze dias antes. Esta diminuição pode ser atribuída a virulência das vacinas utilizadas no teste, que podem ter antecipado o declínio dos níveis dos anticorpos maternos, principalmente quando a via de administração de vacina utilizada minimiza as variações em relação a quantidade aplicada, como por exemplo a via ocular e nasal, pois nestes casos a quantidade de vacina aplicada sempre foi a mesma. O que não ocorreu com a via oral, em que existiu uma variação na quantidade de vacina ingerida pelas aves. Esta variação, aliada a cepa vacinal mais adequada para realizar a soroconversão em presença de anticorpos maternos pode ser a razão para os melhores resultados da via oral e cepa intermediária nesta faixa etária.

Entretanto todos os tratamentos apresentaram títulos abaixo valor mínimo, que é de 500, para garantir uma proteção frente a uma infecção pela vírus da DIB. De acordo com SILVA (1989) .

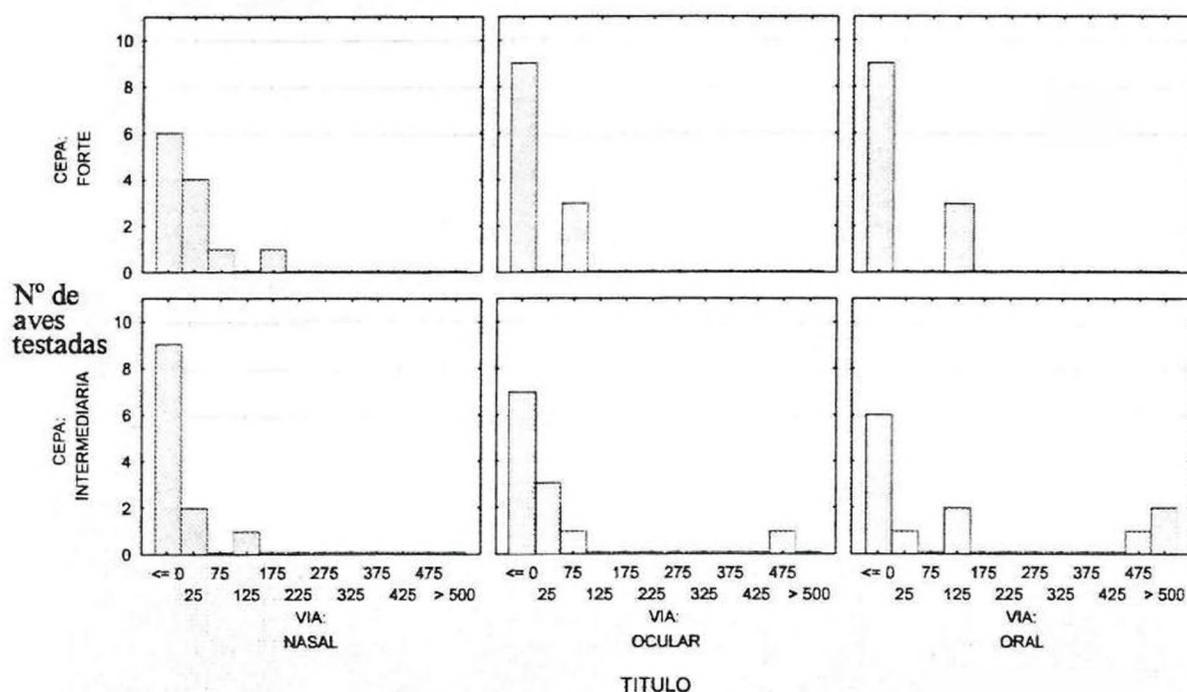


Fig 2. Títulos dos anticorpos obtidos de 72 aves com 21 dias . As aves foram vacinadas aos 7 dias de idade por diferentes cepas e vias de aplicação.

4.3 - CONVERSÃO ALIMENTAR OBTIDA DE AVES COM 21 DIAS SUBMETIDAS AOS DIFERENTES TRATAMENTOS.

A conversão alimentar média, de acordo com os tratamentos e cepas vacinais utilizadas, encontram-se na tabela 2 e figuras 3 .

A Tabela 2 ilustra os resultados da conversão alimentar obtidos de aves com 21 dias de idade. As aves foram vacinadas aos 7 dias de idade com diferentes vias e cepas.

Não houve muita diferença entre as aves submetidas aos diferentes tratamentos aos 21 dias de idade. Entretanto, a via oral proporcionou a melhor conversão alimentar, principalmente quando utilizou-se cepa forte, seguido pela via nasal utilizando-se a cepa intermediária. A via de administração ocular apresentou resultados inferiores às demais vias, com ambas cepas vacinais .

Em relação às cepas, a forte apresentou resultados ligeiramente superiores em quase todas as vias de aplicação, somente quando combinada com a via nasal ela apresentou resultados inferiores a cepa intermediária.

TABELA 2. Conversão alimentar média obtida de 1200 aves aos 21 dias de idade, de acordo com os diferentes tratamentos e cepas.

Cepa Vacinal	Via de Inoculação			
	Nasal	Ocular	Oral	Média
Cepa Forte	1,729	1,777	1,623	1,709
Cepa Intermediária	1,641	1,80	1,695	1,712

A figura 3 ilustra os resultados de conversão alimentar das aves vacinadas aos 7 dias de idade por diferentes vias e cepas.

As aves vacinadas com a cepa forte e via oral, apresentaram os melhores resultados em termos de conversão alimentar, os quais são superiores aos demais tratamentos devido a menor conversão e menor dispersão apresentadas em relação à média. A combinação, cepa intermediária, via oral apresentou resultados dispostos em uma curva normal. Entretanto devido a grande dispersão dos valores este tratamento não apresentou a melhor conversão alimentar.

