

AVALIAÇÃO DO ESTADO DE PROTEÇÃO EM AVES IMUNIZADAS COM UMA  
VACINA INATIVADA EXPERIMENTAL CONTRA ESTIRPE VARIANTE BRASILEIRA  
DO VÍRUS DA BRONQUITE INFECCIOSA AVIÁRIA

EVALUATION OF THE PROTECTION STATUS IN CHICKENS IMMUNIZED WITH AN  
INACTIVE VACCINE AGAINST A BRAZILIAN VARIANT STRAIN OF THE AVIAN  
INFECTIOUS BRONCHITE VIRUS

Romeu Moreira dos Santos<sup>1\*</sup>, Denise Granato Chung<sup>2</sup>, Ketherson Rodrigues Silva<sup>1</sup>, Priscila  
Diniz Lopes<sup>1</sup>, Filipe Santos Fernando<sup>1</sup>, Mariana Monezi Borzi<sup>1</sup>, Maria de Fátima da Silva  
Montassier<sup>1</sup>, Helio José Montassier<sup>3</sup>

*1 Pós-graduandos do programa de Medicina Veterinária, Universidade Estadual Paulista  
“Júlio de Mesquita Filho” UNESP, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal  
- São Paulo, Brasil. \*Autor principal: [romeumdsantos@hotmail.com](mailto:romeumdsantos@hotmail.com)*

*2 Pós-graduanda do Programa de Cirurgia Veterinária da Universidade Estadual Paulista  
“Júlio de Mesquita Filho” UNESP, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal  
- São Paulo, Brasil.*

*3 Docente do Departamento de Patologia Veterinária, Universidade Estadual Paulista “Júlio de  
Mesquita Filho” UNESP, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal – São  
Paulo, Brasil.*

---

**Resumo**

Há atualmente no Brasil, uma predominância de infecções causadas por estirpes do VBI classificadas no genótipo variante (BR-I), que revelam diferenças marcantes de antigenicidade com relação à estirpe vacinal Massachusetts, rotineiramente usada em nosso país. Isso resulta em uma baixa imunidade-cruzada e consequentemente em um menor nível de proteção contra isolados de campo do genótipo BR-I. Dessa forma, os objetivos principais do presente estudo foram formular uma vacina experimental inativada com, uma estirpe IBVPR-05 variante do genótipo BR-1 do VBI acrescida de um novo adjuvante oleoso; testá-la após a

administração, com 1 dia de idade, da vacina comercial atenuada com estirpe Massachusetts, avaliando-se o estado de proteção ao desafio com essa estirpe variante do VBI através da avaliação histopatológica e quantificação absoluta da carga viral presente na traqueia e rins de aves vacinadas e desafiadas com a variante. Os resultados deste estudo demonstraram que esse esquema imunoprolático (vacinação das aves com 1 dia de idade com vacina atenuada comercial e revacinação com 14 dias de idade com vacina inativada experimental homóloga) induziu a diminuição de lesões histológicas e uma menor carga viral na traqueia e rins nas aves vacinadas e desafiadas. Concluiu-se que o reforço vacinal contra a estirpe variante brasileira do VBI combinada com uma prévia vacinação com vacina atenuada (estirpe Massachusetts), induziu um efetivo estado de proteção contra a infecção por estirpe variante homóloga do VBI, tendo o potencial de proporcionar proteção contra outras estirpes do genótipo variante BR-I do VBI.

Palavras-chaves: ornitopatologia, patotipo, protectotipo, vacina experimental homóloga.

---

### **Abstract**

There is currently a predominance of infections caused by VBI strains classified as non-genotype variant (BR-I), which show marked antigenicity in relation to the Massachusetts vaccine strain routinely used in our country. This results in low cross-immunity and consequently in a level of protection against field isolates of the BR-I genotype. Thus, the main objectives of the present study were to formulate an experimental inactivated vaccine with an IBVPR-05 variant of the IBV BR-1 genotype plus a new oiling adjuvant; to test it after the 1-day-old administration of attenuated commercial vaccine with Massachusetts strain, assessing the state of challenge protection with this IBV variant strain through the histopathological evaluation and absolute quantification of viral load present in the trachea and Kidneys of vaccinated and challenged birds with a variant. The results of this study demonstrated this immunoprophylactic scheme (vaccination of birds at 1 day of age with commercial attenuated

vaccine and 14 day old revaccination with homologous experimental inactivated vaccine) induced the decrease of histological lesions and a lower viral load in the trachea and kidneys in the vaccinated and challenged birds. It was concluded that it is the vaccine reinforcement against the Brazilian variant IBV strain combined with a previous vaccination with attenuated vaccine (Massachusetts strain), induced an effective protection status against an IBV homologous variant strain strain, with the potential for protection of other strains of the IBV BR-I variant genotype.

