

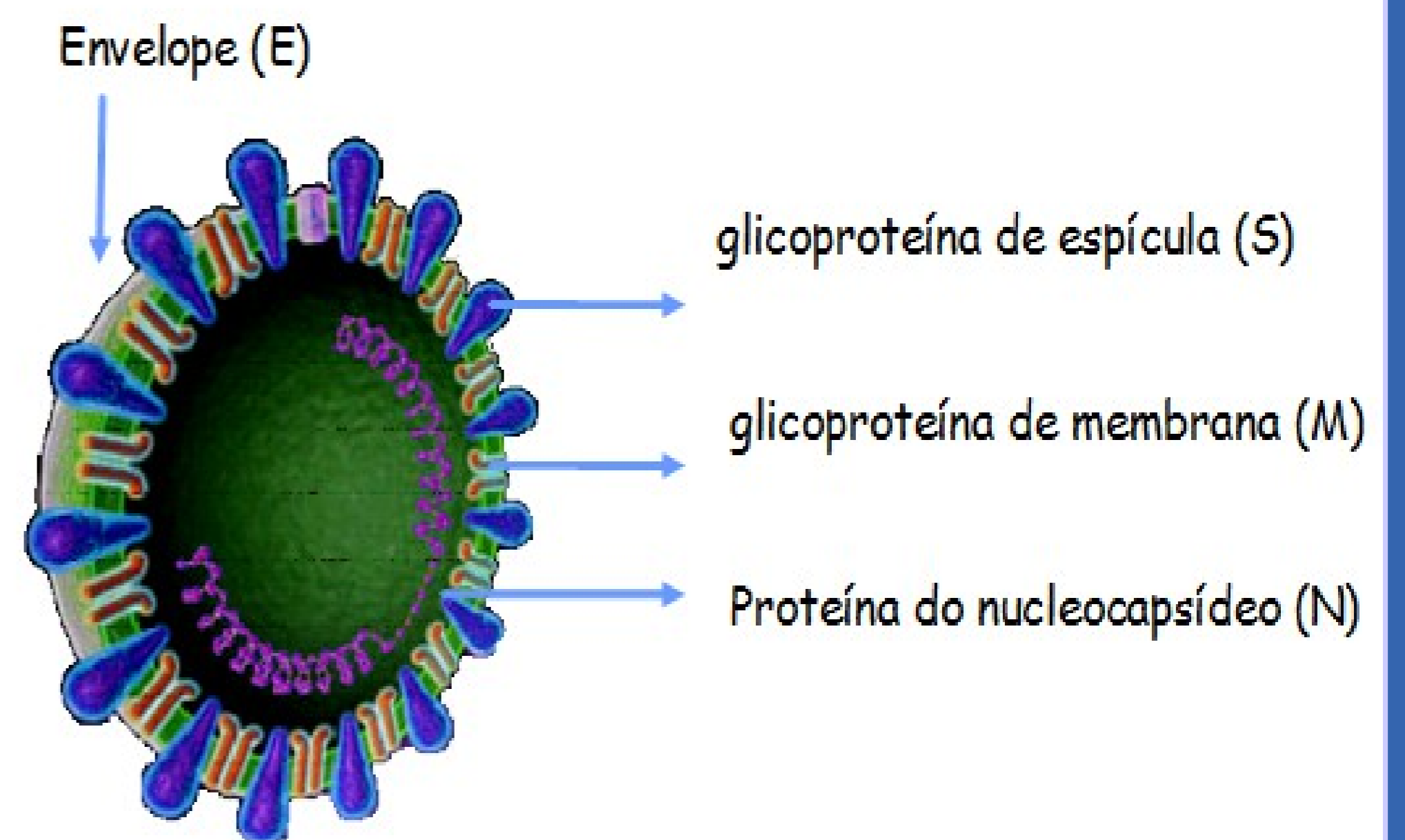


Desenvolvimento de teste de detecção molecular de genótipos vacinais e de campo do vírus da bronquite infecciosa (VBI) das galinhas

Fernanda de Jesus Braga, Isadora Navarini, Aline Padilha Fraga, Nilo Ikuta, Marcos Vinícius Schiavoni Correa, Vagner Ricardo Lunge.