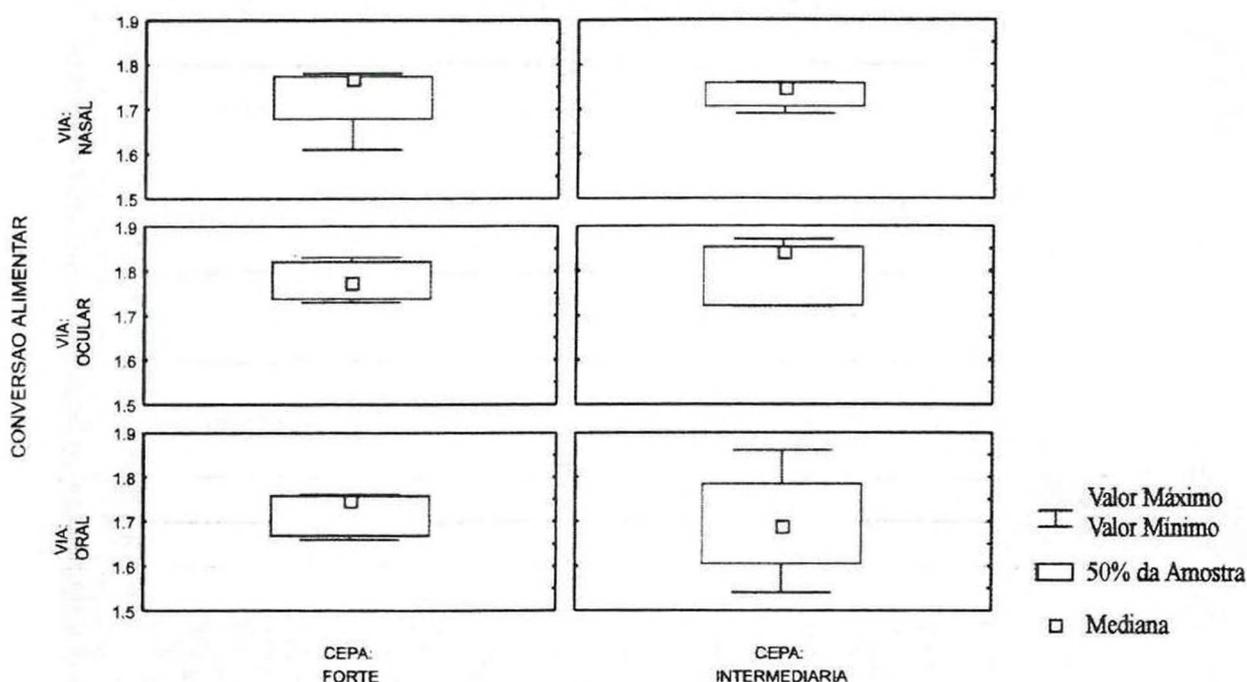


Fig. 3. Resultados de conversão alimentar obtidos de 1200 aves com 21 dias de idade que foram vacinadas aos 7 dias por diferentes vias e cepas.

A tabela 3 ilustra os resultados de peso médio de aves vacinadas aos 7 dias de idade por diferentes vias e cepas.

As aves vacinadas por via oral e cepa intermediária apresentaram os pesos médios mais elevados, seguidos pela cepa forte com a mesma via. As aves vacinadas por via nasal e cepa forte apresentaram a terceira melhor média de pesos aos 21 dias e por último encontram-se as aves vacinadas por via ocular e cepa intermediária que apresentaram os pesos médios mais baixos.

Os resultados de pesos médios aos 21 dias demonstraram que as aves que receberam vacina por via oral com ambas as cepas, apresentaram-se mais pesadas e utilizaram menos ração para alcançar este peso. Ou seja, foram mais eficientes na conversão de alimentos em peso. O mesmo aconteceu com a soroconversão, pois a cepa intermediária e via de aplicação oral apresentaram os títulos de anticorpos mais elevados aos 21 dias de idade.

Comparando-se os três parâmetros, títulos de anticorpos, conversão alimentar e peso médio, observou-se que a via oral e cepa intermediária apresentaram os títulos de anticorpos e pesos médios mais elevados do que àqueles apresentados pela cepa forte e via oral, entretanto, os resultados de conversão alimentar obtidos pela via oral intermediária foram inferiores àqueles apresentados pela cepa forte e via oral, que somente neste ítem apresentaram resultados superiores .

Os resultados apresentados aos 21 dias de idade, provavelmente estão relacionados com a via de aplicação de vacinas, que favoreceu a multiplicação viral, seja pelo número de células alvo ao longo do tubo intestinal, ou pelo maior número de anticorpos presentes ao longo do trato intestinal induzindo a replicação viral dentro de parâmetros que não ocasionem qualquer dano ao sistema imune das aves.

Em relação as cepas, a intermediária promoveu soroconversão de anticorpos precocemente em relação a cepa forte, quando utilizou-se a

via oral, provavelmente esta cepa quando associada a via oral, apresentou-se mais adaptada as condições do experimento, pois mesmo em presença de anticorpos maternos houve formação de anticorpos.

A via ocular apresentou resultados inferiores de conversão alimentar e peso médio aos 21 dias de idade, em relação às demais vias. Provavelmente devido ao grande número de células alvo que a conjuntiva ocular possui, propiciando maior replicação viral. Esta replicação em grande número pode ter lesado outros sistemas orgânicos das aves, diminuindo a eficiência na transformação de alimentos em peso corporal.

Os índices sorológicos encontrados neste experimento podem ter relação com a conversão alimentar e peso médio aos 21 dias de idade.

A via de aplicação oral induziu a formação níveis de anticorpos, superiores ao limite mínimo de proteção para aves com esta faixa etária. Paralelamente os índices de conversão alimentar e peso médio foram superiores aos demais tratamentos. A via ocular induziu a formação dos títulos de anticorpos mais elevados, aos 42 dias, que podem ser também interpretados como sendo parâmetros de replicação viral. Sugerindo que esta via propiciou lesões à Bursa de Fabricius, deixando às aves imunodeprimidas e favorecendo a proliferação de microorganismos patogênicos, que de alguma forma prejudicaram este grupo de aves na conversão alimentar e ganho de peso.

TABELA 3. Pesos médios em quilos obtidos 1200 aves aos 21 dias de idade, de acordo com os diferentes tratamentos.

Cepa Vacinal	Via de Inoculação			
	Nasal	Ocular	Oral	Média
Cepa Forte	0,721	0,720	0,722	0,718
Cepa Intermediária	0,717	0,711	0,734	0,723

4.4 - EFEITO DOS DIFERENTES TRATAMENTOS SOBRE O TÍTULO DAS AVES COM 42 DIAS DE IDADE.

