

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Faculdade de Veterinária
Programa de Pós-Graduação em Veterinária



Dissertação

**Padronização de técnicas de diagnóstico em virologia utilizando ovos
embrionados de codorna como modelo biológico**

Raulene Rodrigues Lobo

Pelotas, 2015

Raulene Rodrigues Lobo

**Padronização de técnicas de diagnóstico em virologia utilizando ovos
embrionados de codorna como modelo biológico**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Veterinária da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências (área de concentração: Sanidade Animal).

Orientador: Prof. Dr. Gilberto D'Avila Vargas

Coorientador: Prof. Dr. Geferson Fischer

Pelotas, 2015

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação na Publicação

L799p Lobo, Raulene Rodrigues

Padronização de técnicas de diagnóstico em virologia utilizando ovos embrionados de codorna como modelo biológico / Raulene Rodrigues Lobo; Gilberto D'Ávila Vargas, orientador; Geferson Fischer, Co-orientador. — Pelotas, 2015.

38f. : il.

Dissertação (Mestrado) — Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, 2015.

1. Codornas. 2. Ovo embrionado. 3. Líquido alantoíde. 4. Membrana corioalantoíde. I. Vargas, Gilberto D'Ávila, orient. II. Fischer, Geferson, coorient. III. Título.

CDD : 636.59

Raulene Rodrigues Lobo

Padronização de técnicas de diagnóstico em virologia utilizando ovos embrionados
de codorna como modelo biológico

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em
Ciências, Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária,
Universidade Federal de Pelotas.

Data da Defesa: 27/02/2015

Banca examinadora:

Prof. Dr. Gilberto D'Ávila Vargas (Orientador)
Doutor em Zootecnia pela Universidade Federal de Pelotas

Prof. Dr. Geferson Fisher
Doutor em Biotecnologia pela Universidade Federal de Pelotas

Prof. Dr. Roberto de Andrade Bordin
Doutor em Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses pela Universidade de
São Paulo

Prof. Dra. Sílvia de Oliveira Hübner
Doutora em Ciências Veterinárias pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Agradecimentos

Primeiramente agradeço a Deus, pelo dom da vida e por permitir que encontrasse pessoas maravilhosas em meu caminho as quais alguns considero de minha família.

Agradeço a minha mãe pelo amor e dedicação, sempre estando ao meu lado em todos os momentos da minha vida, e ao meu pai (in memoriam).

Aos meus irmãos, Luciano e Zequistilene, que mesmo longe me apoiam em cada jornada da minha vida.

Ao meu esposo, Eustaquio, pelo amor, companheirismo e apoio fundamental para realização desse nosso sonho.

Ao meu orientador, Gilberto D'Avila Vargas, primeiramente pela oportunidade de realizar esse trabalho e por sua amizade, companheirismo e confiança.

Ao meu co-orientador, Geferson Fischer, pela colaboração neste projeto e também pela sua amizade.

A William Fujikura por nos proporcionar condições para o trabalho através do fornecimento de material de estudo (ovos de codorna de casca branca) para a realização desse projeto.

A Roberto Bordin pela parceria e colaboração sempre que necessário.

Aos amigos do Laboratório de Virologia e Imunologia da Faculdade de Medicina Veterinária da UFPeL: José Carlos Rösler Sandrini e Eliete Sandrini pelo apoio e amizade.

A Dona Marcia pelos seus cuidados quase maternos.

A Francine Bretanha de Souza, Alice Meirelles Leite, Tony Picolli, Cristina Peter e Cloé Pich pela ajuda necessária na realização de cada etapa deste trabalho e principalmente pela amizade e companheirismo que foram importantes em mais essa jornada.

Aos alunos de Pós-graduação da equipe Labvir (Laboratório de Imunologia e Virologia): Maurren Fernandes, Débora Scopel, Fábio Silva, Clarissa Castro, Fernanda Souza e o técnico Paulo Rodrigues.

Aos professores Fernando Bandeira, Marcelo de Lima e Silvia Hübner pela amizade e ajuda sempre que necessária.

Aos graduandos de Medicina Veterinária: Matheus Gonçalves, Mateus Piovesan, Camila Matos, Paulo Quadros, Renata Karina, Daiane Wilsmann, pela colaboração deste projeto.