INTRODUÇÃO

A produção industrial de aves é um processo intensivo e muitas doenças infecciosas afetam os lotes nas granjas comerciais. A bronquite infecciosa das galinhas (BIG) é uma destas doenças, afetando aves de todas as idades e causando importantes perdas econômicas. A BIG é causada pelo vírus da bronquite infecciosa (VBI) (Fig. 1), apresenta grande diversidade genética, sendo classificado em sorotipos e genótipos vacinais (como a cepa Massachusetts - Mass) ou variantes. Estudos recentes demonstram que existe uma grande disseminação de genótipos variantes de campo no Brasil (denominados BR e classificados em BR-I e BR-II. A confirmação de infecção pelo VBI é realizada por testes laboratoriais como isolamento e detecção do RNA viral. Técnicas moleculares modernas, como a transcrição reversa seguida da reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT-qPCR), possibilitam um diagnóstico sensível, rápido e menos laborioso. O objetivo desta pesquisa foi desenvolver técnicas laboratoriais de RT-qPCR para a detecção específica da cepa Mass e genótipos BR.

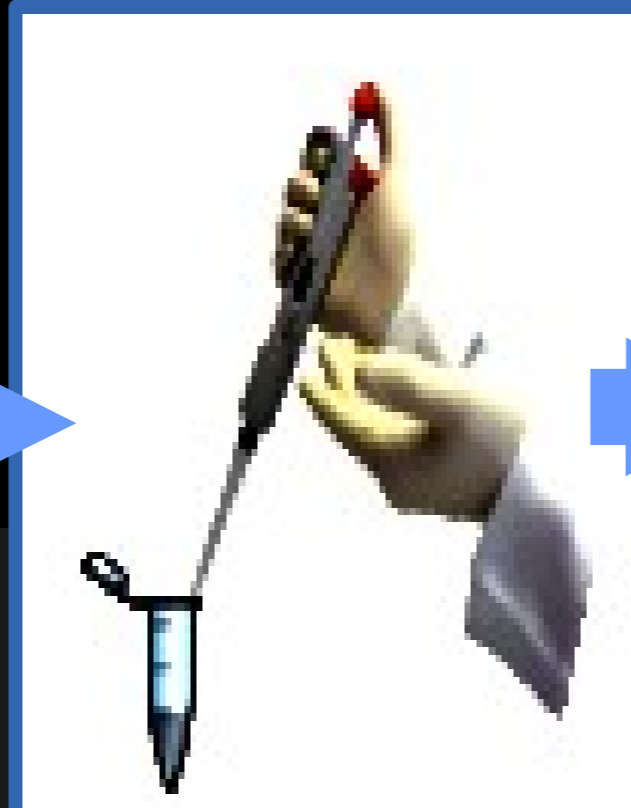


MATERIAIS & MÉTODOS

TABELA 1. Amostras de genótipos vacinais & variantes

	Vacinais (MASS)	Variantes (BR-I, BR-II)	Total
	Amostras	Amostras	
Liq. Alantóide	4	14	18
Vacina	3	-	3
Total nº	7	14	21

