

Níveis de anticorpos contra a doença de Newcastle mediante a imunização com vacinas associadas com os vírus da bronquite infecciosa e da infecção da bursa de Fabrícus

Levels of antibodies against Newcastle disease by immunization with associated vaccines with infectious bronchitis virus and infectious bursal disease

José Luiz Castro Aguiar Filho,* Walber Feijó de Oliveira,* Rosa Patrícia Ramos Salles,** William Cardoso Maciel,***
Josué Moura Romão,**** Régis Siqueira de Castro Teixeira,***** Olivaldo Facó*****

Resumo

Um artifício atualmente bastante difundido para a imunização de aves em apenas uma única administração, seria a utilização de vacinas associadas; mas, segundo alguns pesquisadores, frangos de corte vacinados com vacinas associadas contendo vírus vivos atenuados da doença de Newcastle (DNC) e da bronquite infecciosa das galinhas (BIG), podem sofrer um fenômeno denominado interferência viral, incapacitando o sistema imunológico de estimular a produção de anticorpos (AC) protetores, produzindo uma competição por epítomos, ou dirigindo a resposta imune em outros sentidos. Estes animais foram divididos em nove tratamentos e imunizados com vacinas contendo as cepas HB₁ (HB₁ e Clone 30) do vírus da DNC e da cepa Massachusetts (H₁₂₀ e Ma5) para o vírus da BIG, em diversas combinações, administradas pela via ocular. Um tratamento (T11) deixado sem imunização foi utilizado como controle. Os tratamentos T2, T4 e T10 sofreram imunização apenas contra a DNC em separado ou associada no momento da vacinação ou em laboratório à BIG, sendo que nos tratamentos T5, T6, T7, T8 e T9 foi incluída a vacinação contra a infecção da bursa de Fabrícus (IBF). Os resultados mostram haver uma redução na produção de AC contra a DNC quando esta foi associada à BIG (tratamento 4), ambas diluídas no mesmo frasco no momento da vacinação. Porém observou-se menor interferência, a partir da utilização de uma vacina já associada em laboratório (tratamento 10). Quanto à presença do vírus da IBF presente nos grupos G5 a G8, este parece favorecer o sistema imune através de um estímulo precoce deste, reduzindo a diferença na quantidade de AC quando estas são posteriormente associadas.

Palavras-chave: doença de Newcastle, interferência viral, imunização, bronquite infecciosa, gumboro.

Abstract

An artifice enough diffused actually to immunization of chickens just in a single administration, are the use of associated vaccines, but according to some researchers, broilers vaccinated with associated vaccines included attenuated live virus of the Newcastle disease (NDV) and infectious bronchitis virus (IBV), can to suffer a phenomena denominated viral interference, turning on inapt the immunological system to stimulate the protective antibodies (Ab) production, resulting in a competition for receptors, or ruling the immune response in others directions. These animals are immunized with vaccines within the HB₁ cepas (HB₁ and Clone 30) serotypes of the NDV and the Massachusetts (H120 e Ma5) serotypes of the IBV, in several combinations, administered by eye drop. One Treatment (T11) left without immunization was used how control. The Treatments T2, T4 e T10 just suffer immunization against the NDV only or associated in the moment the vaccination or in laboratory at the IBV, being that in the Treatments T5, T6, T7, T8 e T9 was added a vaccination against the infectious bursal disease (IBD). The results show us a reduction at Ac production agains NDV when associated at the IBV (Treatment 4), both mixe3d in the same flask in the moment of the vaccination. However, was observed a few interference, from to the utilization of a vaccine already associated in laboratory (Treatment 10). Whatever the presence of de infectious bursal disease (IBD) in the Treatments (T5 – T8), this virus like to collaborated with the immune system by it precocious activation, reducing the difference in the quantity of Ab when this vaccines are associated in the moment of the immunization.

Keywords: Newcastle disease, viral interference, immunization, infectious bronchitis, gumboro.

* Alunos de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da Universidade Estadual do Ceará (PPGCV/FAVET/UECE).