O Lino pelo colaboração de forma direta neste trabalho.

A professora Simone em nome do Laboratório Regional de Diagnóstico pelo auxílio e dedicação em parte deste trabalho.

Ao Programa de Pós-graduação, pela oportunidade de realizar mais uma etapa da minha caminhada e fundamentalmente à Coordenação de Aperfeiçoamento de pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos.

Muito Obrigada

*“O que precisava fazer era ficar em pé na encruzilhada do presente e olhar o passado com sinceridade; e escrever o futuro como se estivesse reescrevendo o passado.”
(Haruki Murakami, 1Q84 - Livro 2)*

Resumo

LOBO, RAULENE, Rodrigues. **Padronização de técnicas de diagnóstico em virologia utilizando ovos embrionados de codorna como modelo biológico.** 2015.38f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2015.

Os ovos embrionados de codorna podem ser utilizados para inoculação de diversos tipos de vírus, por diferentes vias, assim como técnicas já conhecidas e aplicadas em ovos embrionados de galinha (*Gallus domesticus*) com algumas adequações. Podem ser atribuídas vantagens a esse processo, tais como: custo menor de produção, redução do tempo de incubação, necessidade de menor espaço físico e, talvez a mais importante, ser de uma espécie diferente do *Gallus domesticus* e desta forma não ser portadora de antígenos e anticorpos de interesse na avicultura comercial moderna, não interferindo no diagnóstico e na replicação viral. Para avaliar o potencial de replicação viral, foram utilizados 351 ovos embrionados de codorna de casca branca (*Coturnix coturnix japonica*) da linhagem NISSEI e amostras dos vírus que acometem aves (vírus da doença de Newcastle, vírus da varíola aviária e vírus da bronquite infecciosa das galinhas) e também em outras espécies como vírus da influenza equina. Nos ovos inoculados com o vírus de Newcastle foi coletado o líquido alantoíde para a realização do teste de HA, que apresentou melhor resultado no tempo de 72 horas com o volume de 100µl. Na inoculação do vírus da varíola aviária foram coletadas as membranas corioalantoídes para analisar as lesões pox e análise histopatológica, sendo que todos os volumes utilizados (20, 40, 80 e 100µl) apresentaram lesões características desta enfermidade. Nos vírus da bronquite infecciosa das galinhas, de todos os volumes utilizados, somente o de 40µl produziu lesões no embrião, como nanismo e enrolamento. A replicação do vírus influenza equina, assim como aconteceu com o VDN, foi dependente da concentração e o tempo de incubação, sendo o melhor tempo o intervalo de 48 horas, utilizando o volume de 40µl. Os ovos embrionados de codornas de casca branca também foram utilizados para testar a viabilidade de uso em cultivo primário de fibroblastos, sendo que os mesmos permaneceram viáveis após quatro passagens in vitro. Este modelo biológico foi eficiente para replicação do vírus da doença de Newcastle, vírus da varíola aviária, vírus da bronquite infecciosa das galinhas e vírus da influenza equina. Estes embriões se mostraram aptos também para serem utilizados em cultivo primário de fibroblastos.

Palavras-chave: codornas; ovo embrionado; líquido alantoíde; membrana corioalantoíde

Abstract

LOBO, RAULENE, Rodrigues. **Standardization in virology diagnostic techniques using embryonated quail eggs as the biological model.** 2015.38f. Dissertation (Master degree in Sciences) - Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2015.

Quail embryonated eggs may be used for inoculation of several viruses by different ways, like the well-known techniques used in embryonated chicken (*Gallus domesticus*) eggs with some light adjustments. Some advantages may be assigned to this process like: lower production costs, reduction in incubation time, no need for large spaces and, maybe the most important one, for being a different species of *Gallus domesticus* and so, not carrying antigens and antibodies of interest for modern commercial poultry, it does not interfere in the diagnose or in the viral replication. To assess the viral replication potential, we used a total of 351 embryonated quail eggs of white eggshell type (*Coturnix coturnix japonica*) NISSEI lineage and samples of virus that affect birds (Newcastle disease virus, *avipoxvirus* and infectious bronchitis chickens and also, some other species like the equine influenza virus. From the eggs inoculated with Newcastle virus it was collected the allantois fluid to perform HA test which presented the better result for 72 hours period and a volume of 100µl. From the inoculation with Fowl pox we collected the chorioallantoic membrane to analyze both pox lesions and for histopathological analysis, all considered volumes (20, 40, 80 e 100µl) presented the disease characteristic lesions. For the Chicken Infectious Bronchitis Virus, from all considered volumes used only the 40µl volume produced embryo lesion like dwarfism and winding. The Equine Influenza Virus replication similar to what was observed with NDV was concentration and incubation time dependent, being the best result achieved for a 48 hours interval using a 40µl volume. White Shell quail embryonated eggs were also used to test its viability for primary cultures of fibroblasts and it was verified that they remain viable after four passages *in vitro*. This biological model demonstrated efficient for virus replication of Newcastle Disease, Fowl Pox, infectious bronchitis chickens and for equine influenza virus. These embryos also proved suitable for use in primary fibroblasts culture.

