

## MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA DO EPITÉLIO TRAQUEAL DE PATOS (*Anas platyrinchus*) VACINADOS COM A CEPA LASOTA DO VÍRUS DA DOENÇA DE NEWCASTLE (VDN)

Vanessa Sobue Franzo<sup>1</sup>, Laura Satiko Okada Nakagh<sup>2</sup>, Silvana Martinez Baraldi-Arton<sup>2</sup>, Paulo Lourenço da Silva<sup>3</sup>, Lizandra Amoroso<sup>4</sup>, Antonio Carlos Paulillo<sup>5</sup>

### RESUMO

O presente trabalho avaliou, por meio da microscopia eletrônica de varredura, as características ultra-estruturais do epitélio traqueal de patos (*Anas platyrinchus*) imunizados contra doença de Newcastle. Foram utilizadas 18 aves distribuídas em dois grupos: T1 – grupo controle (não vacinado) e o T2 – grupo constituído de aves vacinadas com a estirpe LaSota. Durante o período experimental, as aves não apresentaram sinais clínicos pós-vacinais. Porém, na análise de fragmentos de traquéia, ao microscópio eletrônico de varredura, observou-se que os animais vacinados com a estirpe LaSota desenvolveram uma descamação no epitélio traqueal que poderá resultar em doenças concorrentes.

**Palavras-chave:** Traquéia, vírus da doença de Newcastle, LaSota, microscopia eletrônica de varredura, patos.

### INTRODUÇÃO

Patos são aves aquáticas de acelerado crescimento corporal, podendo ser criados em cativeiro e estão em crescente demanda no mercado de carnes exóticas de espécies silvestres, além da produção de ovos (FABICHACK, 2000).

Os ovos de patas são muito consumidos em países europeus (CULLINGTON, 1975). No Brasil, a criação de patos é bastante relevante na região Sul, onde são utilizados como fontes de

alimento e empregados na preparação de vacinas em empresas comerciais (COELHO, 1980).

Essas aves são facilmente adaptáveis em cativeiro e muito resistentes às doenças aviárias que acometem comumente galinhas (FABICHACK, 2000).

Por outro lado, semelhantemente à avicultura moderna, a produção de patos domésticos, ainda que em potencial deverá no futuro assumir características próprias e massivas. Desse modo, a criação intensiva dessas aves, a movimentação e o aumento da concentração dos plantéis poderão favorecer a disseminação do vírus da doença de Newcastle (VDN).

Assim sendo, o controle imunoprofilático da doença de Newcastle em patos em nosso meio, enfatiza a relevância desta pesquisa.

A doença de Newcastle é considerada um dos problemas sanitários mais importantes do plantel avícola brasileiro, em virtude de elevados prejuízos que ocasiona (PAULILLO, 1984). Faz parte da lista das enfermidades infecciosas do Office International des Epizooties — OIE (1992) — que reúne as moléstias, cujas conseqüências sócioeconômicas podem ser graves e de grande importância no comércio internacional de aves e seus produtos, sendo seus focos de notificação compulsória.

Atualmente, a doença de Newcastle tem uma distribuição mundial, com uma ampla variação de hospedeiros, em que 27 das 50 ordens de aves existentes, incluindo as aves silvestres e as semi-silvestres criadas em cativeiro, têm sido reportadas natural ou experimentalmente, como infectadas por seu agente etiológico (KALETA; BALDAUF, 1988).

<sup>1</sup> Médica Veterinária. Doutoranda do Departamento de Patologia Animal, UNESP-FCAV, Coordenadora da Faculdade Comunitária de Campinas-FAC III. vsfranzo@yahoo.com

<sup>2</sup> Médica Veterinária. Professora do Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, UNESP-FCAV, smbart@fcav.unesp.br

<sup>3</sup> Médico Veterinário. Professor Associado. Faculdade de Medicina Veterinária-UFU, Uberlândia-MG.

<sup>4</sup> Médica Veterinária. Doutoranda do Departamento de Produção Animal. UNESP-FCAV.

<sup>5</sup> Médico Veterinário. Professor Titular do Departamento de Patologia Animal. UNESP-FCAV, Jaboticabal-SP.

