

AVALIAÇÃO DO PERFIL DE EXCREÇÃO DO VÍRUS DA DOENÇA DE NEWCASTLE POR qRT-PCR EM TEMPO REAL E ISOLAMENTO VIRAL

C.H. Okino, G.M. Matos, A. d'Ávila, L.S. Munhoz, L. Brentano.

Laboratório de Sanidade e Genética Animal – Embrapa Suínos e Aves – Concórdia - SC

Introdução

A infecção pelo vírus da doença de Newcastle (NDV) já foi descrita em mais de 200 espécies de aves, mas a severidade da doença depende do hospedeiro e patogenicidade do vírus. Em aves comerciais a doença é notificável quando causada por vírus patogênicos(1). O objetivo desse trabalho foi o de verificar a sensibilidade de um método oficial de diagnóstico molecular em comparação ao isolamento viral e a carga de vírus vacinal excretada no período pós-vacinação uma vez que a detecção de vírus vacinal é um fator importante a considerar no diagnóstico diferencial de suspeita de surtos.

Material e Métodos

Os níveis de anticorpos maternos no soro das aves, foram mensurados pelo teste de Inibição da hemaglutinação, previamente à inoculação via óculo-nasal de $10^{5,43}$ DIE₅₀/ave de vacina atenuada La Sota do NDV em 30 frangos de corte com 10 dias de idade. Nos intervalos de 2, 5, 9 e 14 dias após a inoculação (dpi), foram colhidas amostras de suabe de cloaca e de traqueia de cada ave, submetidos individualmente, à extração automática de RNA (Magmax viral Isolation e testados por RT-PCR em tempo real para amplificação do gene M do NDV de acordo com protocolo (2) recomendado pelo laboratório de referência do USDA (NVSL, Ames, EUA). Para quantificação absoluta do número de cópias de RNA, incorporamos ao método o uso de um RNA controle sintetizado a partir de segmento de 576nt do gene M clonado no vetor TopoTA (Life Technologies) e o RNA transcrito *in vitro* quantificado. Uma curva padrão foi definida com diluições seriadas de RNA. Todas os suabes foram submetidos também ao isolamento viral em ovos embrionados SPF (“Specific Pathogen Free”) mediante três passagens em ovos para confirmar o isolamento do vírus.

Resultados e Discussão

O título médio de anticorpos maternos presentes nas aves foi de 1:14. Um aumento inicial da quantificação do NDV por RT-PCR em tempo real foi observada no intervalo de 2dpi, com pico aos 5dpi tanto para amostras de traqueia (Log₁₀ 4,4 cópias de RNA viral) e de cloaca (Log₁₀ 0,8 cópias). Aos 9dpi houve um declínio da excreção viral, que foi mais pronunciado aos 15dpi (Figura 1). Os resultados obtidos pela técnica de RT-PCR em tempo real foram semelhantes aos obtidos após terceira passagem do isolamento viral em ovos embrionados (Tabela 1). A maior porcentagem de detecção foi observada nos suabes de traqueia, principalmente nos intervalos de 2 e 5 dpi. Foi observado também um aumento da porcentagem de detecção do NDV após as sucessivas passagens em ovos embrionados pela técnica de isolamento viral.

Conclusões

A detecção do NDV vacinal por RT-PCR em tempo real em suabes de traqueias foram confirmados apenas

após 3 passagens no método padrão de Isolamento viral, sendo as três passagens em ovos mais sensível na detecção do vírus em suabes de cloaca. O uso de curva padrão de quantificação de RNA confirmou que os níveis de excreção viral pós vacinação atinge um pico entre 2 a 5 dias, sendo a excreção do NDV vacinal é prioritariamente via trato respiratório e pode se manter por período superior a 15 dias. Portanto o histórico de vacinação de lotes submetidos a análises de suspeitas de Newcastle é muito relevante para interpretação de resultados e análises subsequentes de caracterização viral.

Figura 1. Quantidade média do Log₁₀ do número de cópias de RNA viral detectado por RT-PCR em tempo real em de suabes de traqueia e de cloaca nos diferentes intervalos após vacinação.

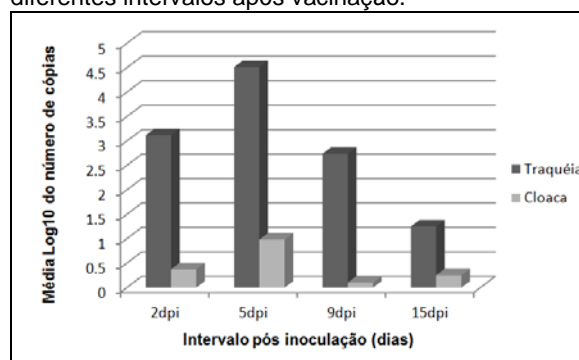


Tabela 1. Detecção do NDV por RT-PCR em tempo real e Isolamento viral em amostras de suabes de traqueia e de cloaca colhidos a partir de aves vacinadas

	dpi	RT-PCR	IV 1P	IV 2P	IV 3P
Traqueia	2	26/30 (86,67%)	19/30 (63,33%)	30/30 (100%)	30/30 (100%)
	5	29/30 (96,67%)	27/30 (90,0%)	29/30 (96,67%)	29/30 (96,67%)
	9	22/30 (73,33%)	6/30 (20,0%)	8/30 (26,66%)	12/30 (40%)
	15	11/30 (36,67%)	3/30 (10,0%)	3/30 (10%)	6/30 (20%)
Parcial		88/120 (73,33%)	55/120 (45,83%)	70/120 (58,33%)	77/120 (64,17%)
Cloaca	2	2/30 (6,67%)	0/30 (0%)	0/30 (0%)	0/30 (0%)
	5	7/30 (23,33%)	1/30 (3,33%)	1/30 (3,33%)	8/30 (26,67%)
	9	1/30 (3,33%)	0/30 (0%)	0/30 (0%)	3/30 (10%)
	15	2/30 (6,67%)	1/30 (3,33%)	1/30 (3,33%)	5/30 (16,67%)
Parcial		12/120 (10%)	2/120 (1,67%)	2/120 (1,67%)	16/120 (13,33%)
Total		100/240 (41,67%)	61/240 (25,41%)	72/240 (30%)	93/240 (38,75%)

Bibliografia

- OIE. Terrestrial code. Cap. 2.3.14. Newcastle Disease 2012
- Wise, M.G. et al, J. Clin. Microbiol. 42(1): 329–338. 2004.

Agradecimentos:

Suporte financeiro CNPQ/MAPA edital 64/2005 projeto
578177/2008-0