Key-words: allantoic; chorioallantoic membrane; embryonated egg; quail

Lista de Figuras

Figura 1	Titulação do vírus de Newcastle da linhagem NISSEI inoculados em ovos embrionados de codorna de acordo com o tempo de coleta.....	23
Figura 2	Titulação do vírus de Newcastle da linhagem NISSEI inoculados em ovos embrionados de codorna de acordo com o tempo de coleta.....	24
Figura 3	MCA de embrião de codorna da linhagem NISSEI fixada em formaldeído 10%, inoculada com APV.....	25
Figura 4	MCA de embrião de codorna da linhagem NISSEI corada com hematoxilina eosina, observada em microscópio óptico.....	25
Figura 5	Embrião de codorna apresentando lesões de nanismo e enrolamento causados pelo vírus da Bronquite Infecciosa das Galinhas (A) e controle (B).....	26
Figura 6	Titulação do vírus da influenza equina em ovos embrionados de codorna da linhagem NISSEI de acordo com o tempo de coleta.....	27
Figura 7	Titulação do vírus da influenza equina de acordo com os volumes coletadas em líquido alantóide de ovos embrionados de codorna da linhagem NISSEI.....	27
Figura 8	Cultivo de fibroblasto de embrião de codorna de casca branca.....	28

Lista de Abreviaturas e Siglas

APV	Avipoxvírus.
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EIV	Vírus da influenza equina.
IBV	Vírus da bronquite Infecciosa das Galinhas
MAPA	Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento
MCA	Membrana corioalantoíde
ND	Doença de Newcastle.
NDV	Vírus da Doença de Newcastle.
OIE	Organização Internacional Epizzotias.
RNA	Ácido ribonucleíco.
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais.
VBI	Vírus da Bronquite Infecciosa das Galinhas.
VDN	Vírus da Doença de Newcastle.

Sumário

1 Introdução.....	11
2 Artigo.....	17
3 Considerações Finais.....	33
Referências.....	34

1 Introdução

Originárias do norte da África, da Europa e da Ásia as codornas são aves pertencentes à família dos Fasianídeos (*Fasianidae*) e da subfamília dos *Perdicionidae*, sendo então, da mesma família das galinhas e perdizes (PINTO et al., 2002). Os primeiros relatos obtidos a respeito dessa ave datam do século XII, onde se registra sua domesticação, pelos chineses e coreanos, em função do seu canto. Mais recentemente, durante a primeira década do século XX, os japoneses iniciaram estudos voltados ao cruzamento entre as codornas procedentes da Europa e espécies selvagens originando um tipo domesticado que se denominou *Coturnix coturnix japonica* ou codorna doméstica. A partir de então se iniciou sua exploração visando sua produção de carne e ovos (REIS, 1980).

Atribui-se a introdução da codorna doméstica no Brasil ao Italiano Oscar Molena em 1959, que já criava, como “hobby”, codornas em seu país de origem. A exploração comercial de codorna em nosso país teve seu início em 1989 quando uma grande empresa avícola resolveu implantar o primeiro criatório no Sul do Brasil. Atualmente grandes criações automatizadas que contam com novas técnicas de produção juntamente com novas formas de comercialização do ovo e da carne, identificam o Brasil como um grande produtor dessas aves (Silva et al., 2011).