O controle da doença de Newcastle é freqüentemente realizado, em aves reprodutoras, frangos de corte e poedeiras comerciais, mediante vacinação e princípios de manejo, que evitem a disseminação do vírus e eliminem a infecção de uma região após um surto. Porém, tais medidas nem sempre são suficientes, pois a história tem demonstrado que de tempos em tempos e por razões incertas, amostras de VDN emergem de fontes desconhecidas. Existem evidências de surgimento de surtos da doença em aves domésticas e isolamento do vírus patogênico de aves exóticas em algumas partes do mundo, devido ao relaxamento na política de controle sanitário (DORETTO JÚNIOR et al., 1999).

O VDN possui a capacidade de se difundir por todo o mundo por meio de aves suscetíveis, pessoas, equipamentos, ar, ração e até por espécies não aviárias, entre as quais, pequenos roedores e insetos (LANCASTER, 1964; LANCASTER; ALEXANDER, 1975).

Durante o curso da infecção por uma estirpe velogênica do VDN, a maioria das aves excre-

tam grandes quantidades de vírus nas fezes, que se constituem no principal meio de disseminação do VDN de ave para ave (ALEXANDER, 1991).

O VDN replica-se no trato respiratório de aves, causando destruição do epitélio traqueal (LANCASTER, 1964). Entretanto, a ação do VDN não tem sido descrita em epitélio traqueal de patos, apenas em codornas japonesas *Coturnix coturnix japonica* (SANTIN et al., 2003) e em frangos de corte (DORETTO JÚNIOR et al., 1999).

O presente trabalho tem como objetivo apresentar as características ultra-estruturais do epitélio traqueal de patos, mediante o emprego da estirpe lentogênica LaSota do vírus da doença de Newcastle (VDN), através do uso da microscopia eletrônica de varredura (MEV).

## MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizadas 18 patos com 10 dias de vida, alojadas em ambiente com piso forrado com maravalha. Até o oitavo dia de vida, as aves eram mantidas aquecidas por meio de campânulas, e

Tabela 1. Composições percentuais calculadas de alimentos utilizados em rações nas diferentes fases (crescimento e engorda) do ciclo de vida de patos (*Anas platyrinchus*), Unesp (FCAV), Jaboticabal-SP, 2005.

Ingredientes (%)	Ração inicial (1ª a 7ª SV)	Ração engorda (a partir da 8ª SV)
Milho	59.888	72.913
Farelo de soja 45	37.056	19.650
Farelo de trigo	0.000	5.028
Calcário	0.418	0.710
Fosfato bicálcico	1.523	1.026
Sal	0.268	0.285
Suplemento mineral	0.050 <sup>1</sup>	0.050 <sup>1</sup>
Suplemento vitamínico	0.300 <sup>2</sup>	0.300 <sup>3</sup>
Óleo	0.439	0.000
DL-Metionina 99	0.058	0.038
Total	100.000	100.000
<b>Composição Calculada</b>		
Proteína bruta (%)	20,00	16,00
Energia metabolizável (Mcal/Kg)Matéria seca (%)	290087.809	300087.617
Cálcio (%)	0.650	0.600
Fósforo disponível(%)Fibra (%)	0.4003.362	0.3003.036
Metionina + cistina (%)	0.750	0.584
Lisina (%)Sódio (%)	1.1800.150	0.7600.150

SV = semanas de vida

1. Suplemento mineral (quantidade/Kg do produto): Mn – 150.000 mg, Zn – 100.000mg, Fe – 100.000 mg, Cu – 16.000 mg, I – 1500 mg.

2. Suplemento vitamínico (quantidade/Kg do produto): Vit A – 2.666.000 UI, Vit B – 600 mg, Vit B2 – 2.000 mg, Vit B6 – 933,10 mg, Vit B12 – 4000 mcg, Vit D3 – 666,50 mg, Vit E – 5000 UI, Vit K – 600 mg, Ácido fólico – 333,25 mg, Ácido pantotênico – 5000 mg, Biotina – 20 mg, Colina – 133.330 mg, Niacina – 13.333 mg, Selênio – 100 mg, Antioxidante – 7,5 g, Cocidiostático – 33,332 g, Promotor de crescimento – 20 g, Veículo Q.S.P.3 – Suplemento vitamínico (quantidade/Kg do produto): Vit A – 2.332.750 UI, Vit B – 533,20 mg, Vit B2 – 1.666,25 mg, Vit B6 – 866,45 mg, Vit B12 – 3.332,50 mcg, Vit D3 – 500 mg, Vit E – 4000 UI, Vit K – 500 mg, Ácido fólico – 233,275 mg, Ácido pantotênico – 4.332,250 mg, Colina – 99.975 mg, Niacina – 11.663 mg, Selênio – 100 mg, Antioxidante – 5,0 g, Cocidiostático – 20 g, Promotor de crescimento – 13,33 g, Veículo Q.S.P.