Os títulos médios encontram-se na tabela 4 e figuras 4 e 5.

A Tabela 4 demonstra os títulos médios obtidos de aves aos 42 dias de idade, vacinadas por diferentes vias e cepas.

O melhor resultado foi obtido quando se combinou a cepa intermediária com a administração ocular, enquanto que para esta mesma cepa as vias nasal e oral apresentaram resultados quase semelhantes, com uma ligeira vantagem para a via nasal

Quando foi utilizada a cepa forte a melhor titulação foi obtida pela via ocular enquanto que a via oral foi a menos eficiente, provavelmente devido à maior diluição da vacina e a ingestão desuniforme da solução; água + vacina pelas aves.

A via oral apresentou resultados inferiores as demais vias de aplicação, com ambas cepas vacinais. Em contraste com a via oral, está a via ocular que apresentou resultados superiores as demais vias, com ambas cepas. (intermediária e forte). Provavelmente a via ocular possui estruturas mais adaptadas à replicação viral do que àquelas existentes a nível intestinal e trato aéreo superior, possibilitando a soroconversão mais eficiente.

TABELA 4. Títulos médios de anticorpos obtidos aos 42 dias de acordo com os diferentes tratamentos e cepas.

Cepa Vacinal	Via de Inoculação			
	Nasal	Ocular	Oral	Média
Cepa Forte	2614	3183,33	2033,08	2610,13
Cepa Intermediária	2319,25	3292,22	2187,3	2599,7

A figura 4 ilustra os títulos obtidos de aves aos 42 dias de idade vacinados aos 7 dias por diferentes vias e cepas. Nesta figura foram associadas 5 variáveis, desenvolvidas à partir dos dados anteriores, possibilitando comparar informações em conjunto.

Foram analisadas 72 aves, deste total; 66,6% ou 47,9 aves apresentaram títulos superiores a 1000, indicando a eficiência das cepas e vias de aplicação de vacinas utilizadas neste trabalho.

A via de aplicação que apresentou os melhores resultados foi a via ocular, seguido pela via nasal, com ambas as cepas, intermediária e forte.

A via oral apresentou resultados inferiores as outras vias, foram testadas 24 aves, deste total 50% das aves ou seja 12 aves apresentaram títulos inferiores a 1000, indicando que esta via não apresentou uma soroconversão tão eficiente quanto as outras utilizadas neste experimento, nasal e ocular.

Os resultados da via oral, são muito parecidos em ambas as cepas. Provavelmente os resultados obtidos pela via oral refletem o processo de vacinação, na qual as aves ingerem à vontade a quantidade de água contendo partículas vacinais. Sugerindo que algumas aves ingeriram mais partículas vacinais do que outras gerando uma irregularidade de títulos.

NAQI et al. (1982), estudando os efeitos dos anticorpos maternos na imunização da progênie, concluiu que aves oriundas de matrizes vacinadas, mas que apresentaram níveis baixos de anticorpos maternos, quando submetidas à vacinação produziram respostas baixas e demoradas, concordando com os resultados encontrados neste trabalho. Resultados semelhantes foram apresentados por MANFREDINI et al. (1989), que estudando duas cepas vacinais empregadas no controle da

DIB, constatando que as aves comerciais vacinadas no primeiro dia de idade, apresentaram cinco semanas mais tarde um título para a DIB de 35, nível este insuficiente para a proteção das aves de uma infecção precoce causada pelo vírus da DIB.

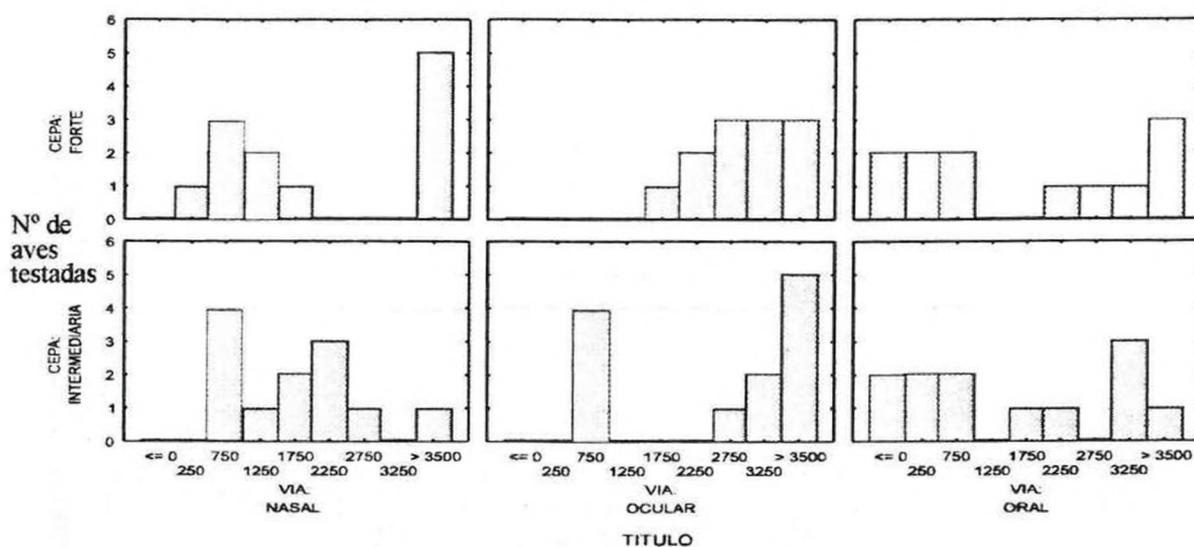


Fig. 4. Títulos obtidos de 72 aves aos 42 dias de idade vacinadas por diferentes vias e cepas. Pode-se observar aumento dos títulos em relação à mensuração anterior, realizada com 21 dias de idade.

A figura. 5 ilustra uma comparação dos títulos obtidos nas diversas datas de colheita de sangue.

Histograma demonstrativo dos valores dos títulos obtidos de aves com 6, 21 e 42 dias de idade, vacinadas por diferentes cepas e vias.

Observou-se que aos 6 dias de idade os títulos estavam ao redor de 500, aos 21 dias todos os títulos apresentaram valores abaixo de 500, muito próximos a zero. Aos 42 dias ocorreu a formação de anticorpos em grande quantidade em todos os tratamentos.