Keywords: ornitopathology, pathotype, protectotipo, experimental homologous vaccine

## INTRODUÇÃO

A bronquite infecciosa das galinhas (BIG) é uma doença infecciosa causada pelo coronavírus aviário (vírus da bronquite infecciosa – VBI) que está amplamente disseminada entre as criações avícolas comerciais na maior parte do mundo. Há atualmente no Brasil, uma predominância de infecções causadas por estirpes do VBI classificadas no genótipo variante (BR-I), que revelam diferenças marcantes de antigenicidade com relação à estirpe vacinal Massachusetts, rotineiramente usada em nosso país. Isso resulta em uma baixa imunidade-cruzada e conseqüentemente em um menor nível de proteção contra isolados de campo do genótipo BR-I (COOK et al., 2012; MONTASSIER, 2010).

Em se tratando de Brasil, o controle da BIG é baseado principalmente no uso de vacina viva atenuada, sendo somente permitido a utilização de estirpes do sorotipo Mass na composição destas vacinas. Vacinas de formuladas com sorotipo do VBI heterólogo ao que está causando infecção a campo, muitas vezes podem não conferir imunidade adequada para outros órgãos em adição ao trato respiratório. Ainda neste contexto, sabe-se que os mecanismos essenciais de proteção contra a infecção do trato respiratório pelo VBI em galinhas têm sido definidos como a capacidade do sistema imune conferir resistência à traqueia contra a infecção por este vírus, reduzindo a replicação viral e impedindo principalmente que ocorram lesões mais severas na traqueia e a completa ciliostase no epitélio desse mesmo órgão, bem como impedindo a disseminação do VBI a partir da porta entrada para outros órgãos e tecidos do organismo

hospedeiro. No entanto, com o repentino crescimento da indústria avícola no Brasil, a partir da década de 1990, diversas estirpes do VBI vieram a se adaptar trazendo grandes problemas sanitários. Estas estirpes muitas vezes se manifestam de maneira diferente das comumente associadas com a BIG em nosso país (DE WIT et al., 2011; FERNANDO et al., 2013).

No Brasil, pouco se tem investigado sobre as respostas imunes e a patogenicidade induzidas por estirpes variantes isoladas de campo do VBI, bem como o estado de proteção induzido pelas vacinas comerciais contra essas mesmas estirpes (MONTASSIER, 2010). Dessa forma, o propósito deste trabalho, foi avaliar o estado de proteção das aves induzido pela vacina inativada formulada com uma estirpe variante do VBI pertencente ao genótipo BR-I (IBVPR-05) administrada após a vacina atenuada comercial formulada com a estirpe Massachusetts, por meio dos estudos das alterações histopatológicas na traqueia e nos rins, e da carga viral presente nesses órgãos.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### **Vírus**

Foi utilizada uma estirpe variante de campo do VBI (IBVPR-05), isolada e caracterizada geneticamente por Montassier (2010), para a produção da vacina experimental inativada com adjuvante a base de água em óleo. A mesma estirpe variante foi utilizada para a realização da infecção experimental (desafio) nas aves.

### **Preparação da vacina experimental**

Para formulação da vacina foi utilizado como reagente para inativação viral a beta-propiolactona (BPL). Os vírus foram preparados, utilizando-se o LCA infectado na passagem em ovos embrionados de galinha e concentrado com PEG-NaCl, contendo  $10^8$  DIE<sub>50</sub>/ml da estirpe IBVPR05. BPL foi adicionada à suspensão de vírus para dar uma concentração de 1:2000, e a mistura foi incubada por 90 minutos a 37°C, sob agitação contínua, seguindo a metodologia utilizada por McDougall (1969).