3. Suplemento vitamínico (quantidade/Kg do produto): Vit A – 2.332.750 UI, Vit B – 533,20 mg, Vit B2 – 1.666,25 mg, Vit B6 – 866,45 mg, Vit B12 – 3.332,50 mcg, Vit D3 – 500 mg, Vit E – 4000 UI, Vit K – 500 mg, Ácido fólico – 233,275 mg, Ácido pantotênico – 4.332,250 mg, Colina – 99.975 mg, Niacina – 11.663 mg, Selênio – 100 mg, Antioxidante – 5,0 g, Cocidiostático – 20 g, Promotor de crescimento – 13,33 g, Veículo Q.S.P.

alimentados em bebedouro infantil e comedouro tipo copo de pressão. Após esse período, os animais foram alimentados em bebedouro e comedouro tipo copo de pressão.

Durante o período experimental, as aves receberam água e ração à vontade. A dieta à base de milho e farelo de soja seguiram as recomen-

dações de exigências nutricionais, conforme o National Research Council (1994) e Rostagno et al. (1983) (Tabela 1).

O período experimental constituiu-se de dois grupos diferentes formados por 18 aves, distribuídas aleatoriamente de acordo com os seguintes tratamentos (Tabela 2).

Tabela 2. Distribuição de patos (*Anas platyrinchus*) em grupos experimentais (MEV–microscopia eletrônica de varredura), Unesp (FCAV), Jaboticabal-SP, 2005.

Grupo experimental	Vacinação (10 DI)	Via de administração
TI*	Controle	—
TII	LaSota	Ocular

\* Grupo Controle – não recebeu vacina (período experimental)

DI = dias de idade

Utilizou-se vacinas vivas (liofilizadas) preparadas com a estirpe lentogênica LaSota, do VDN. A determinação da dose infectante 50% (EID<sub>50</sub>) da estirpe vacinal em estudo foi EID<sub>50</sub> (LaSota) = 10<sup>7,20</sup>/0,1 mL.

Os grupos foram vacinados por via ocular com a estirpe LaSota, no décimo dia de vida das aves, a partir da reconstituição das vacinas liofilizadas, utilizando-se água destilada como diluente, na proporção de 30mL/1000 doses vacinais/1000 aves, correspondente a 0,03mL. da dose vacinal ocular.

Decorridos sete, 14 e 21 dias após a vacinação, três aves de cada tratamento foram necropsiadas para colheita de fragmentos da porção média da traquéia para avaliação dos níveis de destruição das células epiteliais, devido à replicação do vírus vacinal.

Os fragmentos de traquéia foram fixados em solução de glutaraldeído a 3% em tampão fosfato 0,1 M, pH 7,6 durante duas horas, à temperatura de 4° C. A seguir, os fragmentos eram lavados por seis vezes consecutivas no tampão fosfato 0,1 M, pH 7,6 e então, pós-fixado em solução de tetróxido de ósmio a 1% durante 30 minutos, à temperatura de 4° C. Decorrido esse tempo, os mesmos foram novamente lavados com o mesmo tampão, por seis vezes consecutivas, desidratadas em concentrações crescentes de álcool etílico (30, 50, 60, 70, 80, 90 e 100%), 20 minutos em cada concentração sendo que, na última, as amostras foram lavadas por três vezes consecutivas, 20 minutos em cada lavagem. Depois da desidratação, o material passou pela câmara de secagem, de secador de ponto crítico, mediante a utilização de dióxido de carbono. O material foi então montado em porta objeto apro-

priado, recoberto com uma camada de 30 nm de ouro e, finalmente, elétrônmicrografado em microscópio eletrônico de varredura (Modelo Jeol JSM 25SII), operando em 15 KV.

## RESULTADOS

Nenhuma ave apresentou sinais clínicos respiratórios pós-vacinal. As elétrôn-micrografias (Figura 1) dos fragmentos traqueais revelaram um epitélio de traquéia íntegro, constituído de cílios traqueais no grupo controle (T1).