Manfredini et al.(1989), estudando a eficiência da vacinação para a DIB em aves SPF, concluíram que 14 dias após a vacinação ocorreu

a formação de anticorpos nas aves SPF, mas as aves portadoras de anticorpos maternos não apresentaram título.

A via de administração de vacina que apresentou os melhores resultados foi a via ocular, seguido pelas vias nasal e oral. A cepa forte apresentou os melhores resultados, pois somando os resultados das três vias de aplicação, (ocular, nasal e oral) obteve-se a maior média. A variação entre o menor e o maior título foi superior a cepa intermediária.

Os valores encontrados em todos os tratamentos, demonstram a eficiência das cepas vacinais utilizadas no experimento, bem como a aplicabilidade de vias não convencionais para a vacinação de aves comerciais, para a DIB. Os títulos encontrados encontram-se acima do limite mínimo para proteção de aves contra a DIB nesta faixa etária, que é de 2000, de acordo com SNYDER et al. (1984).

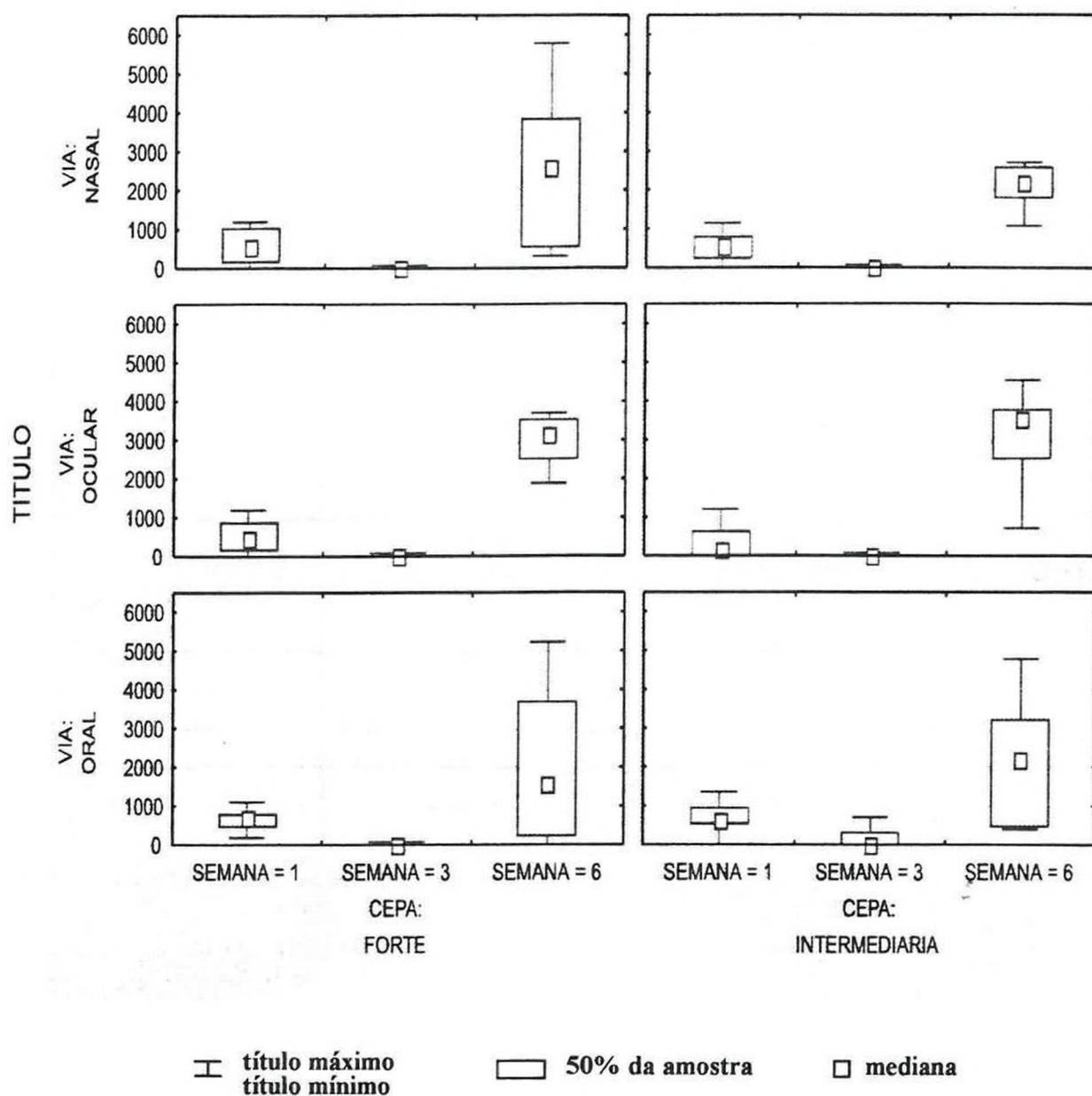


Fig. 5. Decréscimo dos níveis de anticorpos das aves testadas na terceira semana de idade e o aumento dos títulos obtidos de aves na sexta semana. Todas as aves receberam vacina aos 7 dias de idade por diferentes vias e cepas.

4.5 - CONVERSÃO ALIMENTAR MÉDIA DE AVES COM 42 DIAS DE IDADE SUBMETIDAS AOS DIFERENTES TRATAMENTOS.

A conversão alimentar média de acordo com os diferentes tratamentos e cepas encontram-se na tabela 5 e figura 6.

A tabela 5 demonstra os resultados de conversão alimentar obtidos de aves aos 42 dias de idade, vacinadas aos 7 dias por diferentes vias e cepas.

Os melhores resultados foram obtidos com a vacinação através da via nasal, utilizando a cepa intermediária, seguido pelas vias, oral e ocular. Em relação as cepas, os melhores resultados foram obtidos com a cepa intermediária. Embora a média da cepa forte foi melhodo que a intermediária, quando combinamos os tratamentos forte ocular e forte oral, os mesmos apresentaram conversão alimentar mais eficiente do que a cepa intermediária. A via ocular apresentou os piores resultados em relação aos demais tratamentos. Resultados que se repetiram aos 21 dias de idade, com ambas as cepas vacinais.

