

AVALIAÇÃO DO PERFIL DE EXCREÇÃO DO VÍRUS DA BRONQUITE INFECCIOSA DAS GALINHAS POR RT-qPCR E ISOLAMENTO VIRAL

Tainá Eliza Klein^{1*}; Moniqueli Rigo²; Chanaisa Costa²; Paulo Augusto Esteves³; Lara Maria Trevisol³; Liana Brentano³ e Cintia Hiromi Okino³

¹Graduanda em Ciências Biológicas pela Universidade do Contestado, Campus Concórdia, bolsistada na Embrapa Suínos e Aves

e-mail: tainaek@yahoo.com.br

²Graduandas em Ciências Biológicas pela Universidade do Contestado, Campus Concórdia

³Embrapa Suínos e Aves

Palavra Chave: bronquite infecciosa das galinhas, RT-qPCR, isolamento viral, excreção viral.

INTRODUÇÃO

A Bronquite infecciosa das galinhas (BI) tem como agente etiológico o vírus da bronquite infecciosa (VBI), que é um RNA-vírus, membro da família *Coronaviridae*, gênero *Coronavirus*. É definida como sendo uma doença infectocontagiosa viral aguda, com manifestações predominantemente respiratórias em frangos, poedeiras e matrizes, e dependendo do tropismo viral pode acometer rins e gônadas(1). Os objetivos desse trabalho foram: - comparar a sensibilidade de um método de diagnóstico molecular (RT-PCR em tempo real- RT-qPCR) em relação ao convencional de isolamento viral em ovos embrionados; - verificar o perfil de excreção do VBI via traqueia e via cloaca em diferentes intervalos pós-infecção.

MATERIAIS E MÉTODOS

O experimento foi realizado no laboratório de Sanidade Animal da Embrapa Suínos e Aves. Trinta e cinco aves da linhagem comercial Cobb com sete dias de idade foram inoculadas com a estirpe vacinal atenuada H120 do VBI, com dose preconizada pelo fabricante, via óculo-nasal. Após a vacinação foram colhidos suabes de traqueia e de cloaca nos intervalos de 3, 7 e 18 dias pós-vacinação (dpv). Parte do material colhido foi submetida ao método convencional de diagnóstico do VBI (isolamento viral em ovos embrionados "SpecificPathogenFree"(SPF) (3), e o restante do material à extração de ácidos nucleicos automatizada com o "kit"Magmax viral Isolation(Ambion) no aparelho Magmax Express (Ambion), conforme recomendações do fabricante. Em seguida o RNA extraído foi testado quanto à quantificação absoluta por RT-qPCR em tempo real, utilizando-se o "kit" Ag Path OneStep(Ambion), oligonucleotídeos e sonda para amplificação de fragmento da região 3' UTR do VBI como descrito anteriormente (2).

RESULTADOS E DISCUSSÕES

Os resultados de quantificação absoluta do VBI em amostras de traqueia e de cloaca indicam maior positividade no intervalo de 7dpv, principalmente na traqueia, com 96,6% de amostras positivas, frente aos 83,3 % de positivos observados na cloaca (Figura 1). Nos resultados de isolamento viral, observou-se perfil de positividade semelhante, embora nas amostras de suabe de cloaca colhidas nos intervalos de 3 e 7 dpv tenham apresentado menor quantidade de positivos quando comparado aos resultados da RT-qPCR (Figura 2).

CONCLUSÕES

Quando comparado os dois métodos de detecção do vírus da BI utilizados, podemos observar que os dois métodos foram eficientes. Entretanto, o método de isolamento viral em ovos embrionados é muito laborioso e demorado (até 3 semanas para obtenção de resultado), enquanto a quantificação viral por RT-qPCR constitui um método rápido (aproximadamente quatro horas para obtenção de resultado) e sensível. As duas metodologias utilizadas confirmaram que os níveis de excreção viral no período pós-vacinação atingem um pico por volta dos 7dpv (via cloaca e traqueia), sendo mais pronunciado via traqueal.

REFERÊNCIAS

1. BERCHIERI, A.J., et al. **Doenças das aves**. 2 ed. Editora:Cidade.p. 631. 2009.
2. CHOUSALKAR, K.K.; CHEETHAM, B.F.; ROBERTS, J.R.; **(Revisar título do artigo e retirar negrito) LNA probe-based real-time RT-PCR for the detection of infectious bronchitis virus from the oviduct fun vaccinated laying hens; Journal of Virological Methods**, p. 67-71.2009.
3. OWEN, R. L.; COWEN, B. S.; HATTEL, A. L.; NAQI, S. A.; WILSON, R. A. **Título do artigo. Avian Pathology**, v. ??, p.663 - 673. 1991.

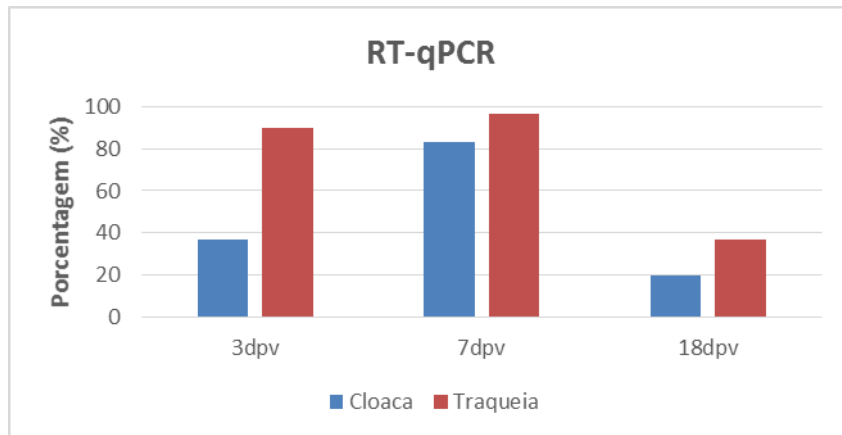


Figura 1. Gráfico representativo da porcentagem de amostras positivas pela técnica de RT-qPCR em amostras desuabes de traqueia e de cloaca colhidas nos intervalos de 3,7 e 18 dias pós-vacinação.

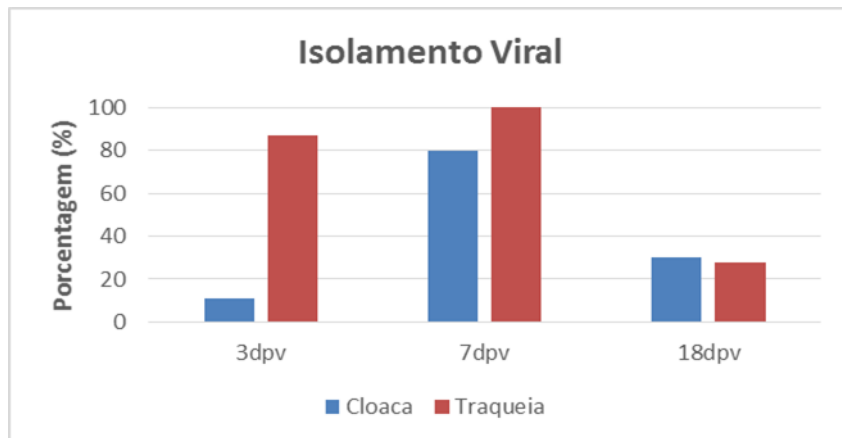


Figura 2. Gráfico representativo da porcentagem das amostras positivas pela técnica de isolamento viral em ovos embrionados em amostras desuabes de traqueia e cloaca colhidas nos intervalos de 3,7 e 18 dias pós-vacinação.