Porém, nas amostras de epitélio traqueal de aves vacinadas com a cepa LaSota (T2), as amostras colhidas (sete, 14 e 21 dias pós-vacinação) apresentaram uma destruição epitelial intensa, com a presença de material mucoso e regiões desprovidas de cílios (Figura 2). Aves vacinadas com a cepa LaSota não mostraram regeneração epitelial (após 21 dias pós-vacinação).

## DISCUSSÃO

De acordo com Kaleta; Baldauf (1988), a doença de Newcastle tem uma distribuição mundial, com uma ampla variação de hospedeiros, inclusive aves silvestres e semi-silvestres criadas em cativeiros, têm sido reportadas natural ou experimentalmente, como infectadas por seu agente etiológico, entre elas o pato da espécie *Anas platyrinchus*.

Patos vacinados via intra-ocular com cepa LaSota (T2) não apresentaram sinais clínicos de reação pós-vacinal, contrastando com os estudos em frangos de corte (DORETTO JÚNIOR et al., 1999), em que o uso dessa estirpe vacinal desencadeou reações respiratórias (ALLAN, 1971). Em

frangos de corte, a severidade das lesões e extensão dos sinais clínicos dependem de uma série de fatores, que incluem a cepa vacinal utilizada, a infecção concomitante pelo *Mycoplasma gallisepticum* e a via de administração da vacina (BEARD et al., 1993). Apesar da ausência de sinais clínicos respiratórios pós-vacinal, a análise de fragmentos traqueais de patos vacinados com a cepa LaSota mostrou uma grande destruição epitelial dias após a vacinação. Então, especula-se que a ausência de sinais clínicos pode ser resultado da ausência da infecção por agentes concomitantes, entre eles o *Mycoplasma gallisepticum* que pode intensificar as reações respiratórias. É possível que o controle das condições ambientais do presente experimento preveniu qualquer infecção concorrente. Isso pode não ser possível na avicultura moderna, o que torna-se preocupante, considerando que a criação de palmípedes está em expansão (FABICHACK, 2000), principalmente na região Sul do Brasil (COELHO, 1980). Além disso, Lai; Ibrahim (1983) confirmaram através da análise por elétron-micrografias que a vacinação com a cepa LaSota em pintinhos de um dia resulta em danos no epitélio traqueal dessas aves.

O grupo de aves vacinadas via intra-ocular com a cepa LaSota (T2) não mostrou qualquer tipo de reação clínica pós-vacinal. A avaliação das elétron-micrografias da traquéia, entretanto, demonstraram descamação epitelial, já que o vírus da doença de Newcastle replica-se no trato respiratório de aves causando destruição do epitélio traqueal. Essas observações já foram comprovadas por Lancaster (1964) quando trabalhou com outras aves e por Mast et al., (2005) ao observarem a progressão das lesões no epitélio traqueal em aves "specific pathogenic-free" vacinadas com a cepa LaSota com o aparecimento de muco, hipertrofia e lise celular. Isso pode ser explicado pelo fato de a estirpe LaSota ter índice de patogenicidade intracerebral 0.4, o maior entre as outras cepas conhecidas de Newcastle (ALEXANDER, 1997).

## CONCLUSÕES

A espécie *Anas platyrinchus* não apresentou sinais clínicos respiratórios pós-vacinal de doença de Newcastle, com o uso da estirpe LaSota via intra-ocular, porém houve descamação epitelial da traquéia não mostrando nenhum sinal de regeneração após 21 dias pós-vacinação; a microscopia eletrônica de varredura mostrou-se um método alternativo, seguro e eficaz na avaliação da patogenicidade do VDN em epitélio traqueal de patos

(*Anas platyrinchus*), já que permite a observação das lesões da doença de Newcastle.

## Scanning electron-microscopy of tracheal epithelium of ducks (*Anas platyrinchus*) vaccinated with lasota strain of the newcastle disease virus (ndv)

### ABSTRACT

This study aimed at evaluating the use of scanning electron microscopy in the study of the post-vaccinal respiratory reaction of tracheal epithelium of ducks (*Anas platyrinchus*) immunized against Newcastle disease. Eighteen ducks were distributed into two groups: T1 – control birds (non-vaccinated); T2 – birds vaccinated with LaSota strain. The birds did not show detectable clinical signs of post-vaccinal respiratory reaction. However, the analysis of tracheal fragments by scanning electron microscopy showed that birds vaccinated with LaSota strain developed epithelial sloughing of the trachea that will result in diseases.