Aos 42 dias de idade aconteceram alterações nas posições em relação aos resultados de conversão alimentar. A via oral que aos 21 dias de idade apresentou os melhores resultados, apresentou resultados ligeiramente inferiores a via nasal, aos 42 dias de idade. Mas tanto aos 21, quanto aos 42 dias de idade os valores de conversão alimentar apresentados pela via oral estão dispostos normalmente, o que não ocorreu com as vias ocular e nasal.

TABELA 5. Conversão alimentar obtida de 1200 aves aos 42 dias de idade de acordo com os diferentes tratamentos e cepas.

Cepa Vacinal	Via de Inoculação			
	Nasal	Ocular	Oral	Média
Cepa Forte	2,038	2,057	1,997	2,030
Cepa Intermediária	1,87	2,071	2,033	1,991

A figura. 6 ilustra os valores de conversão alimentar aos 21 e 42 dias de idade, de aves que receberam vacinas por diferentes vias e cepas aos 7 dias de idade.

Observou-se que os valores de conversão alimentar obtidos da cepa forte aos 21 dias de idade apresentaram-se variando entre 1.6 à 1.85. Os valores estão muito parecidos àqueles encontrados em outras vias de aplicação de vacina. Entretanto quando comparamos com os resultados obtidos pela cepa intermediária também aos 21 dias de idade, observa-se que os valores obtidos pela via oral encontram-se distribuídos normalmente mas com maior dispersão em relação aos outros tratamentos. O mesmo não aconteceu aos 42 dias de idade, quando todos os tratamentos e cepas apresentaram resultados muito próximos. Não podendo-se atribuir prejuízo ou vantagem metabólica para determinada cepa ou via de aplicação de vacina. Com execução feita para a via ocular, que com ambas as cepas, (forte e intermediária) apresentou resultados que demonstraram estar relacionados. Tanto aos 21 dias de idade, quanto aos 42 os valores de conversão alimentar, e os títulos de anticorpos encontraram-se elevados em diferentes graus das demais vias de aplicação de vacinas.

Pode-se observar também que os valores de conversão alimentar obtidos aos 42 dias de idade apresentaram-se em um patamar

mais elevado do que os mesmos obtidos aos 21 dias . Demonstrando que todas as aves envolvidas na pesquisa apresentaram menor eficiência na conversão de alimentos em peso corporal à partir de 21 dias de idade.

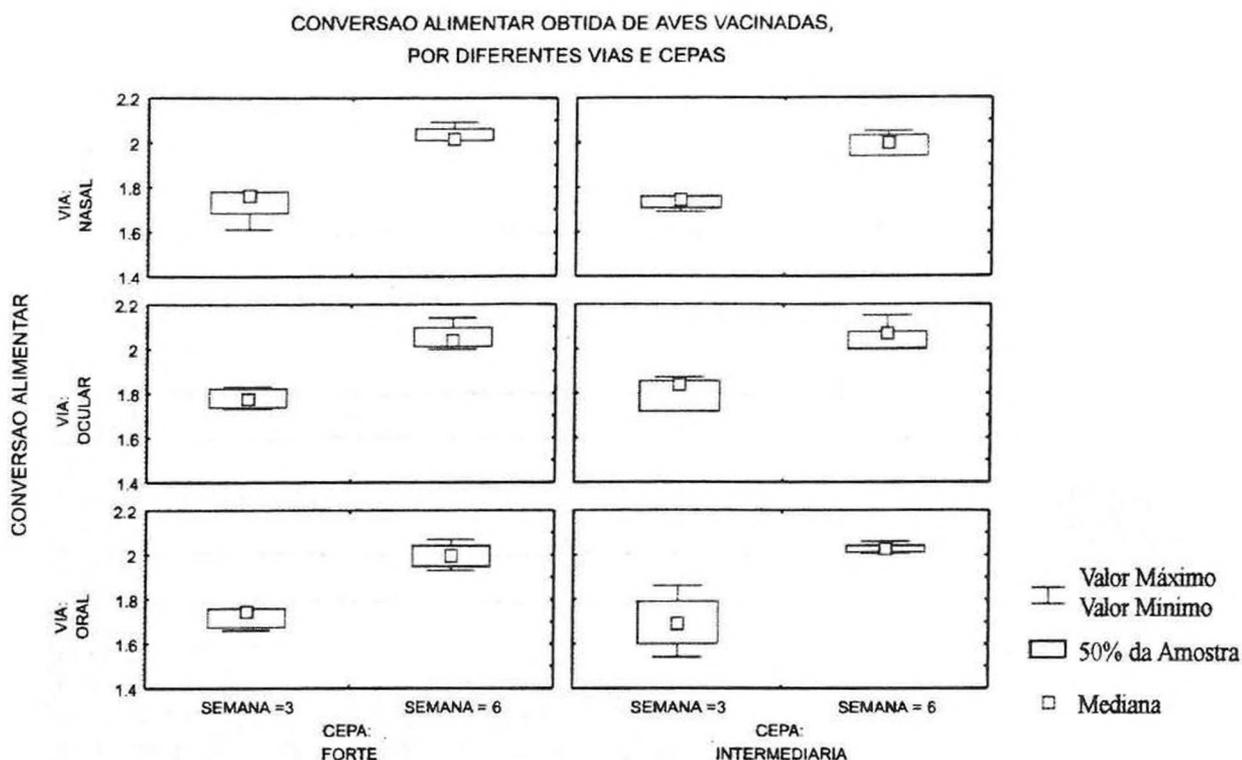


Fig. 6. Resultados de conversão alimentar de 1200 aves testadas aos 21 e 42 dias de idade. As aves receberam vacinas por diferentes vias e cepas.

A tabela 6 ilustra os resultados de peso médio obtidos de aves vacinadas aos 7 dias de idade por diferentes vias e cepas.

Os melhores resultados foram obtidos através da vacinação por via oral com ambas as cepas. A via oral também apresentou os melhores resultados aos 21 dias. Resultados inferiores foram apresentados pela via nasal com ambas as cepas, repetindo os resultados observados aos 21 dias de idade. A via de administração ocular apresentou os piores resultados quando utilizou-se a cepa intermediária. Resultados semelhantes

aconteceram aos 21 dias tanto para a conversão alimentar quanto para o peso médio.