Para o controle de vírus infeccioso residual, a IBVPR-05 inativada foi inoculado em ovos embrionados SPF com 9 dias de idade, sendo a presença e/ou ausência de lesões patológicas monitorada por 96 horas.

Após comprovada inativação viral, foi incorporada à mistura o adjuvante a base de água em óleo (MONTANIDE ISA 71 VG, SEPPIC) na proporção 70% do adjuvante mais 30% do vírus inativado, conforme as recomendações do fabricante Seppic.

### **Delineamento experimental**

Foram utilizadas 26 aves SPF da linhagem de postura “White Leghorn”, distribuídas em três grupos: grupo A com 10 animais (aves vacinadas com 1 dia de idade com vacina atenuada comercial e revacinadas com 14 dias de idade com vacina inativada experimental homóloga); grupo B com 10 (aves não vacinadas); grupo C (controle). Todas as aves foram alojadas separadamente em grupos em isoladores, com água e comida à vontade durante todo o experimento. Aos 35 dias de idade as aves do primeiro (Grupo A) e segundo grupos (Grupo B) foram desafiadas via óculo-nasal com a estirpe variante de campo do VBI (IBVPR-05) ( $10^4$  DIE<sub>50</sub>). O terceiro grupo (Grupo C) foi mantido como controle negativo da infecção, já que não foi submetido à vacinação nem ao desafio.

Três aves de cada tratamento experimental (Grupo A e B) foram eutanasiadas aos 3, 7 e 11 dias pós-infecção (d.p.i.); já no grupo controle (grupo C) apenas 2 aves foram eutanasiadas em cada intervalo, para colheita de material, sendo colhidas amostras de traqueia e rins. Parte das amostras de traquéia e rins foram destinadas à histopatologia seguindo seus procedimentos padrões de fixação, desidratação, diafanização e coloração com hematoxilina-eosina (HE); e o restante das amostras teciduais foram submetidas ao congelamento rápido em nitrogênio líquido e armazenadas a  $-70^{\circ}\text{C}$  até o momento de serem processadas pela técnica de extração de RNA para avaliação da quantificação da carga viral, seguindo os procedimentos descritos por OKINO et al. (2013).

### **Extração de RNA total**

A extração do RNA total dos órgãos em avaliação foi realizada com o kit comercial Trizol Reagent (Invitrogen, Life Technologies), seguindo as recomendações do fabricante.

### **Transcrição reversa (RT) e reação em cadeia da polimerase quantitativa (qPCR)**

A reação de transcrição reversa foi efetuada em um Termociclador PTC – 200 Peltier Thermal Cycler (MJ Research). O protocolo começou incubando-se a 65°C durante cinco minutos: 50ng do RNA genômico extraído, dNTP 0,5mM (Invitrogen, Life Technologies), 0,5µg de Randon Primer (Invitrogen, Life Technologies) e 3µL de água DEPC. Em seguida, acrescentou-se o tampão da RT 5 x (Invitrogen), 40U de inibidor de ribonucleases (Invitrogen, Life Technologies) e incubou-se a 42°C durante dois minutos. Por fim, 50U da enzima SuperScript (Invitrogen) foi adicionada a mistura, incubando-se a 42°C durante 50 minutos, e a 70°C por 15 minutos. O volume final da reação foi de 20µL. O DNA complementar (cDNA) obtido pela transcrição reversa foi armazenado a –20°C para uso posterior na técnica de PCR em tempo real.

Após a extração do RNA total e a síntese do cDNA, foi realizado o método de PCR em tempo real seguindo os procedimentos descritos por Okino et al. (2013).

Para a quantificação da replicação viral os ciclos da reação foram constituídos por um primeiro ciclo de 95°C por três minutos, seguindo-se de mais 40 ciclos compostos por desnaturação a 95°C por três segundos, anelamento a 45°C por 30 segundos e extensão a 72°C por três segundos. Ao final dessa etapa de 40 ciclos, foi realizada a dissociação dos produtos amplificados de DNA, entre a temperatura de 65°C e 95°C, para a avaliação da Temperatura de melting (T<sub>m</sub>), e as leituras efetuadas a cada 0,2°C. Todas as amostras foram testadas, no mínimo, em duplicata.