**Keywords:** Trachea, Newcastle Disease Virus, LaSota, scanning electron microscopy, ducks.

### REFERÊNCIAS

ALEXANDER, D.J. Newcastle disease and other paramyxovirus infections. In: CALNEK, B. W. et al. **Diseases of Poultry**. Ames: Iowa State University Press, 1991. p. 469-519.

ALEXANDER, D.J. Newcastle disease and other paramyxovirus infections. In: CALNEK, B.W. et al. **Diseases of Poultry**. 10.ed. Ames: Iowa State University Press, 1997, p. 541-569.

ALLAN, W. H. The problem of Newcastle disease. **Nature**, v. 34, p. 124-131, 1971.

COELHO, S. Pato e Marreco. Esses bicudos não se beija. **Especial Globo Rural**, p. 13-20, 1980.

BEARD, C.W.; VILLEGAS, P.; GLISSON, J.R. Comparative efficacy of the B1 and VG-GA vaccine against velogenic viscerotropic Newcastle disease virus in chickens. **Avian Diseases**, v. 37, p. 222-25, 1993.

CULLINGTON, J.M. **Patos y gansos. Manuales**

de técnica agropecuária. Ed. Acribia: Epanha, 1975. 136p.

DORETTO JÚNIOR, L.; PAULILLO, A.C.; SANTOS, J.M.; SILVA, G.S.; BERCHIERI JÚNIOR, A. Utilização da microscopia eletrônica de varredura na avaliação da reação respiratória pós-vacinal em epitélio traqueal de pintos. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, v.1, p. 149-152, 1999.

FABICHACK, I. **Criação de Patos e Marrecos**. Ed. Nobel, 2000. 72p.

KALETA, E.F.; BALDAUF, C. Newcastle disease in free-living and pets birds. In: ALEXANDER, D.J. **Newcastle disease**. Boston: KLUWER Academic Publishers, 1988. p. 197-246.

LAI M.C.; IBRAHIM A.L. Scanning electron microscopy of tracheal epithelium of chickens infected with velogenic viscerotropic Newcastle disease virus. **Avian Diseases**, v. 27. n. 2, p. 393-404, 1983.

LANCASTER, H.J.E. Newcastle disease control by vaccination. **Veterinary Bulletin**, v. 34, n. 2, p. 57-76, 1964.

LANCASTER, J.E.; ALEXANDER, D.J. **Newcastle Disease Virus and Spread**. Canadá: Department of Agriculture, Monograph n. 11, 1975. 79p.

MAST, J.; NANBRU, C.; VAN DEN BERG, T.; MEULEMANS, G. Ultrastructural Changes of the Tracheal Epithelium after Vaccination of Day-Old Chickens with the La Sota Strain of Newcastle Disease Virus. **Veterinary Pathology**, v. 42, n. 5, p. 559-565, 2005.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL. **Nutrient requirements of poultry**. 9. ed. Washington, D.C.: National Academic Press, 1994. 155p.

OFFICE INTERNATIONAL DES EPIZOOTIES. Newcastle disease. In: TRUSZCZYNSKI, M. et al. **International Animal Health Code – Mammals, Birds & Bees**, 6. ed. Paris, 1992. p. 157-65.

PAULILLO, A.C. **Estudo experimental da resposta imunitária às vacinas inativada (oleosa) e viva (amostra LaSota) contra a doença de Newcastle**. 1984. 129p. Tese (Doutorado em Microbiologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1984.

ROSTAGNO, H.S.; SILVA, D.J.; COSTA, P.M.A.

**Composição de alimentos e exigências nutricionais de aves e suínos: (tabelas brasileiras)**. Viçosa: UFV, 1983. 59p.

SANTIN, E.; LIMA, F.S.; PAULILLO, A.C.; NAKAGHI, L.S.O.; MAIORKA, A. The use of scanning electron microscopy in post-vaccinal evaluation of tracheal epithelium of *Coturnix coturnix japonica*. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 33, n. 1, 2003, p. 121-124.