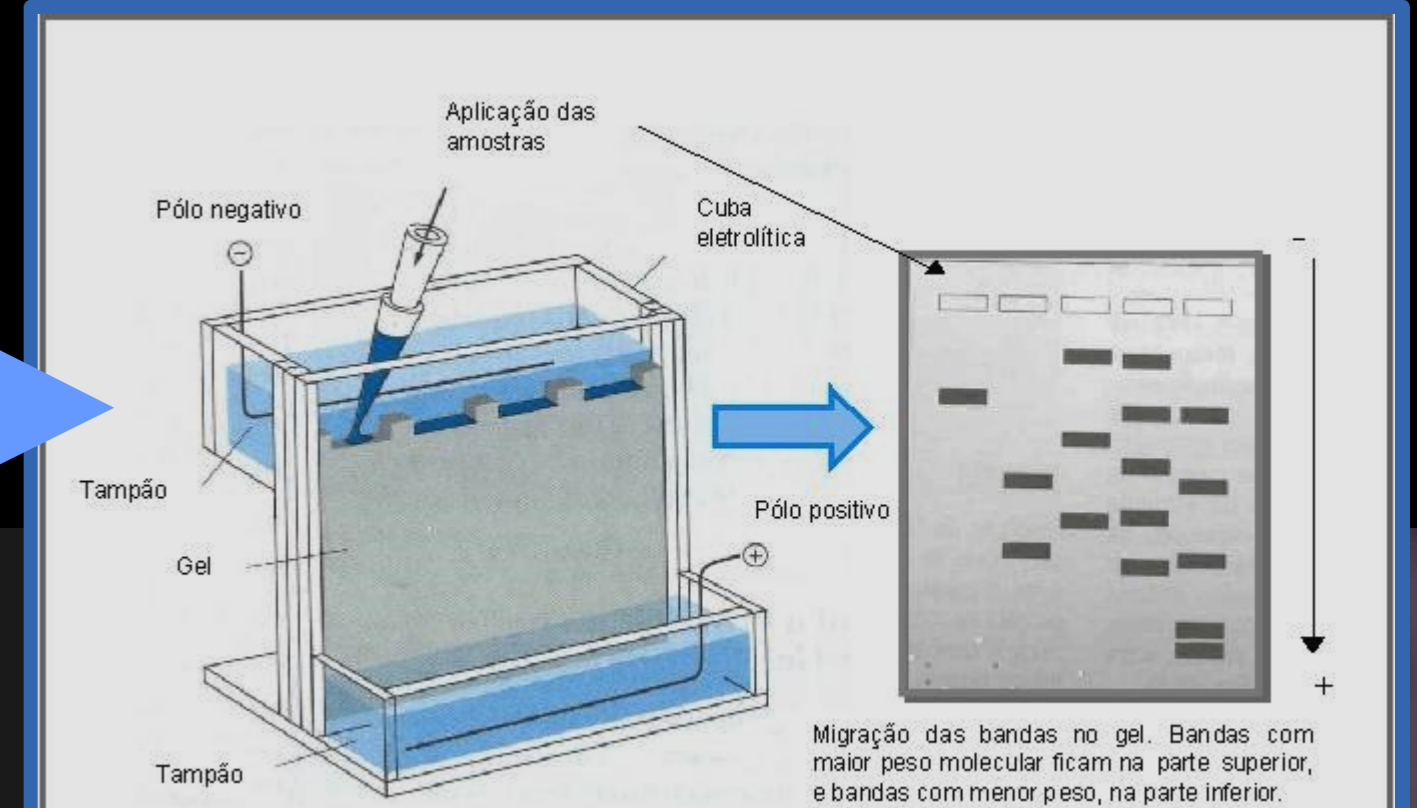
Extração das 21 amostras