A curva padrão foi construída para quantificação relativa do cDNA. Um fragmento de cerca de 1,6Kb do gene S1 da estirpe M41 do VBI foi clonado no vetor pGEM T Easy (Promega). O DNA plasmidial foi extraído, quantificado através da leitura em biofotômetro (Eppendorf) e submetido a diluições seriadas de razão constante igual a 10 (10<sup>-1</sup> a 10<sup>-10</sup>), e em seguida à técnica de RT-PCR em tempo-real com a utilização de “primers” para amplificação de sequência parcial do gene S1 do VBI.

O valor obtido da quantificação do DNA plasmidial extraído foi convertido em número de moles utilizando-se o programa computacional Molbio.ru ([www.molgen.mpg.de/~soldatov/protocols/scripts/01\\_07.html](http://www.molgen.mpg.de/~soldatov/protocols/scripts/01_07.html)).

Os valores de “threshold cycle” (CT) obtidos a partir da RT-PCR em tempo real foram subsequentemente usados para calcular e traçar uma linha de regressão linear através do logaritmo do número de moles do “template” (eixo Y) contra o valor correspondente de CT (eixo X).

## **RESULTADOS**

### **Histopatologia: traqueia**

Alterações histopatológicas significativas na traqueia foram observadas a partir do terceiro dpi. Dentre os parâmetros avaliados, pode-se observar apenas hiperemia multifocal na forma discreta em uma ave do grupo B (não vacinado) e na forma moderada em uma ave do grupo A (vacinado). Também foi observado hipertrofia de células caliciformes em uma ave do grupo A.

No sétimo dpi, no qual as aves se encontravam em fase aguda da doença, as lesões foram melhores evidenciadas, especificamente no grupo não vacinado (B), de forma que foram observados infiltrado inflamatório (misto) e hiperemia em todas as aves desse grupo (Figura 1). Alterações como descamação ciliar (epitélio aciliar) e hipertrofia da mucosa, foram evidenciadas em duas aves na forma focal e acentuada e hemorragia multi-focal moderada foi observada apenas em uma ave. Nas aves do grupo vacinado foi observado apenas hipertrofia de células caliciformes e leve infiltrado inflamatório (misto) em uma única ave.

Aos décimo primeiro dpi, as lesões traqueais regrediram nas aves do grupo não vacinado, sugerindo que estava ocorrendo uma regeneração do epitélio ciliado. Foi observada também nesse mesmo intervalo pós-desafio, apenas hiperemia moderada variando de discreta a multi-focal em todas as aves deste grupo, e ainda discreta inflamação multi-focal em uma ave. No grupo vacinado, todas as aves apresentaram hipertrofia de células caliciformes na forma acentuada. As aves do grupo C (controle) não apresentaram lesões microscópicas quer seja na traqueia, quer seja nos rins.

