

## VIABILIDADE DO USO DE OVOS DE CODORNA DE CASCA BRANCA NO DIAGNÓSTICO DE DOENÇAS VIRAIS DE IMPORTÂNCIA NA AVICULTURA COMERCIAL

**KAMILA NEUTZLING BOESCHE<sup>1</sup>; RAULENE RODRIGUES LOBO<sup>2</sup>; GILBERTO  
D'AVILA VARGAS<sup>3</sup>**

<sup>1</sup>UFPel – boeschekamilla@gmail.com

<sup>2</sup>UFPel – raulenelobo@gmail.com

<sup>3</sup>UFPel – gdavilavargas@gmail.com

### 1. INTRODUÇÃO

A técnica de inoculação de diferentes vírus em ovos embrionados é considerada padrão ouro no diagnóstico de doenças como Influenza e Doença de Newcastle. Os ovos de codorna podem ser usados para este fim, sendo necessárias algumas modificações nas técnicas utilizadas em ovos de galinha (*Gallus domesticus*) (RAUSCHER et al., 1962). Os ovos de codornas do gênero *Coturnix coturnix japonica* que possuem casca branca facilitam o processo de ovoscopia quando comparados aos de casca pigmentada. Além disso, apresentam vantagens sobre ovos de galinha, dentre elas custo menor de produção, menor tempo de incubação, necessidade de menor espaço físico e a mais importante, ser de uma espécie diferente do *Gallus domesticus* e não portadora de抗ígenos e anticorpos de interesse na avicultura comercial moderna, não interferindo no diagnóstico e na replicação viral.

O objetivo do presente trabalho foi avaliar a replicação dos vírus da doença de Newcastle, Bouba Aviária, Bronquite Infecciosa das Galinhas, e Influenza Equina em ovos de codorna possibilitando verificar as alterações causadas em diferentes intervalos de tempo de incubação e concentrações virais.

### 2. METODOLOGIA

Foram utilizados 351 ovos embrionados de codorna (*Coturnix coturnix japonica*) de casca branca da linhagem NISSEI fornecidos pela Granja Fujikura localizada no município de Suzano-SP. Para o desenvolvimento dos embriões os ovos foram mantidos em incubadora a 37°C e umidade controlada de 55%.

Para o inoculação do vírus de Newcastle foi utilizada uma amostra vacinal liofilizada (vírus LA-Sota), reconstituída em 3ml de meio essencial mínimo (MEM) estéril (pH 7,0). As inoculações foram feitas aos sete dias de incubação pela cavidade cório-alantoide. Foram utilizados quatro volumes de vírus, (20, 40, 80 e 100µl/dose), três períodos de incubação (24, 48 e 72 horas) com seis repetições. Foi realizada a ovoscopia diariamente para verificar mortalidade embrionária. Coletou-se o líquido alantoide em cada período da incubação, sendo este submetido ao teste de Hemaglutinação (HA) para titulação segundo o descrito por ALEXANDER (1989).

Para a inoculação do vírus da Bouba Aviária foi utilizada amostra vacinal liofilizada (vírus pombo), sendo reconstituída em 1 ml de diluente da vacina. As diluições do vírus foram de 1:10, 1:100, 1:1.000, 1:10.000. As inoculações foram feitas aos sete dias de incubação pela via da membrana córioalantoide, sendo realizada ovoscopia diária para monitoramento dos embriões. Sete dias após a

inoculação as membranas foram coletadas e submetidas à análise histopatológica, sendo avaliada a hiperplasia epitelial, degeneração vacuolar, corpúsculos de inclusão, inflamação, congestão e edema.

Para o Vírus da Bronquite Infecciosa das Galinhas foi utilizada a vacina Bio-Bronk-Vet H-120, contendo vírus atenuado, amostra Massuchsetts. A vacina foi reconstituída em 5 ml de MEM, sendo utilizadas quatro diluições de vírus (1:10, 1:100, 1:1000, 1:10.000) e uma somente com a vacina. As inoculações foram realizadas nos embriões com 8 dias de incubação. Após a inoculações os ovos permaneceram na incubadora por sete dias sendo realizada diariamente a ovoscopia que foi aplicada para verificar mortalidade embrionária. Depois dos sete dias de incubação foi feita a avaliação macroscópica da presença ou ausência das possíveis lesões nos embriões como nanismo, enrolamento e congestão dos vasos sanguíneos. A titulação viral foi realizada do Método de REED & MUENCH (1938).