Os resultados obtidos através da vacinação realizada por via ocular apresentaram-se paradoxais. Esta via apresentou os melhores índices sorológicos, com a formação de grandes quantidades de anticorpos e simultaneamente a pior eficiência na conversão de alimentos aliado aos pesos médios mais baixos em relação aos outros tratamentos.

Lucio et al. (1980) estudando a imunossupressão causada pelo vírus da DIB, constatou que quando aves receberam vacinas mais virulentas, estas mostraram-se tão patogênicas quanto amostras do vírus da DIB encontradas em campo.

Os resultados obtidos pelas aves que receberam vacinas por via ocular com cepa forte, neste experimento são atribuídos à menor eficiência produtiva que estas aves apresentaram. Estes resultados podem ser explicados pela maior virulência do vírus vacinal e por fatores relacionados com a via de aplicação mencionados anteriormente.

TABELA 6. Pesos médios em quilos, obtidos de 1200 aves aos 42 dias de idade de acordo com os diferentes tratamentos e cepas.

Cepa Vacinal	Via de Inoculação			
	Nasal	Ocular	Oral	Média
Cepa Forte	1,682	1,632	1,70	1,671
Cepa Intermediária	1,675	1,679	1,70	1,684

A figura 5 ilustra as taxas de mortalidade das aves que tomaram parte no experimento. O lote apresentou 5% de mortalidade, um pouco acima dos padrões normais de mortalidade, que encontram-se na faixa de 4%, de acordo com os resultados obtidos nas integrações avícolas. Provavelmente, essa elevada taxa de mortalidade possa ser atribuída ao

manejo executado nesta pesquisa.

Desde o sexto dia de idade as aves receberam inúmeros estímulos externos que podem ter contribuído para a elevação da taxa de mortalidade. As colheitas de sangue, a vacinação e as pesagens de 50% do lote aos 21 e 42 dias de idade foram atividades de longa duração e que causaram stress nas aves.

Provavelmente a menor taxa de mortalidade apresentada pela via ocular, possa ser atribuída aos altos títulos de anticorpos encontrados nas aves submetidas a este tratamento. O inverso aconteceu com as aves submetidas ao tratamento oral. Que apresentaram títulos de anticorpos inferiores. Neste tratamento houveram os maiores índices de mortalidade.

A via nasal em combinação com a cepa forte apresentou o pior resultado em termos de mortalidade, mas a mesma via quando combinada com a cepa intermediária, apresentou o segundo melhor resultado. Analisando as três vias de aplicação de vacina, pode-se colocá-las em ordem crescente em termos de mortalidade, na seguinte classificação; via ocular, via nasal e via oral.

TABELA 7. Mortalidade apresentada por 2400 aves aos 42 dias de idade vacinadas por diferentes vias e cepas.

Cepa Vacinal	Via de Inoculação			
	Nasal	Ocular	Oral	Média
Cepa forte	25	13	23	20,33
Cepa intermediária	16	19	24	19,66

5 - CONCLUSÕES

Dentro das condições de realização do presente trabalho, os resultados permitem as seguintes conclusões:

A - Aos vinte e um dias de idade, a cepa vacinal que apresentou melhores resultados produtivos e imunológicos foi a cepa "intermediária".

B - Aos vinte e um dias de idade a via de aplicação que apresentou os melhores resultados produtivos e imunológicos foi a via oral.

C - A combinação cepa vacinal e via de aplicação que apresentaram os melhores resultados produtivos e imunológicos, aos vinte e um dias de idade foram a "intermediária-oral".

D - Aos quarenta e dois dias de idade a cepa vacinal que apresentou os melhores resultados imunológicos foi a cepa "forte".

E - Aos quarenta e dois dias de idade a cepa vacinal que apresentou os melhores resultados produtivos foi a "intermediária".

F - Aos quarenta e dois dias de idade a via de aplicação que apresentou os melhores resultados imunológicos foi a ocular.

G - Aos quarenta e dois dias de idade a via de aplicação vacinal que apresentou os melhores resultados produtivos foi a nasal.

G - Os parâmetros produtivos apresentados pelas aves sugerem estar relacionados com a cepa e via de aplicação de vacina utilizadas neste trabalho.

H - Aos quarenta e dois dias de idade a cepa vacinal e via de aplicação que apresentaram a menor mortalidade foi a "forte ocular".

6 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 - ALLAN, G.M.; McNULTY, M.S.; CONNOR, T.J.; McCracken, R.M.; McFERRAN, J.B. Rapid diagnosis of Infectious Bursal Disease infection by immunofluorescence on clinical material. **Avian. Pathol.** **13**: 419-427, 1984.
- 2 - ALLAN, W.H.; FARAGHER, J.T.; CULLEN, G.A. Immunosuppression by the Infectious Bursal Agent in chicken immunized against Newcastle Disease. **Vet. Rec.** **90**: 511-512, 1972.
- 3 - AZAD, A.A.; JAGADISH, M.N.; BROWN, M.A.; HUDSON, P.J. Deletion mapping and expression in *Escherichia coli* of the large genomic segment of a Birnavirus. **Virology.** **161**:145-152, 1987.
- 4 - BENCHT, H. Infectious Bursal Disease Virus. **Curr. Top Microbiol. Immunol.** **90**: 107-121, 1980.
- 5 - BENCHT, H.; MULLER, H.; MULLER, H.K. Comparative studies on structural and antigenic properties of two serotypes of Infectious Bursal Disease Virus. **J. Gen. Virol.** **69**:631-640, 1988.
- 6 - BENTON, W.J.; COVER, M.S.; ROSENBERG, J.K.; LAKE, R.S. Physicochemical properties of the Infectious Bursal Agent. **Avian. Dis.** **11**:438-445, 1967.
- 7 - BOYLE, D.B.; COUPAR, E.H. Identification and cloning of the fowlpox virus thymidine kinase gene using vaccinia virus. **J. Gen. Virol.** **67**: 1591-1600, 1986.
- 8 - COSGROVE, A.S. An apparently new disease of chicken-avian nephrosis. **Avian. Dis.** **6**: 385-398, 1962.
- 9 - CUMMING, R.B. Infectious avian nephrosis (uraemia) in Australia. **Aust. Vet. J.** **39**: 145-147, 1963.
- 10 - CURSIFEN, D. Wirtsspezifität des Virus der Infektiosen Bursitis. **Fortschr. Vet. Med.** **30**:194-196, 1980.
- 11 - DOBOS, P. Peptide map comparison of the protein of Infectious Bursal Disease Virus (IBVD). **J. Virol.** **32**:1046-1050, 1979.
- 12 - EDGAR, S.A.; CHO, Y. Epizootiology of Infectious Bursal Disease Virus. **J. Virol.** **23**:638-640, 1979.