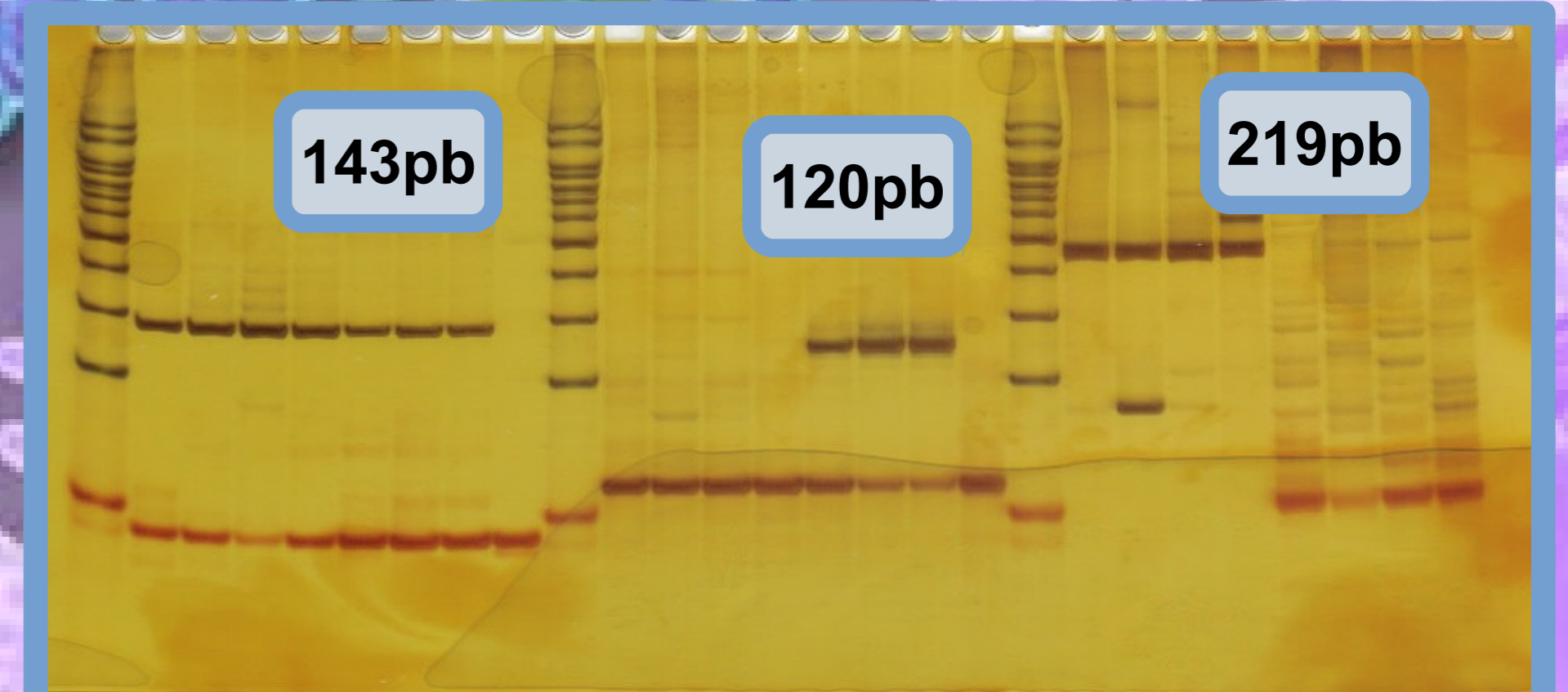
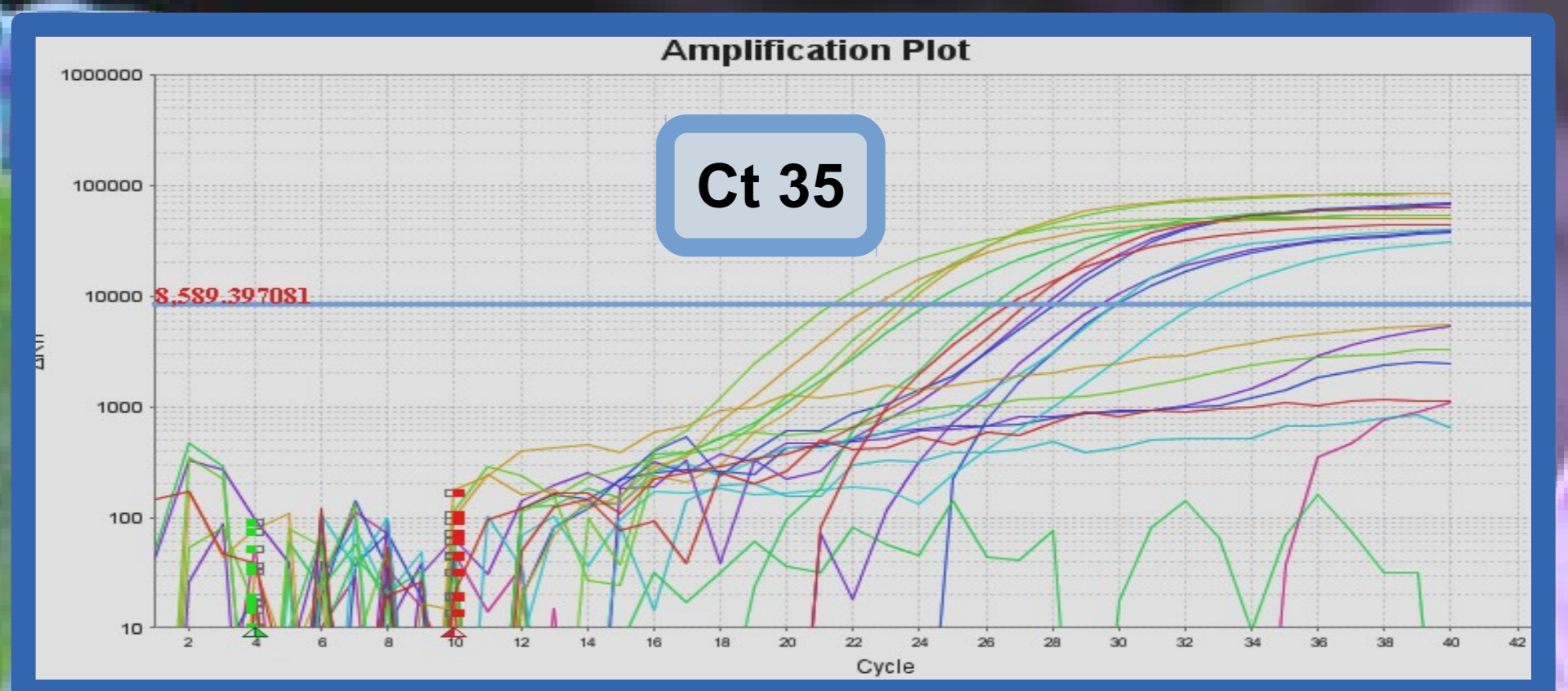
Amplificação (RT-qPCR)