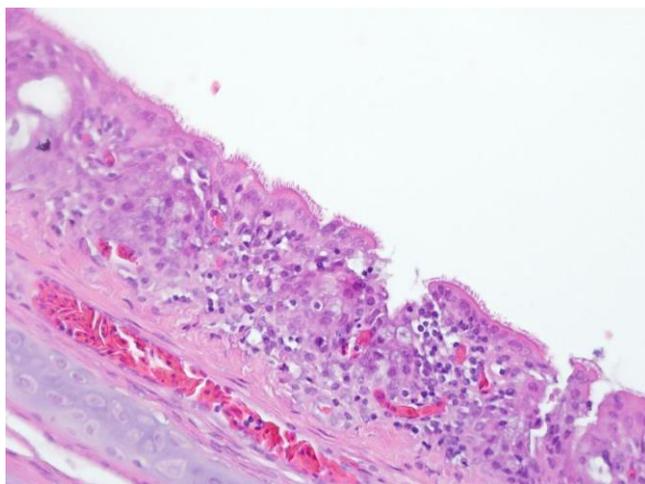


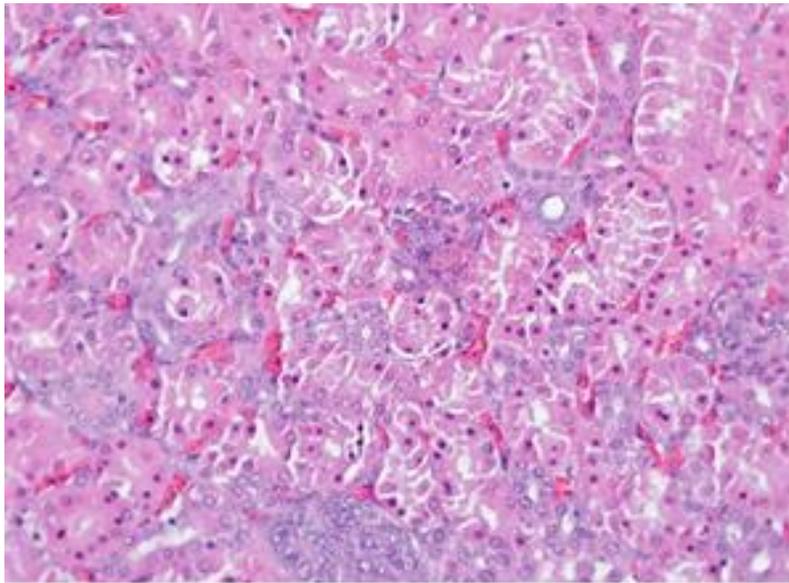
Figura 1. Fotomicrografia do tecido traqueal de ave do grupo B (não vacinado e desafiado com estirpe variante IBVPR-05) aos 7 dpi. Nota-se moderado infiltrado inflamatório por heterófilos, perda de epitélio ciliar, hiperemia discreta e pequenos focos hemorrágicos na mucosa. HE, obj. 400x.

### **Histopatologia: rim**

As aves do grupo não vacinado (B) desenvolveram lesões renais já no terceiro dpi. As lesões mais características foram relacionadas à hiperemia visualizada em três aves. Infiltrado inflamatório por heterófilos foi visualizado em duas das aves desse grupo, indicando quadro de nefrite aguda. Ademais, necrose tubular (picnose) multi-focal foi visualizada em apenas uma ave (Figura 2) e, em uma outra ave foram observadas algumas células tubulares com citoplasma edemaciado com coloração pálida indicando quadro de degeneração dos túbulos renais. No grupo vacinado (A), apenas uma ave apresentou hiperemia focal discreta no rim.

No sétimo dpi, apenas as aves pertencentes ao grupo não vacinado (B) apresentaram lesões patológicas significativas. Tais lesões foram caracterizadas por infiltrado inflamatório mulfi-focal, que foi observado em duas aves desse grupo. Foi também observada acentuada necrose tubular mulfi-focal em uma outra ave desse mesmo grupo. Alterações vasculares como hiperemia foi detectada em todas as aves não vacinadas. Por outro lado, não foram encontradas alterações patológicas nas aves do grupo vacinado (A).

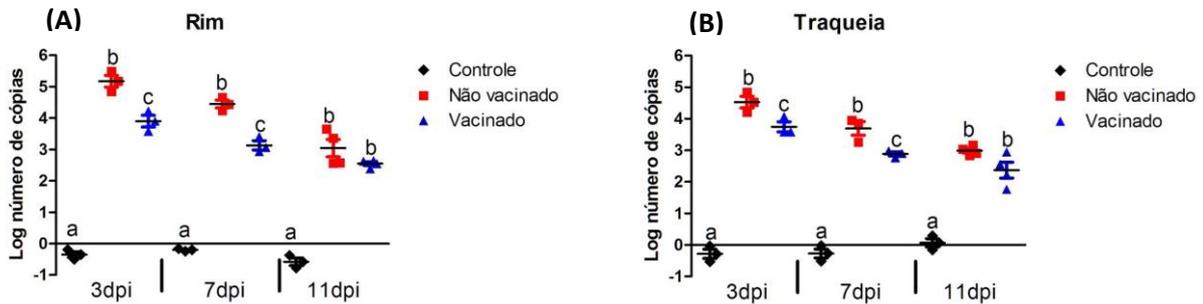
A partir do décimo primeiro dpi, o tecido renal apresentava-se isento de necrose e com pontos de regeneração epitelial. Apenas nas aves do grupo B foram visualizadas lesões patológicas, sendo as únicas observadas hiperemia e infiltrado inflamatório. Nas aves pertencentes ao grupo A e C não foram evidenciadas alterações patológicas dignas de nota.