** Médica-veterinária, mestrada em Ciências Veterinárias pelo PPGCV/FAVET/UECE.

*** Prof. adjunto do Curso de Graduação e do PPGCV/FAVET/UECE, doutor.

**** Alunos de graduação Medicina Veterinária – IC/UECE.

***** Aluno de doutorado em Zootecnia – PDIZ/UFC.

Autor para correspondência: José Luiz Castro Aguiar Filho – e-mail: joseluizflh@bol.com.br

Endereço: Universidade Estadual do Ceará – UECE – Faculdade de Veterinária – FAVET – Av. Paranjana, 1700, Campus do Itaperi, CEP 60740-000

Fone: (0xx85) 299-2748 / 472-0420 – Fortaleza – CE.

Introdução

As doenças respiratórias representam sérias perdas econômicas em muitas áreas produtoras avícolas do mundo. As doenças virais que freqüentemente afetam este sistema são causadas pelos vírus da doença de Newcastle – DNC e da bronquite infecciosa das galinhas – BIG (Villegas, 1998; Alexander, 1997; Gelb e Cianci, 1987). Estas viroses se agravam quando as aves são acometidas de forma concomitante pelo vírus da infecção da bursa de Fabrícus, o qual determina um estado de imunodepressão nestes animais (Kinbenge et al., 1988; Lasher e Shane, 1994; Lukert e Saif, 1997; Nagarajan e Kinbenge, 1997; Saif, 1998), interferindo na eficiência das respostas vacinais (McCullough et al., 1992).

O controle destas doenças depende principalmente de programas imunoproliféricos eficazes, sendo necessária uma avaliação das respostas imunes humorais e celulares. O grau de proteção pós-vacinal contra o vírus da DNC pode ser estimado, indiretamente, no soro sanguíneo, por meio de reações sorológicas, como o teste de inibição da hemaglutinação – HI (de Witt et al., 1992). Um protocolo de vacinação ideal seria a combinação de subunidades vacinais que poderiam ser administradas concomitantemente contra diferentes patógenos. Além de alta eficácia e segurança, uma característica crítica destas vacinas seria a compatibilidade com outras vacinas co-administradas.

Quando se imuniza um hospedeiro com dois ou mais vírus, pode-se verificar três reações: ação de independência, ação de interferência ou ação de sinergismo entre tais agentes. A interferência imune pode ser atribuída a diferentes mecanismos (Insel, 1995). Algumas das causas físico-químicas de interferência imune em vacinas associadas incluem efeitos de interações iônicas com adjuvantes, condutores para absorção ou deslocamento de vários componentes vacinais, e interferências feitas por tampões, estabilizantes ou outros excipientes de uma das vacinas com a(s) outra(s). É conhecido o fenômeno da interferência do vírus da bronquite infecciosa sobre o crescimento do vírus da doença de Newcastle, podendo ser motivo para a baixa produção de anticorpos contra este último (Beard, 1967, 1968; Hanson et al., 1956; Raggi e Lee, 1964). A supressão na produção de anticorpos contra a doença de Newcastle é intensa em pintinhos infectados, sendo relatada a diminuição destes anticorpos não apenas em casos de infecção natural, como também na imunização (Ishizuka e Simon, 2000).

Este trabalho teve como objetivo avaliar o nível de AC contra a DNC em frangos de corte imunizados através da utilização de vacinas associadas tanto no momento do processo quanto já assim produzidas em laboratório, visto as possíveis interações entre seus componentes biológicos.

Material e métodos

Aves

Foram utilizados 720 frangos de corte não sexados com idade de um dia, provenientes de um único lote de matrizes, sendo

que estes não sofreram qualquer tipo de processo de imunização prévio. Estas aves foram alojadas em um galpão dividido em nove boxes, onde receberam água e alimento *ad libitum*, segundo as exigências preconizadas para cada fase de criação, pelo Conselho de Pesquisa em Nutrição (NRC – Nutrient Requirements of Chickens, 1999).