- 13 - FAHEY, K.J., O'DONNELL, I.J.; BAGUST, T.J. Antibody to the 32K structural protein of Infectious Bursal Disease Virus neutralizes viral infectivity in vitro and confers protection on young chickens. **J.Gen.Virol.** **66**:2693-2702, 1985.
- 14 - FAHEY, K.J.; O'DONNELL, J.I.; AZAD, A.A. Characterization by Western Blotting of the immunogenesis of Infectious Bursal Disease Virus. **J. Gen. Virol.** **66**:1479-1488, 1986.
- 15 - GELG, J.; EIDSON, C.D.; KLEVEN, S.H. Interferon production in embryonating chicken eggs following inoculation with Infectious Bursal Disease Virus. **Avian Dis.** **23**:534-538, 1979.
- 16 - GIAMBRONE, J.J. Doença de Gumboro, diagnóstico e controle. In: Encontro empresarial de atualização em patologia avícola, 2. Campinas, 01a 04 set, 1986, Anais Campinas, 1986.
- 17 - HIRAI, K.; SHIMAKURA, S. Immunodiffusion reaction to avian Infectious Bursal Virus. **Avian. Dis.****16**: 961-964, 1972.
- 18 - HIRAI, K.; SHIMAKURA, A.S.; KAWAMOTO, E.; TAGUCHI, F.; KIM, M.S.T.; CHANG, C.N.; IRITANI, Y. The immunodepressive effect of Infectious Bursal Disease Virus in chickens. **Avian. Dis.****18**: 50-57, 1974.
- 19 - HIRAI, K., KAWAMOTO, E.; SHIMAKURA, S. Some properties of precipitating antigens associated with infectious bursal disease viruses. **Infect. Immun.****10**:1235-1240, 1974.
- 20 - HITCHNER, S.B. **Dis.Poultry.** **7**:949-952, 1978.
- 21 - HOWIE, R.T.; THORSEN, J. Identification of the strain of Infectious Bursal Disease Virus. **Can. J. Comp. Med.** **45**: 315-320, 1981.
- 22 - HUDSON, P.J.; MCKERN, N.M.; POWER, B.E.; AZAD, A.A. Genomic structure of the large RNA segment of Infectious Bursal Disease Virus. **Nucleic Acid. Res.** **14**:5001-5012, 1988.
- 23 - KAUFER, I.; WEISS, E. Electron Microscope studies on the pathogenesis of Infectious Bursal Disease after intra bursal application of a causal virus. **Avian. Dis.** **20**:483-495, 1976.
- 24 - KIBENGE, F.S.B.; DHILLON, A.S. Serological studies with Infectious Bursal Disease serotype 1 and variants viruses. Proceedings of the 36th Western Poultry Disease Conference, p. 113-115, 1987.
- 25 - LANDGRAF, H.; VIELITZ, E.; KIRSH, R. Untersuchungen über das auftreten einer infektiösen erkankung mit der Bursa Fabricii (Gumboro Disease). **Dt. Tierärztl. Wschr.** **74**:6-10, 1967.
- 26 - LEY, D.H.H. The pathogenesis of Infectious Bursal Disease: Serologic, histopathologic and chemical observations. **Avian. Dis.** **27** : 3.1061-185, 1983.
- 27 - LUCIO, B.; HITCHNER, S.B.. Immunossupresion and active response induced by Infective Bursal Disease virus in chickens with passive antibodies. **Avian. Dis.****24**(1):189-196, 1980.

- 28 - LUKERT.; HITCHNER, S.B. Infectious Bursal Disease. In: Diseases of Poultry, 8th, p.566-576, 1984.
- 29 - MANFREDINI, R.A.F.; BERNARDINO, O.J.O. Doença de Gumboro: Estudo da sorologia e do potencial imunodepressor da vacinação no primeiro dia de idade. Boletim Técnico Salisbury, 1989.
- 30 - MANFREDINI, R.A.F.; BERNARDINO, O.J.O. Estudo comparativo de duas cepas vacinais empregadas no controle da Doença de Gumboro. Boletim Técnico Salisbury, 1990.
- 31 - MANFREDINI, R.A.; TAKASHI, J. & BERNARDINO, A. Estudo sorológico para a Doença de Gumboro em aves vacinadas no primeiro dia de idade empregando-se diversas vacinas em diversas vias de vacinação. In: Congresso brasileiro de avicultura, 11, Brasília, 15 a 17 de agosto, Anais, 1989.
- 32 - MARQUAT, W.W.; JOHNSON, R.B.; ODENWALD, W.F.; SCHLOTTHOBER, B.A. An indirect enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) for measuring antibodies in chickens infected of whitch Infectious Bursal Disease Virus. **Avian. Dis.**2: 357-385, 1980.
- 33 - McFERRAN, J.B.; McNULTY, M.S.; McKILLOP, E.R.; CONNOR, T.J.; McCracken, R.M.; COLLINS, D.S.; ALLAN, G.M. Isolation and serologic studies with Infectious Bursal Disease Viruses from fowl, **Avian. Pathol.** 9:395-404, 1980.
- 34 - MEULEMANS, G.;HALEN, P. Efficacy of some disinfectants against Infectious Bursal Disease Virus and Reovirus. **Vet. Rec.**111: 412-413, 1984.
- 35 - MÜLLER, H.; BENCHT, H. Biosynthesis of virus specific proteins en cells infected with Infectious Bursal Disease Virus and their significance for infections virus and incomplete particles. **J. Virol.** 44:384-392, 1982.
- 36 - MÜLLER, R.; KAUFER, I.; REINACHER, .; WEISS. E. Immunofluorescence studies of early virus propagation after a oral infection with Infectious Bursal Disease Virus. **Zentbl. Vet. Med.** 26: 345-351, 1979.
- 37 - MULLER, H.; BENCHT,H.. Bisynthesis of virus-specific proteins with Infectious Bursal Disease Virus and significance as structural elements for infectious virus and incomplete particles. **J. Virol.** 14 (2): 384-392, 1982.
- 38 - NAKAI, T.; HIRAI, K. In vitro infection of fractinated chicken linphocytes by Infection Bursal Disease Virus. **Avian. Dis.**, Pennsylvaniav. 25, p. 831-838, 1981.
- 39 - NAKANO, M.; PORTUGAL, M. A. S. C.; SALIBA, A.M.; NOBRE, D.; MARIMATS, M.N. Ocorrência de Doença de Gumboro no Brasil. **Biológico.**, São Paulo, 38: 60-61, 1972.