**Figura 2.** Fotomicrografia do tecido renal de ave pertencente ao grupo B (não vacinado e desafiado com estirpe variante IBVPR-05) aos 3 dpi. Nota-se acentuada hiperemia vascular, células tubulares com núcleo em picnose (seta preta) demonstrando um quadro típico de necrose tubular. Destaca-se no canto inferior direito tecido renal sem alteração patológica pertencente a uma ave do grupo C (controle). HE, obj. 400x.

### **Quantificação absoluta da replicação viral em diferentes órgãos**

Com respeito à avaliação da replicação viral em diferentes órgãos e correspondentes a cada um dos intervalos após a infecção, ou mais especificamente a carga viral contida nos órgãos analisados, constata-se que a maior carga viral apresentada foi nos rins das aves do grupo B (não vacinado) com a estirpe IBVPR-05, no terceiro dpi. Apenas no décimo primeiro dpi, as medianas não diferiram significativamente do grupo vacinado (A), apesar de observados maiores valores de carga viral no grupo não vacinado (B). Ainda neste contexto, pode-se observar que no terceiro dpi desse mesmo grupo (B), as amostras de traqueia dessas aves também demonstraram maior quantidade de vírus em relação às amostras obtidas de qualquer dos outros grupos analisados (Figura 3).



**Figura 3.** Número de cópias do gene S1 do VBI (Log<sub>10</sub>) detectados nos rins (A) e traqueia (B) das aves dos grupos A (vacinado e desafiado com estirpe variante IBVPR-05), B (não vacinado e desafiado com estirpe variante IBVPR-05) e C (controle). Estão indicadas na figura as diferenças significativas (a,b,c) pelo teste de Mann-Whitney entre os grupos vacinados e não vacinados para cada intervalo avaliado;  $p < 0.05$ , médias seguidas de letras minúsculas diferentes nas colunas diferem estatisticamente entre si.

## DISCUSSÃO

No presente estudo, todas as aves vacinadas, por via óculo-nasal, no 1º dia de idade com vacina atenuada contendo a estirpe Mass e aos 14 dias de idade, por via intramuscular, com a vacina inativada com adjuvante oleoso contendo a estirpe IBVPR-05, foram resistentes ao desafio homólogo com a mesma estirpe virulenta, com base na ausência de lesões microscópicas na traqueia e rins e na menor carga viral, presente nestes mesmos órgãos.

As lesões microscópicas observadas nos rins das aves do grupo de aves não vacinadas e desafiadas, provocadas pelo desafio com a estirpe IBVPR-05 foram semelhantes aos descritos em estudos anteriores para esta e outras estirpes nefropatogênicas do VBI (DE WIT et al., 2015; FERNANDO et al, 2013). Ainda neste mesmo grupo, as aves apresentaram, aos 3 dpi, lesões renais abundantes com difusa a moderada infiltração linfo-histiocítica entre os túbulos renais, e ao lado dos túbulos distais e ductos coletores. Nesse sentido, verifica-se que alterações histopatológicas renais semelhantes a estas foram encontradas por Ladman et al. (2002) ao investigarem a patogenia produzida por estirpe nefropatogênica do VBI.

Ademais, deve-se ressaltar que a imunidade induzida pela combinação da administração da vacina atenuada Mass, ao 1º dia de idade, com a vacina inativada com adjuvante oleoso preparada com a estirpe IBVPR05, ao 14º dia idade, foi eficiente em conferir proteção às aves desafiadas com essa mesma estirpe virulenta, enquanto que estudos anteriores demonstraram que aves vacinadas apenas com vacina atenuada comercial (estirpe H120) e desafiadas com a estirpe heteróloga IBVPR-05 (nefropatogênica) não revelaram proteção, especialmente nos tecidos renais. O fato é que essas aves previamente imunizadas com a estirpe H120 e depois desafiadas apresentaram alterações histopatológicas significativas nos rins (BANDE et al., 2015; FERNANDO et al., 2013).

Isso demonstra que a imunização com vacina comercial formulada com a estirpe atenuada H120 (Massachusetts) não é capaz de induzir proteção cruzada contra a estirpe variante brasileira IBVPR-05 e possivelmente contra outras variantes pertencentes a esse mesmo genótipo / sorotipo. Na verdade a estirpe IBVPR-05 previamente classificada em outro genótipo do VBI isto é, o genótipo BR-I deve pertencer a um um sorotipo diferente, tal como foi demonstrada em análises de atividade vírus-neutralizante de outras estirpes classificadas como genótipo BR-I (CHACÓN et al., 2011). Assim, e como acontece com muitos outros diferentes sorotipos do VBI, pouca ou nenhuma proteção cruzada é induzida após a vacinação com determinadas estirpes de referência que são heterólogas a novos sorotipos variantes existentes circulando no campo.

