

# OTIMIZAÇÃO DA AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CILIAR EM TRAQUÉIAS COMO PARÂMETRO PARA DETERMINAR A EFICÁCIA DE VACINAS VIVAS DE BRONQUITE INFECCIOSA

IM Trevisol, FR Jaenish, VS Silva, L Brentano, TAP Klein, F Ianiski, L Caron, PA Esteves  
Embrapa Suínos e Aves – CNPSA. Concórdia, SC, Brasil.

## Introdução

No Brasil, a bronquite infecciosa das galinhas (BIG) tem sido controlada com vacinação desde 1979, quando a primeira vacina foi licenciada (4). Falhas de proteção tem sido relatadas nos últimos anos e a ocorrência de manifestações clínicas diversas são associadas as variações do vírus e aparecimento de amostras variantes (1). Especula-se que essas variantes resultam em proteção cruzada “pobre” frente a amostra vacinal disponível no nosso país. A identificação de variantes e a avaliação frente a vacina viva, auxiliará no entendimento desses casos clínicos e na adequação dos procedimentos de controle. Porém, determinar a eficácia de uma vacina viva, requer instalações específicas, pessoal qualificado, tempo e um método confiável e exequível. Há muito descrito na literatura, mas nossa experiência tem mostrado a dificuldade em manter padrões de leitura e interpretação para o principal índice de validação de uma vacina viva para BIG. Este índice é o percentual de proteção indicado pela atividade ciliar em anéis de traquéias colhidas de aves vacinadas e desafiadas. A partir desta dificuldade, trabalhamos para adequar este sistema, para uma avaliação exequível e menos subjetiva.

## Material e Métodos

As aves utilizadas para otimização desse método foram vacinadas e desafiadas conforme descrito anteriormente (5). Brevemente, aves SPF foram vacinadas com amostra H120 e desafiadas com amostra de referência e com amostras isoladas e casos clínicos. Cinco dias após o desafio, as traquéias foram colhidas imediatamente após o sacrifício de cada ave, com o mínimo de trauma possível e levadas ao laboratório. Cada traquéia foi dividida 3 porções: proximal (p), mediana (m) e distal (d). Com lâmina de bisturi nº10, 3 seções transversais de aproximadamente 2mm foram feitas de cada porção, resultando em 9 anéis por ave. Microplacas de cultura celular com 96 orifícios foram previamente preenchidas com 250ul de meio de cultura F10-199 contendo 100UI de penicilina G sódica e 100ug de estreptomomicina/mL. Os anéis foram delicadamente colocados na placa, conforme esquema abaixo:

	ave 1			ave 2			ave 3					
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
p A												
m B												
d C												
D												
E												
F												
G												
H												

A leitura ocorreu imediatamente após a colocação dos anéis na microplaca e até 4 horas após a colheita. Os critérios utilizados estão descritos na Tabela 1. As seções de traquéias dos grupos controles não inoculado e inoculado com a amostra patogênica de referência foram utilizadas como padrão para os graus zero e 3 respectivamente.

Foram feitas imagens em tempo real destes e dos graus intermediários, para estudos posteriores.

**Tabela 1** - Escore Embrapa para avaliação de atividade ciliar em anéis de traquéias.

Quantidade de cílios	Velocidade do movimento	Grau
todos	vigoroso	zero
todos	lento	1
alguns	muito lento	2
nenhum	sem movimento	3

## Resultados e Discussão

A partir de informações da literatura (2, 3), o procedimento foi adaptado para microplacas de cultivo celular. Nos primeiros experimentos, os anéis de traquéia eram colocados em tubos de ensaio, dificultando a leitura pelo formato arredondado que movimenta-se facilmente sobre a mesa do microscópio, além de não ser um material adequado para leitura. Também havia dificuldade em comparar anéis da mesma ave (sobreposição de anéis) e comparar anéis de diferentes aves (difícil manter os tubos lado a lado), pois cada ave estava em um tubo. A utilização de microplacas facilitou a leitura, pela estabilidade na mesa e a visualização ficou fácil uma vez que o material é específico para leitura ao microscópio. A comparação entre anéis da mesma ave e entre aves foi resolvida pela disposição dos anéis. Na literatura, a interpretação em graus de ciliostase (parada nos batimentos ciliares) é: zero (todos os cílios batendo) até 4 (ausência de batimento), porém não há detalhes de como interpretar isso. O “escore Embrapa” esta sendo validado em um estudo que envolveu 8 tratamentos, 120 aves e um total de 1080 anéis de traquéias. Nesse estudo, além da leitura imediata dos anéis, porções proximal, mediana e distal de cada ave (3/ave) foram colhidas de forma individualizada em formol a 10% para avaliação histopatológica. Essa avaliação também vai gerar graus de zero a 3, quanto maior o número, maior a severidade das lesões ou alterações. Ao final do processamento desse material, uma análise estatística irá comparar os dois métodos para validação.

## Conclusão

A padronização de um escore de leitura com critérios específicos e exemplos gravados em vídeo facilitou muito a interpretação do ensaio, aumentou a confiabilidade e a reprodutibilidade.

## Bibliografia

1. Back A. 21º Congresso Brasileiro de Avicultura - Anais, 2009, Porto Alegre, RS; 211-215.
2. Darbyshire JH. Avian Pathology 1980; 9:179-184
3. OIE Terrestrial Manual 2008; chapter 2.3.2: 443-455.
4. Silva EN. Revista Brasileira de Ciência Avícola 2010, 12(3):197-203.
5. Trevisol *et al.* Rev. Bras. de Ciê. Av. 2006, suplemento 8, p240.