- 40 - NAQI, S.A.; MARQUEZ, B.; SAHIN, N. Maternal antibody and its effects on Infectious Bursal Disease Immunization. **Avian. Dis.** **27**, (3),: 622-631, 1982.
- 41 - NAQI, S.A.; MILLAR, D.L.; GRUMBLES, L.C. An evaluation of three commercially available Infectious Bursal Disease vaccines. **Avian. Dis.** **24**(1):233-240, 1980.
- 42 - NICHOLAS, R.A.J.; THORNTON, D.H. The use of enzyme linked immunosorbent assay in detecting antibodies to avian viruses: a review. **Vet. Bull.** **56**(5):337-343, 1986.
- 43 - OKOYE, J.O.A. Infectious Bursal Disease of Chicken. **Vet. Bull.** **54**:425-436, 1984.
- 44 - OKOYE, J.O.A.; UZOUKWU, M. Pathogenesis of Infectious Bursal Disease in embryonally bursectomized chickens. **Avian. Pathol.** **19**:555-569, 1990.
- 45 - PETEK, M.; D'APRILLE, P.N.; LANCELLOTTI, F. Biological and physicochemical properties of the Infectious Bursal Disease Virus (IBDV). **Avian. Pathol.** **2**:135-152, 1973.
- 46 - ROMERO, C.H. Erros e acertos na implantação do sistema ELISA: Resultados práticos. In: Conferência apinco de ciência e tecnologia avícola. Campinas, 14 a 16 jun, 1989. Anais... Campinas, 1989, p. 69-73.
- 47 - ROSENBERG, J.K.; CLAUD, S.S.; MELTZ, A. Use of Infectious Bursal Disease Virus variants vaccines in broilers and broilers breeders. Proceedings of the 36th western poultry disease conference, p. 105-109, 1987.
- 48 - ROSENBERG, J.K. Virus da Doença Infecciosa Bursal e agente da Anemia das Galinhas: seus efeitos na capacidade imunológica das aves. In: Conferência Apinco de Ciência e Tecnologia Avícola. Campinas, 14 à 16 Jun, 1989. Anais... Campinas, p.21-26, 1989.
- 49 - SCHAT, K.A.; LUCIO, B.; CARLISE, J.C. Pathogenesis of Infectious Bursal Disease in embryonally bursectomized chickens. **Avian. Dis.** **25**:303-311, 1981.
- 50 - SILVA, E.N.; BRANDEN, R.C.; LAMAS DA SILVA, S.M.; YOSHIDA, L.T.; SCARPELINI, J.A.. Avaliação de frangos de corte com "Gumboro forte" associada a vacina de Marek, aplicadas em pintos de 1 dia de idade. In: Conferência apinco de ciência e tecnologia avícola. Campinas, 14 a 16 de junho, Anais... Campinas, p.80-81, 1989.
- 51 - SIVANADAN, V.; SASIPREEYASAN, S.; HALVORSOON, D.A.; NEWMAN, J.A. Histopathologic changes induced by serotipe 2 Infectious Bursal Disease Virus in specific-pathogen free chickens. **Avian. Dis.** **23**:95-106, 1979.

- 52 - SNYNDER, D.B.; MARQUARDT, W.W.; WALLISO, E.T.; SAVAGE, P.K. An enzyme linked immunosorbent assay. III simultaneous measurements of antibodies titers to Infectious Bronchitis, Infectious Bursal Disease, New Castle Viruses in a single serum dilution. **Avian. Dis.**28:12-24, 1984.
- 53 - SOLANO, W.; GIAMBRONE, J.; PANANGALA, V.S. Comparison of kinetic-based enzyme linked immunosorbent assay (KELISA) and virus neutralization test for Infectious Bursal Disease Virus. I. quantitation of antibody in white leghorn chickens. **Avian. Dis.**29 (3):662-671, 1985.
- 54 - STEGER, D.; MULLER, H.; RIESNER, D. Helix-coil transitions in double stranded viral RNA: fine resolution melting and ionic strength dependence biochim. **Biophys. Acta.** 606: 247-280, 1980.
- 55 - THORNTON, D.H.; PATTISON, M. Comparison of vaccine against Infectious Bursal Disease. **J.Comp.Pathol.**85:597-610, 1975.
- 56 - TIZZARD, I. **Imunologia Veterinária**. 2.a ed., São Paulo, Livraria Roca, 1985. 329 p.
- 57 - TOMOIA, A. A. Doença de Gumboro no Brasil. in: tese de mestrado apresentada na Universidade Federal do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro, 1979.
- 58 - VALDÉS, L.L.E.; LUCIO, M.B.; ANTILLON, R.A. Estudio clinico patogenico y por inmunofluorescencia. **Veterinária. Mex.**2 (3):. 5-10, 1979.
- 59 - WINTERFIELD, D.W.; HITCHNER, S. B. Etiology of infectious nephritis nephrosis syndrome of chickens. **Am. J. Vet. Res.**23:1273-1279, 1962.
- 60 - WINTERFIELD, R.W.; DHILLON, A.S.; THACKER, H.L.; ALBY, L.J. Immune response of white legorn chickens from vaccination with different strains of Infectious Bursal Disease. **Avian. Dis.**16:622-632, 1980.
- 61 - CHO, Y. **A study of Infectious Bursal Disease and its control by immunization**. Alabama, Auburn university, 1967.