

DECTEÇÃO DO VÍRUS DA BRONQUITE INFECCIOSA DAS GALINHAS A PARTIR DE LÍQUIDO E MEMBRANA CORIOALANTÓIDE

Klein, T. E.^{1*}; Costa, C.²; Ritterbusch, G. A.³; D'Avila, A.⁴; Okino, C. H.⁵;
Trevisol, I. M.⁶; Esteves, P. A.⁶; Brentano, L.⁶

¹Graduanda em Ciências Biológicas pela Universidade do Contestado, Campus Concórdia, Bolsista Embrapa Suínos e Aves. E-mail: tainaek@yahoo.com.br;

²Graduanda em Ciências Biológicas pela Universidade do Contestado, Campus Concórdia, Estagiária da Embrapa Suínos e Aves, Bolsista de iniciação científica – PIBIC/CNPq

³Doutoranda-Programa de Pós-Graduação em Veterinária - Universidade Federal de Pelotas, Bolsista – CNPq

⁴Bolsista Pós-Graduação-CNPq

⁵Analista da Embrapa Suínos e Aves, Concórdia, SC

⁶Pesquisadores da Embrapa Suínos e Aves, Concórdia, SC

Palavras chave: vírus da bronquite, obtenção de vírus, MCA, LCA.

Introdução

A Bronquite Infecciosa das galinhas (BI) é uma doença causada por um vírus da família *Coronaviridae*, afetando galinhas de todas as idades(5). O vírus da Bronquite Infecciosa das Galinhas (VBIG) acomete principalmente o trato respiratório, podendo infectar também os tratos reprodutivo (queda na produção de ovos) e renal (síndrome nefrite-nefrose e urolitíase)(5). O manejo imuno-profilático dessa doença é realizado principalmente pela vacinação com vírus atenuado, e ao implementar princípios de biossegurança(4). Usualmente o VBI é propagado em ovos embrionados de galinhas, sendo posteriormente isolado através da colheita do líquido corioalantóide (LCA). Nesse trabalho, comparamos a quantidade de vírus coletado a partir da membrana corioalantóide (MCA) e do LCA.

Materiais e Métodos

O experimento foi realizado no laboratório de Sanidade Animal da Embrapa Suínos e Aves. Para obtenção do vírus, foram inoculados 0,2mL de uma amostra do VBI em ovos "SPF" (*Specific Pathogen Free*) e incubou-se por 9 dias a 37°C (3). Após 48 horas foram colhidos o LCA e a MCA. As MCAs foram trituradas, lavadas e centrifugadas a 3000 rpm durante 10 minutos por 3 vezes com PBS (Solução Salina Fosfatada Tamponada). O sobrenadante foi desprezado e o precipitado ressuspenso em TNE (Tris-EDTA). O LCA e as MCAs foram colocados em tubos de ultra centrífuga com um colchão de sacarose (30%) e centrifugados a 30.000rpm durante três horas. Os sobrenadantes foram descartados e os precipitados ressuspenso em tampão TNE (1). Em seguida, foi realizada a quantificação de proteínas das suspensões em espectrofotômetro. Realizou-se também a quantificação viral através da titulação em ovos SPF conforme descrito anteriormente(2).

Resultados e Discussão

No decorrer do trabalho, foi possível perceber que a manipulação das membranas é mais laboriosa e demorada do que a colheita do LCA. Contudo, a quantificação de proteínas das suspensões de MCA em espectrofotômetro mostrou um volume proteico 125% maior nestas do que nos LCA (Fig.1). Nossa expectativa, a partir desse resultado, era que a quantidade de vírus também seria maior. Dessa forma poderíamos diminuir o número de ovos inoculados e aumentar a quantidade de vírus obtido. Porém, ao realizar a quantificação viral do material obtido a partir de MCA e

LCA, observou-se que não houve diferença significativa entre os títulos virais obtidos (Tabela 1).

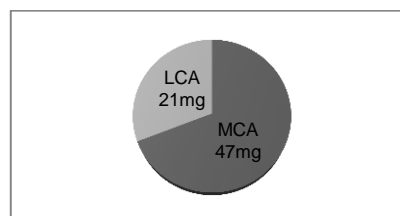


Fig. 1. Resultado da análise de quantificação proteica para LCA e no MCA em mg/mL.

Tab. 1. Quantificação viral nos dois substratos.

Substrato	Quantidade de vírus (DIE50%)
MCA	10 ^{5,83}
LCA	10 ^{6,37}

Conclusões

O VBIG pode ser encontrado nas MCAs, mas o procedimento de colheita e preparação de MCA é mais demorado e laborioso do que a obtenção de LCA, muito embora, ali, encontre-se uma significativa quantidade de vírus. Com o intuito de se obter maiores quantidades de vírus durante a propagação em ovos embrionados podem ser utilizadas ambas as fontes (LCA e MCA).

Referências

1. SYLVESTER, A.S. et al. Purification of infectious bronchitis virus propagated in embryonated chicken eggs and its confirmation by RT-PCR. *Indian J. Comp. Microbiol. Immunol. Infec. Dis.*, v.24, p.143-147, 2003.
2. REED, L. J.; MUENCH, H.A. simple method of estimating fifty per cent end points. *Am. J. Hyg.*, v.27, p.493-97, 1938.
3. SENNE, D.A. Vírus Propagation in Embryonating Eggs. In: *A Laboratory Manual for the Isolation, Identification and Characterization of Avian Pathogens*. 5th ed, The American Association of Avian Pathologists, Athens, Georgia, 2008, chapter, p.204-208.
4. Hipolito, O; et al. Bronquite Infecciosa das galinhas pg19.
5. BERCHIERI, A.J, et al. Doença das aves. 2 ed. Gráfica Ideal pg 631, 2009.