Tratamentos

Estas aves foram divididas em nove tratamentos (T1 – T8), e ainda um tratamento controle (GC). Cada tratamento foi formado por 80 aves, sendo que, destas, apenas 55 foram vacinadas obedecendo aos programas predefinidos, conforme indicados no quadro a seguir. No momento da vacinação as aves foram imediatamente identificadas de forma sistemática através de anilhas fixadas na asa.

Tabela 1: Identificação dos tratamentos vacinais, de acordo com os programas de imunização adotados

IDADE (dias)	TRATAMENTOS VACINAIS							
	T2	T4	T5	T6	T7	T8	T9	T10
1	-	-	IBF	BIG+IBF	BIG+IBF	IBF	IBF	-
8	DNC	DNC+BIG	DNC+BIG	DNC+BIG	DNC+BIG	DNC+BIG	DNC+BIG+IBF	DNC / BIG
16	-	-	-	-	BIG	IBF	IBF	-

Vacinas

Foram administradas vacinas contra as doenças de Newcastle, bronquite infecciosa e infecção da bursa de Fabrícus, produzidas a partir das cepas Hitchner (HB₁ e Clone 30), Massachusetts (H120 e Ma5) e Lukert (LZD 228 – cepa intermediária), com títulos DIE₅₀ de 10^{6,5}, 10^{3,5} e 10^{3,0}, respectivamente. As cepas Clone 30 e Ma5 foram produzidas através da biotecnologia da clonagem, estando, desta forma, incorporadas a uma vacina já associada em laboratório.

A via de eleição para a administração vacinal foi a ocular em todos os procedimentos realizados do início ao fim do experimento, através da instilação de uma gota ocular (0,3mL).

Soros

Foram feitas quatro coletas de sangue. A primeira na chegada do lote, quando os pintinhos estavam com um dia de idade, para determinar a presença de anticorpos maternos contra a DNC, e as outras três aos 25, 35 e 45 dias em aves do tratamento controle, para a avaliação destes.

As coletas de sangue nos demais grupos foram realizadas em duas etapas, sendo a primeira com 35 dias e a segunda, com 45 dias, ou seja, na saída do lote. Após cada coleta, as amostras foram deixadas à temperatura ambiente por cerca de duas horas para que coagulassem e, com a retração do coágulo, a conseqüente expulsão do soro. Em seguida todas as amostras foram para a geladeira (2 - 8°C) e no dia seguinte, pela manhã, foi extraído o soro. Este foi armazenado em frascos tipo "ependorff", e conservado à temperatura de - 10°C, até o dia da última coleta, a fim de todas as amostras seguirem juntas para o laboratório, para serem testadas no mesmo *kit*.

Sorologia (inibição da hemaglutinação - HI)

Esta prática foi realizada através da adição de 50mL de soro em microplacas fundo em "V" contendo 50mL de solução fisiológica. Após a diluição seriada, foram acrescentados 50mL de suspensão viral do vírus da DNC contendo quatro unidades hemaglutinantes (UH) por um período de 45 minutos e em seguida adicionaram-se 50mL de uma suspensão de hemácias de galinha. A inibição da hemaglutinação foi observada em cada uma das amostras após uma hora e daí, calculado o valor dos títulos pela média geométrica (GMT).

Análise estatística

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente ao acaso, com parcelas subdivididas, sendo as parcelas, os tratamentos e as subparcelas, os dias de coleta das amostras.

Os resultados obtidos pelo teste de inibição da hemaglutinação (HI) foram analisados empregando-se o teste "t" de Student (Tukeys Studentized Range - HSD), utilizando o sistema SAS (Statistical Analysis System), em nível de significância $p < 0,05$.

Resultados

O Gráfico 1 representa as aves do tratamento controle (TC), as quais foram alojadas isoladas no mesmo aviário, porém não receberam nenhum tipo de imunização, visto que este grupo foi a prova contra quaisquer possíveis desafios de campo.