Ao comparar às alterações histopatológicas na traqueia do grupo A (aves vacinadas e desafiadas) e B (aves não vacinadas e desafiadas) foi observada diferença marcante no status da proteção. Assim, os danos causados pela estirpe variante brasileiras IBVPR-05 foram maiores para as aves do grupo não vacinado, que mostraram infiltração moderada de células inflamatórias e degeneração/necrose epitelial. Alterações semelhantes foram encontradas por Okino et al. (2013) em aves não vacinadas e desafiadas com estirpe M41, embora a presença de lesões significativas na traqueia tenha sido maior nos resultados discutidos nesse último estudo, quando comparados com nossa pesquisa. Em contrapartida, Fernando et al (2013) observaram menores escores de lesões histopatológicas na traqueia, tanto em aves vacinadas com estirpe comercial (M41) quanto em aves não vacinadas frente ao desafio com estirpe variante brasileira

IBVPR-05. Isto provavelmente se deve ao fato de a estirpe IBVPR-05 ter maior tropismo pelo tecido renal do que pelas células do trato respiratório.

Os resultados de RT-qPCR mostraram que as cargas virais foram mais elevadas no rim do que na traqueia, para ambos os grupos experimentais de aves; vacinadas e não vacinadas. Tal achado reforça o caráter nefropatogênico desse isolado. Os resultados de RT-qPCR também mostraram que houve diferença significativa no número médio de cópias do gene S1 que foi detectado nas amostras traqueais do grupo não vacinado nas quais foram detectados valores superiores àqueles encontrados nas amostras traqueais das aves do grupo vacinado ( $P < 0,05$ ). Da mesma forma, a carga viral média detectada nos rins a partir de aves do grupo não vacinado foi superior, e mostrou uma diferença significativa em comparação com a observada no grupo vacinado ( $P < 0,05$ ). Estes resultados foram semelhantes aos encontrados por Fernando et al. (2013) tanto em aves apenas vacinadas com estirpe comercial heteróloga H120, quando em aves não vacinadas após desafio com a estirpe IBVPR-05.

Ladman et al. (2002) demonstrou que aves vacinadas com vacina atenuada heteróloga, mesmo quando após terem recebido doses vacinais de reforço, apresentaram maiores índices de re-isolamento viral presente no tecido renal, ao serem comparadas com aves vacinadas com vacina viva heteróloga mais vacina inativada homóloga frente ao desafio por uma estirpe nefropatogênica.

A maior carga viral presente nos rins pode estar relacionada com o desenvolvimento de lesões renais. Nesse contexto, sabe-se que a glicoproteína S1 do VBI é em grande parte responsável pelo tropismo de tecidos de uma estirpe do VBI. Dessa forma, as alterações nos genes da glicoproteína S1 da estirpe variante IBVPR-05, resultam em alterações significativas dessa mesma proteína e proporcionou uma acentuada predileção para a infecção de células epiteliais que não pertencem ao trato respiratório, possivelmente através de um mecanismo de fuga no hospedeiro, o que, no caso desta variante, aumentou o tropismo para as células epiteliais do rim, e isto levou ao desenvolvimento de nefrite nos animais não vacinados.

A possibilidade de utilizar uma vacina viva formulada com estirpe homóloga a uma das variantes do genótipo / sorotipo BR-I, tal como a estirpe IBVPR-05, para controlar a BIG em plantéis comerciais de aves não é possível atualmente, pois um vírus atenuado e estavelmente seguro não está disponível. Portanto, o uso de vacinas inativadas contra o VBI em galinhas

torna-se uma opção para a imunoprofilaxia de estirpes nefropatogênicas (IBVPR-05), oferecendo imunidade sistêmica para prevenir ou reduzir a doença renal. A propósito, outros estudos também demonstraram proteção renal conferida pela imunização com vacina inativada homóloga contra o VBI, bem como a melhoria da produção de ovos com casca de maior qualidade. Além disso, com base em resultados de re-isolamento do vírus após o desafio, as galinhas que receberam vacina inativada com estirpe homóloga revelaram uma maior proteção ao desafio com a mesma estirpe do VBI do que aves que receberam a vacina inativada contendo estirpes heterólogas (LADMAN et al., 2002). Neste contexto, exalta-se a importância de selecionar uma estirpe com um elevado grau de semelhança com o antígeno do vírus desafio para inclusão na vacina inativada, aumentando assim, o potencial de proteção imune da vacina.