A inoculação do Vírus da Influenza Equina foi realizada a partir de uma amostra cedida pela Universidade Federal de Santa Maria, Setor de Virologia. A escolha deste vírus foi feita como alternativa a utilização do vírus de Influenza Aviária, já que ambos se replicam em ovos embrionados e a Influenza Aviária ainda não existe no nosso país, sendo portanto um risco manipular este agente. Os ovos foram incubados por sete dias, e 6 deles foram inoculados no oitavo dia na cavidade alantoide em um volume de 100 $\mu$ l/dose. Após 48 horas de incubação ocorreu a coleta do líquido alantóide e armazenado em freezer -20°C para realização do teste de HA. Essas amostras virais posteriormente foram usadas na segunda passagem em ovos embrionados de codorna com os volumes de 20, 40 e 100  $\mu$ l/dose com dois períodos de coletas (24 e 48 horas) e com seis repetições. A titulação viral foi realizada através do teste HA de acordo com o descrito por ALEXANDER (1989).

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Quando utilizado o vírus da doença de Newcastle, verificou-se que os resultados dependem do tempo de incubação e do volume utilizado. O melhor tempo de incubação foi de 72 horas, apresentando títulos virais elevados ( $P<0,0001$ ) com relação aos demais. O protocolo oficial da "Office Internacional de epizooties – OIE" (2008) preconiza a faixa de tempo de incubação pós-inoculação viral com embriões de galinha de 96 até 168hrs. Com relação aos volumes dos vírus utilizados a concentração de 100 $\mu$ l/dose ocasionou maior elevação nos títulos, sendo estatisticamente superior às demais utilizadas ( $P<0,0001$ ).

Nos ovos inoculados com o vírus da Bouba Aviária, a melhor visualização das lesões pox na membrana corioalantoide deu-se após sete dias de inoculação, apresentando em torno de 3 lesões por membrana. No exame histopatológico verificou-se infiltrado inflamatório e grandes corpúsculos de inclusão intracitoplasmáticos eosinofílicos (Corpúsculo de Bollinger) nas células epiteliais, os quais são patognomônicos da doença (BACK et al., 1995; MOHAN e FERNANDES, 2008; TAGELDIN et al., (2006).

Nos ovos inoculados com o vírus da Bronquite Infecciosa das Galinhas, os embriões submetidos ao período final de sete dias de incubação pós-inoculação viral apresentaram lesões de nanismo e enrolamento (LOVATO; DEZENGRINI, 2007).

A replicação do vírus Influenza Equina foi dependente da concentração e do tempo de incubação. O volume que proporcionou os títulos virais mais elevados

foi o de 40 $\mu$ l/dose. O melhor tempo de incubação foi com 48 horas, sendo superior aos demais ( $P=0$ ).

#### 4. CONCLUSÕES

No presente trabalho foi possível identificar as alterações causadas em ovos embrionados de codornas de casca branca a partir da infecção por diferentes vírus, em concentrações e tempos de incubação distintos. A padronização desses resultados viabiliza o uso de ovos de codorna para diagnóstico de doenças virais de aves comerciais.

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

RAUSCHER, F. J.; REYNIERS, J. A.; SACKSTEDER, M. R. Japanese quail egg embryo as a host for viruses. **Journal of Bacteriology**, v. 84, p. 1134–1139, 1962.

ALEXANDER, D. J. **A laboratory manual for the isolation and identification of avian pathology**. 3. ed. Dubuque, Iowa: Kendall/Hunt, 1989. 225p.

REED, L.J.; MUENCH, H. A simple method of estimating fifty percent endpoints. **The American Journal of Hygiene**. 27: 493–497.

OIE (Office International de Epizooties). Enfermedad de Newcastle, 2008. Disponível em: [http://web.oie.int/esp/normes/mmanual/pdf\\_es\\_2008/2.03.14.%20Enfermedad%20de%20Newcastle.pdf](http://web.oie.int/esp/normes/mmanual/pdf_es_2008/2.03.14.%20Enfermedad%20de%20Newcastle.pdf). Acesso em 20 jul. 2016.

BACK, A.; SONCINI, R. A.; RUTHES, O.; MADUREIRA, J. S.; FLORES, R. An atypical fowl pox outbreak in broilers in Southern Brazil. **Avian Diseases**, v. 39, p. 902-906, 1995.

LOVATO, L. T.; DEZENGRINI, R. CORONAVIRIDAE. In: FLORES, E. F. (Org.) **Virologia Veterinária**. Santa Maria: Ed. UFSM, 2007 p. 632-634.