Na Tabela 2 podemos observar e comparar os títulos médios geométricos dos tratamentos T2, T4 e T10, os quais foram vacinados apenas contra as doenças de Newcastle e bronquite infecciosa de forma individual, associadas no momento da vacinação e associadas já em laboratório.

Pode-se observar uma significativa diferença na produção de AC contra a DNC quando esta se apresenta associada à BIG, no momento da vacinação. Contudo, quando se fez uso destes antígenos já associados em laboratório, constatou-se uma menor disparidade entre os títulos de anticorpos.

Quanto aos demais tratamentos (T5 ao T9), nos quais as aves que os compunham foram primeiramente imunizadas contra a IBF ou contra a BIG, para somente uma semana a seguir sofrerem imunização por meio de vacinas associadas no momento da vacinação, contendo os vírus das doenças de Newcastle, bronquite infecciosa e da infecção da bursa de Fabrícus, a Tabela 3 representa os seus títulos médios geométricos de anticorpos.

As aves dos grupos T5, T8 e T9, vacinadas no primeiro dia de vida contra a IBF e somente uma semana após, imunizadas contra a DNC, associada à BIG e a IBF, apresentaram melhores resultados de soroconversão.

Para os animais dos tratamentos 6 e 7, inicialmente vacinados contra a BIG e a IBF, os níveis de AC comportaram-se de forma semelhante aos demais, parecendo não haver diferença significativa quando se utiliza a vacina contra a BIG em conjunto com a IBF, no primeiro dia de vida, sobre os níveis de AC para a DNC. Contudo, aos 35 dias de idade uma pequena variação parece emergir de forma bastante suave, logo desaparecendo, quando da saída do lote.

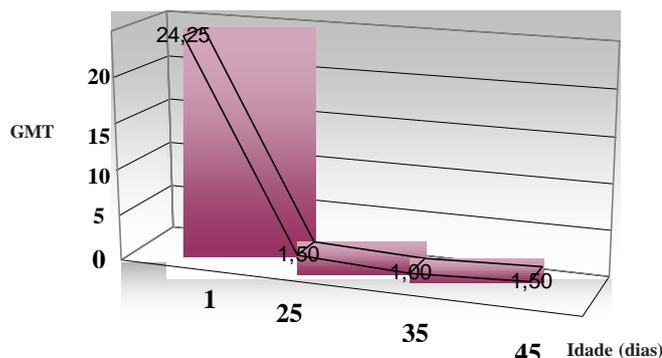


Gráfico 1: Títulos de anticorpos maternos contra a doença de Newcastle em frangos de corte, mensurados através do teste de HI.

Tabela 2: Títulos de anticorpos contra a doença de Newcastle nos grupos os quais sofreram imunização contra a DNC e a BIG, utilizando vacinas associadas em laboratório e no momento da vacinação, mensurados através do teste de HI (\log_{10}).

IDADE (dias)	TRATAMENTOS VACINAIS		
	T2	T4	T10
25	0,963 (A, A)	1,084 (A, A)	1,084 (A, B)
35	1,147 (A, A)	0,837 (A, A)	2,321 (B, A)
45	2,321 (A, B)	0,840 (B, A)	2,231 (A, A)

Letras minúsculas: comparação entre tratamentos na mesma idade
Letras maiúsculas: comparação entre as idades no mesmo tratamento

Tabela 3: Títulos de anticorpos contra a doença de Newcastle nos grupos os quais sofreram imunização contra a DNC, BIG e IBF, utilizando vacinas associadas em laboratório e no momento da vacinação, mensurados através do teste de HI (\log_{10}).