## CONCLUSÕES

A combinação da vacina atenuada comercial contendo a estirpe Massachusetts (H120) com a vacina inativada contendo a variante brasileira do VBI (IBVPR-05) induziu efetivo estado de proteção das aves vacinadas e desafiadas com essa estirpe variante do VBI, ficando caracterizada assim, a importância e a eficácia do esquema vacinal aqui adotado.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BANDE, F.; ARSHAD, S. S.; BEJO, M. H., MOEINI, H.; OMAR, A. R. Progress and challenges toward the development of vaccines against avian infectious bronchitis. *J. Immunologic Research*. 2015.

CHACON, J. L.; ASSAYAG, M. S; REVOLLEDO, L.; IVO, M.; PEDROSO, A. C.; VEJARANO, M. P.; FERREIRA, A. J. P. Pathogenic patterns in chicken challenged with variant strains of infectious bronchitis virus isolated from chickens flocks with different clinical

manifestations. In: International Symposium on Avian Coronavirus, 5. 1, 2009, Rauschholzhausen, Germany. **Proceedings International Symposium on Avian Coronavirus**. p. 411-415, 2011.

COOK, J. K.; JACKWOOD, M.; JONES, R. C. The long view: 40 years of infectious bronchitis research. **Avian Pathology**. 41:3, p. 239-250, 2012.

DE WIT, J. J.; COOK, J. K. A.; HEIJDEN, H. M. J. F. Infectious bronchitis virus variants: a review of the history current situation and control measures. **Avian Pathology**. v.40 (3), p. 223-235, 2011.

DE WIT, J.; BRANDÃO, P. E.; TORRES, C. A.; KOOPMAN, R. A.; VILLARREAL, L. Y. Increased level of protection of respiratory tract and kidney by combining different infectious bronchitis virus vaccines against challenge with nephropathogenic Brazilian genotype subcluster 4 Strains. *Avian Pathol.* 44: 352-357. 2015.

FERNANDO, F. S.; MONTASSIER, M. F. S.; SILVA, K. R.; OKINO, C. H.; OLIVEIRA, E. S.; FERNANDES, C. C.; BANDARRA, M. B.; GONÇALVES, M. C. M.; BORZI, M. M.; SANTOS, R. M.; VASCONCELOS, R. O.; ALESSI, A. C.; MONTASSIER, H. J. Nephritis Associated with a S1 Variant Brazilian Isolate of Infectious Bronchitis Virus and Vaccine Protection Test in Experimentally Infected Chickens. **International Journal Of Poultry Science**, Asia, v. 11, n. 12, p.639-646, 2013.

LADMAN, B. S.; POPE, C. R.; ZIEGLER, A. S.; SWIECZKOWSKI, T.; CALLAHAN, J. M.; DAVISON, S.; GELB, J. JR. Protection of Chickens after Live and Inactivated Virus Vaccination against Challenge with Nephropathogenic Infectious Bronchitis Virus PA/Wolgemuth/98. **Avian Diseases**, Usa, v. 46, n. 4, p.938-944, out. 2002.

MCDUGALL, J. S. Avian infectious bronchitis: the protection afforded by an inactivated virus vaccine. **Veterinary Record**. 85:378-381. 1969.

MONTASSIER, H. J. Molecular Epidemiology and Evolution of Avian Infectious Bronchitis Virus. **Brazilian Journal of Poultry Science**. 12(2), p.87-96, 2010.

OKINO, C.H.; ALESSI, A.C.; MONTASSIER, M.F.S.; ROSA, A.J.M.; WANG, X.; MONTASSIER, H.J. Humoral and Cell-Mediated Immune Responses to Different Doses of Attenuated Vaccine Against Avian Infectious Bronchitis Virus. **Viral Immunology**, v. 26, n. 2, p. 1-9, 2013.