Detecção (eletroforese gel de poliacrilamida)



Foram desenhados conjuntos de primers e sondas específicos para os genótipos Mass e BR, tendo como alvo o gene S (porção S1). As amostras foram submetidas à extração do RNA viral e analisadas com o teste de detecção padrão de VBI (RT-qPCR da região 5'UTR do genoma) e com os dois métodos genótipos específicos (Mass RT-qPCR e BR RT-qPCR). As amplificações foram consideradas positivas nas amostras com leitura até o ciclo (Ct) 35. Os amplicons foram submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida para observação dos fragmentos de tamanho esperado: 143 pares de bases (bp) para o 5'UTR RT-qPCR, 120bp para o Mass RT-qPCR e 219 bp para o BR RT-qPCR.



RESULTADOS

Os resultados obtidos demonstraram a detecção de todas as amostras de genótipo Mass (3 vacinas e 4 isolados) e a não amplificação de nenhuma amostra dos genótipos BR utilizando o método Mass RT-qPCR, inclusive com uma elevada correlação de valores de Ct com o teste padrão. No entanto, apenas as amostras de genótipos BR-I apresentaram resultados positivos com o método BR RT-qPCR (Mass e BR-II apresentaram resultados negativos) e não houve uma boa correlação com os valores de Ct do teste padrão.

CONCLUSÃO

Estes resultados preliminares demonstram o desenvolvimento de um método para a detecção de amostras do genótipo Mass, mas ainda não dos genótipos BR. Novos estudos estão sendo desenvolvidos para a implementação do método específico para detecção de amostras do genótipo BR.

REFERÊNCIAS

1--Cook J. K., Jackwood M., Jones R. C. The long view: 40 years of infectious bronchitis research. Avian Pathology, v. 41, n. 3, p. 239-250, 2012. 2-- De Wit J. J., Cook J. K., Van Der Heijden H. M. Infectious bronchitis virus variants: a review of the history, current situation and control measures. Avian Pathology, v. 40, p. 223-235, 2011. 3-- Fraga A.P., Balestrin, E., Ikuta, N., Fonseca, A.S.K., Spilki, F.R., Canal, C.W., Lunge, V.R. Emergence of a new genotype of avian infectious bronchitis virus in Brazil. Avian Diseases, 57:225-232. 2013.