IDADE (dias)	TRATAMENTOS VACINAIS				
	T5	T6	T7	T8	T9
25	0,813 (a, A)	0,753 (a, A)	0,662 (a, A)	0,963 (a, A)	0,541 (a, A)
35	1,436 (a, B)	1,816 (b, B)	1,656 (ab, B)	1,909 (b, B)	1,421 (a, B)
45	1,522 (a, B)	1,756 (a, B)	1,782 (ab, B)	1,963 (b, B)	2,028 (b, C)

Letras minúsculas: comparação entre tratamentos na mesma idade
Letras maiúsculas: comparação entre as idades no mesmo tratamento

Discussão

De acordo com os resultados obtidos através da análise dos títulos de anticorpos contra a doença de Newcastle mediante a vacinação associada deste antígeno com os da bronquite infecciosa e da infecção da bursa de Fabrícus, evidenciou-se uma interferência na produção de anticorpos somente quando o vírus da bronquite infecciosa estava presente em tais associações, como pudemos observar nos resultados do tratamento T4.

Porém, quando se adicionou aos programas de vacinação o vírus da infecção da bursa, uma melhor resposta de títulos de anticorpos foi visualizada, parecendo este ativar de forma precoce o sistema imune das aves, reduzindo a possibilidade e interferência entre componentes vacinais múltiplos.

Estes dados parecem ser concordantes com os de Montgomery et al. (1991; 1994), o qual demonstrou a capacidade do vírus da bronquite infecciosa em interferir com a eficiência das respostas vacinais, aumentando a predisposição a outras doenças. Além disso, em estudos onde utilizou vacinas combinadas, sugeriram que diversas vacinas contendo o vírus vivo da bronquite infecciosa, tanto só quanto em combinação com o vírus da doença de Newcastle, causou interferência com a habilidade da glândula de Harder em responder à estimulação antigênica (Montgomery et al., 1997).

Markham et al. (1956), que vacinaram, de forma concomitante, pintinhos e galinhas com vários níveis de imunidade contra a DNC e a BIG, administrando estas através da pulverização na água de bebida e por aerossol, com uma dose igual por cabeça, para os três sistemas, onde os títulos vacinais para os VDNC e VBIG eram de $10^{8.5}$ e $10^{4.2}$, respectivamente, observaram uma modesta variação, não podendo ser atribuída, porém, somente ao fenômeno de interferência.

O VBIG interfere com o vírus da DNC mais fortemente quanto mais o primeiro está em excesso em relação ao segundo. Esta experiência de Lucas (1963) concluiu que a vacinação simultânea com os referidos vírus atenuados resultou na menor produção de anticorpos contra a DNC em comparação com a imunização efetuada com vacina monovalente.

Três laboratórios pesquisaram o efeito da interferência entre os vírus da DNC e da BIG, independentemente da seqüência de administração, do intervalo de tempo e na quantidade de vírus inoculado de ambas vacinas, onde se notou uma marcada diferença na quantidade de anticorpos produzidos, mensurados através do teste de inibição da hemaglutinação -HI (Raggi et al., 1963).

Em um trabalho onde se empregou uma vacina combinada contra a DNC e a BIG, constituída de 50% do vírus lentogênico da DNC, cepa B1 (título de $10^{9.5}$ a $10^{10.5}$ DIE50), 25% do VBIG, sendo 12,5% pertencente à cepa Massachusetts (título $10^{4.0}$ a $10^{5.5}$ DIE50) e 12,5% à cepa Connecticut (título de $10^{4.0}$ a $10^{5.5}$ DIE50), sendo os demais 25% a solução estabilizante, Simi (1970), demonstrou ser esta vacina capaz de conferir uma boa e rigorosa resposta imunitária.

Nos estudos de Hanson et al. (1956), sobre o fenômeno de interferência entre os vírus vacinais da DNC e da BIG, revelaram que este último vírus foi capaz de interferir com o vírus da DNC quando o primeiro está em excesso. Porém, quando ambas eram administradas com pelo menos uma semana de intervalo, não se observou tal fenômeno.

Hoekstra (1961) cita que o uso de uma vacina combinada com os vírus da DNC e da BIG é eficaz tanto quanto quando administradas separadamente, porém não está completamente ausente de qualquer risco.