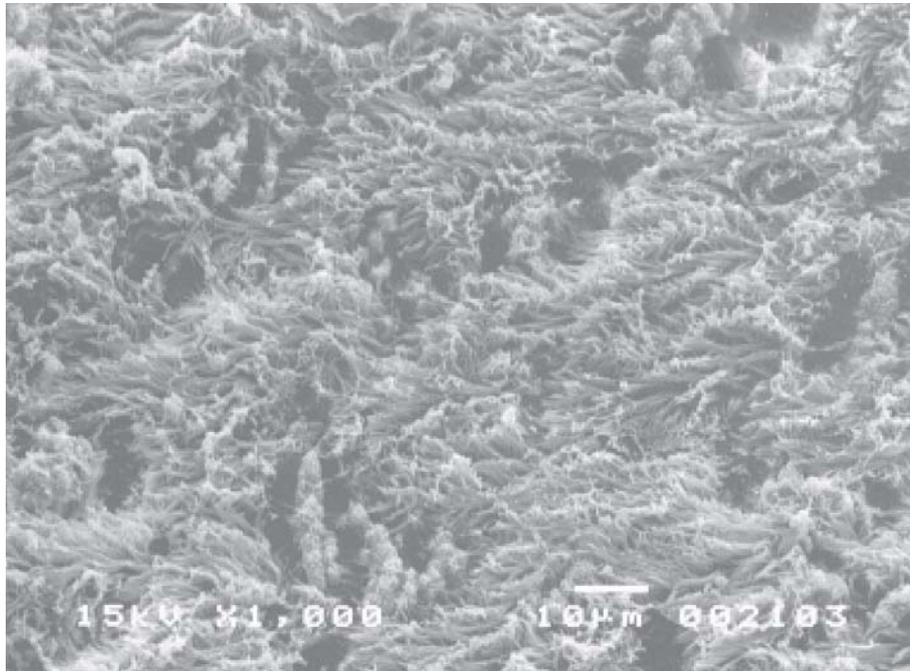


Figura 1. Elétron-micrografia de epitélio traqueal de patos (*Anas platyrinchus*) do grupo controle. Epitélio íntegro com a presença de cílios.

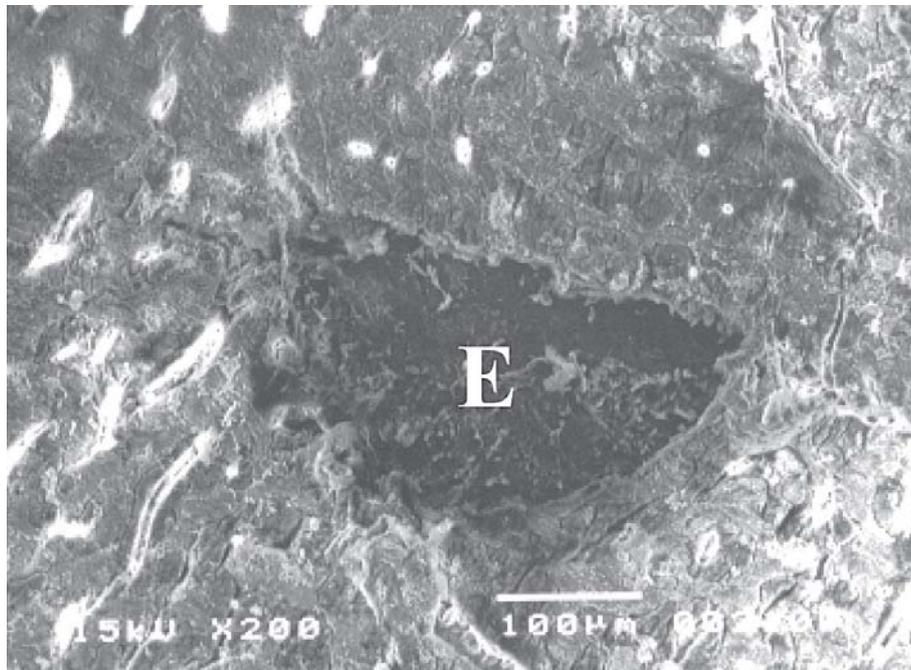


Figura 2. Elétron-micrografia de traquéia de pato (*Anas platyrinchus*) colhida aos 7 dias pós-vacinação com a cepa LaSota, mostrando grande destruição epitelial (E).