Referências

- ALEXANDER, D. J. Newcastle disease and other avian paramyxoviridae infections. In: *Diseases of Poultry*, p. 541-563, 1997.
- BEARD, C. W. Infectious bronchitis virus interference with newcastle disease virus in monolayers of chicken kidney cells. *Avian Dis.* v. 11, p. 399-406, 1967.
- BEARD, C. W. An interference type of serological test for infectious bronchitis virus using Newcastle disease virus. *Avian Dis.* v. 12, p. 658-665, 1968.

Conclusão

A interferência viral é a supressão da multiplicação de um vírus pelo tratamento prévio com o mesmo vírus ou outro, vivo ou morto. Magrassi (1935) cita que a ação supressiva já se desenvolve depois de poucas horas e pode ser verificada seja no animal inteiro, no ovo em desenvolvimento, ou em cultura de tecido.

O mecanismo da interferência é provavelmente múltiplo e depende das condições experimentais. Um mecanismo bem fundamentado consiste na produção de interferon, substância produzida pelas células suscetíveis quando expostas à ação de certos vírus vivos ou mortos. Esta proteína de baixo peso molecular (30.000) impede a multiplicação viral através da inibição da RNA-sintetase que preside à síntese do ácido nucléico (Isaacs e Lindenmann, 1957).

A interferência imune pode ser atribuída a vários diferentes mecanismos (Insel, 1995). Algumas das causas físico-químicas de interferência imune em vacinas associadas incluem efeitos de interações iônicas com adjuvantes, condutores para absorção ou deslocamento de vários componentes vacinais, e interferências feitas por tampões, estabilizantes ou outros excipientes de uma das vacinas com a(s) outra(s).

No caso da combinação de vacinas produzidas com vírus vivo, um vírus pode interferir com o crescimento do outro pela indução de liberação de citoquinas inibitórias como o interferon. Vacinas associadas que tomam como parte um carreador de antígeno comum podem estar sujeitas a carrear indutores de supressão dos epítomos (receptores). Contudo este exato mecanismo não está esclarecido, modelos experimentais sugerem que grandes números de células-B carreadoras específicas, carreadores específicos de anticorpos, indução de energia em células-B receptoras específicas e indução de células supressoras todos fazem parte de um sistema de indução de supressão dos epítomos.

Alguns pesquisadores questionam se o uso de vacinas mistas muito complexas leva a uma diminuta resposta imunológica ou se aumenta o risco de efeitos colaterais. Alguns sustentam a hipótese de que as vacinas multivalentes possam sobrecarregar o sistema imune é infundada. De certo, é que todos concordam que tais vacinas devem ser testadas para assegurar que todos seus componentes induzam uma resposta efetiva e satisfatória.

Desta maneira, pelos resultados comparados com os de diversos pesquisadores, aconselha-se toda vez que se tiver de fazer o uso de vacinas associadas no momento dos processos de imunização, notar para a origem do laboratório, para que não se utilizem vacinas com antígenos produzidos de forma diferente e concentrações (títulos) distintas, principalmente quando se tratar dos vírus das doenças de Newcastle e bronquite infecciosa.

GELB, J. Jr. e CIANCI, C. G. Detergent – treatment Newcastle disease virus as an Agar gel precipitin test antigen. *Poult. Sci.*, v. 66, p. 845-853, 1987.

HANSON, L. E.; WHITE, F. W.; ALBERTS, J. D. Interference between newcastle disease and infectious bronchitis viruses. *Am. J. Vet. Res.*, v. 17, p. 294-298, 1956.

INSEL, R. A. Potential alterations in immunogenicity by combining or simultaneously administering vaccine components. *Ann. New York Acad. Sci.*, v. 754, p. 35-47, 1995.

- KIBENGE, F. S.; DHILLON, A. S.; RUSSELL, R. G. Biochemistry and immunology of infectious bursal disease virus. *J. Gen. Virol.* v. 69, p. 1757-1775, 1988.
- LASHER, H. N.; SHANE, S. M. (1994). Infectious bursal disease. *World's Poult. Sci. J.* v. 50, p. 133-166, 1994.
- LUCAS, A. Les phénomènes d'interférence entre le virus de la maladie de Newcastle et celui de la bronchite infectieuse du poulet. *Bull. Off. Int. Epiz.*, v. 59, p. 1783, 1963.
- LUKERT, P. D.; SAIF, Y. M. Infectious bursal disease. In: CALNEK, B. W.; BARNES, H. J.; BEARD, C. W.; MCDUGALD, L. R.; SAIF, Y. M. (Ed.). *Diseases of Poultry*, 10th ed. Iowa State University Press, Ames, IA, 1997, p. 721-738.
- MAGRASSI. Generalidades sobre vírus. In: BIER, O. *Bacteriologia e Imunologia*. 15. ed. São Paulo: Melhoramentos, 1970, p. 661.
- MARKHAM, F. S.; HAMMAR, A. H.; PERRY, E. B.; TESAR, E. B. Combined Newcastle disease infectious bronchitis vaccines and the absence of interference phenomena. *Cornell Vet.*, v. 46, p. 538, 1956.
- MCCULLOUGH, K. L.; BRUCKER, L.; SCHAFFNER, R.; HEINZ, K. M.; ULRICH, K. *Veterinary Microbiology*. v. 30, p. 99-112, 1992.
- MONTGOMERY, R. D.; MASLIN, W. R.; BOYLE, C. R. Effect of Newcastle disease vaccines and Newcastle disease/ infectious bronchitis combination vaccine on the head-associated lymphoid tissues of the chicken. *Avian Dis.*, v. 41, p. 399-406, 1997.
- MONTGOMERY, R. D., MASLIN, W. R., MAGEE, D. R., BOYLE, C. R., PLEDGER, T., and WU, C-C. Effects of an Arkansas strain of infectious bronchitis vaccine on the head-associated lymphoid tissue (HALT). *Avian Dis.*, v. 35, p. 302-307, 1991.
- MONTGOMERY, R. D., MASLIN, W. R., MAGEE, D. R., BOYLE. Effects of modified-live infectious bronchitis virus vaccines on the head-associated lymphoid tissue (HALT). *Avian Dis.* v. 38, p. 847-856, 1994.
- NAGARAJAN, M. W.; KIBENGE, F. S. Infectious bursal disease virus: a review of molecular basis for variations in antigenicity and virulence. *Can. J. Vet. Res.* v. 61, p. 81-88, 1997.
- NRC. *Nutrient Requirements of Chicken*. 9. ed. Washington: NAP, 1999, 71p.
- RAGGI, L. G.; LEE, G. G.; SOHRAB-HAGHIGHAT, V. Infectious bronchitis virus interference with growth of Newcastle disease virus. I. Study of interference in chicken embryos. *Avian Dis.* v. 7, p. 106, 1963.
- RAGGI, L. G. e LEE, G. G. Infectious bronchitis virus interference with growth of newcastle disease virus. II. Interference in chickens. *Avian Dis.* v. 8, p. 471-480, 1964.
- ISAACS e LINDENMANN. Generalidades sobre vírus. In: BIER, O. *Bacteriologia e Imunologia*. 15. ed. São Paulo: Melhoramentos, 1970, p. 661.
- SAIF, Y. M. Infectious bursal disease and hemorrhagic enteritis. *Poult. Sci.*, v. 77, p. 1186-1189, 1998.
- SAS Institute, Inc (1999). *SAS Online Doc^o Version 8.0*, Cary, N. C.
- SIMI, M. Prove in laboratorio ed in allevamento con un vaccino associato pseudopeste bronchite infettiva. *Veterinaria*, v. 19, p. 235, 1970.
- ISHIZUKA, M. M.; SIMON, V. A. Infecção da bursa de Fabrícious. Doença das aves. *FACTA*, p. 301-314, 2000.
- VILLEGAS, P. Diseases of the respiratory system. *Poultry Sci.*, v. 77, p. 1143-1145, 1998.