Ovos embrionados de galinha foram introduzidos na bateria de técnicas virológicas em 1940 e rapidamente se tornaram um dos fatores principais no progresso sucedido. Apresentam vantagens consideráveis sobre os sistemas animais usados até então (coelhos, cobaios e camundongos): um meio vivo altamente sensível a vários vírus; sistema fechado, teoricamente estéril e que podem ser obtidos e manipulados em grandes quantidades. A inoculação *in ovo* pode ser feita por diferentes vias que correspondem às sensibilidades e aos diferentes graus de adaptação de vários vírus (MANUGUERRA et al., 1999)

Uma das rotas de inoculação mais utilizadas é a via alantóica, sendo aplicada na produção de vírus necessária no preparo de antígenos para ensaios sorológicos, vacinas e cultivo de espécimes clínicos (LENNETE et al., 1995). Atualmente mesmo com modernas técnicas virológicas de diagnóstico, o uso dos ovos embrionados é considerado padrão ouro de doenças de grande impacto na avicultura como doença de Newcastle e Influenza Aviária (MELLO, 2010).

A coturnicultura é uma das áreas do setor avícola que tem demonstrado um desenvolvimento acentuado e com adequações em novas tecnologias, passando de uma atividade de subsistência para um setor considerado promissor aos seus investidores (PASTORE et al., 2012). Esta atividade desperta interesse de produtores pelo rápido retorno econômico e pela possibilidade de exploração como produção de ovos, carne e de codornas de um dia de idade.

As codornas comumente utilizadas para produção de ovos são da espécie *Coturnix coturnix japônica* e para produção de carne são da espécie Bob White e também a codorna europeia *Coturnix coturnix coturnix*. As vantagens da criação de codornas são muitas como sua rusticidade, rápido crescimento, baixo consumo alimentar e uma alta produtividade (PETROLLI, T.G. et al., 2011).

Em laboratório os ovos embrionados de codornas podem ser usados para inoculação de diversos tipos de vírus, em diferentes vias, sendo necessárias algumas modificações nas técnicas conhecidas e utilizadas em ovos embrionados de galinha (*Gallus domesticus*) (RAUSCHER et al., 1962).

Algumas vantagens podem ser atribuídas no emprego dos ovos embrionados de codorna em comparação aos de galinha para fins laboratoriais: custo menor de produção, menor tempo de incubação, necessidade de menor espaço físico e, talvez a mais importante, ser de uma espécie diferente do *Gallus domesticus* e não portadora de antígenos e anticorpos de interesse na avicultura comercial moderna, não interferindo no diagnóstico e na replicação viral.

Ovos embrionados de codorna podem ser utilizados para inoculação de vírus de interesse veterinário, como os que acometem as aves: vírus da doença de Newcastle, vírus da varíola aviária (*Avipoxvírus*) e vírus da bronquite infecciosa das Galinhas e também em outras espécies como Vírus da influenza equina.

O vírus da doença de Newcastle aviário, pertencente à família *Paramyxoviridae*, é um vírus envelopado constituído por uma molécula de RNA linear de fita simples com polaridade negativa, considerado de grande relevância na Medicina Veterinária tanto pela sua alta prevalência como pelo seu impacto econômico (MAYO, 2002).

A doença de Newcastle (ND) é altamente contagiosa, acomete aves comerciais entre outras espécies aviárias como as codornas apresentando sinais respiratórios frequentemente acompanhados de manifestações nervosas, diarreia e edema da cabeça (ARNS et. al., 2007).

As manifestações clínicas apresentadas na ave devidas a esse vírus podem variar de acordo com a virulência sendo classificadas em velogênicas, mais severa e está associada à alta mortalidade, que se divide em neurotrópica (sinais respiratórios e neurológicos) e viscerotrópica (lesões hemorrágicas no intestino), mesogênica (sinais respiratórios e ocasionalmente neurológicos) e lentogênica (infecções subclínica ou sinais respiratórios moderados). As amostras lentogênicas são empregadas na formulação vacinal; La Sota (LS), Uls- ter (UL) e VG-GA (VG) usadas no Brasil (ARNS et al., 2007).

Na realização do diagnóstico do (NDV) são usados ovos embrionados de galinha com 9 a 11 dias de incubação e como via de inoculação a cavidade alantóide. Após o período de incubação é coletado o líquido alantóide para a realização do teste da hemaglutinação (HI) (OIE, 2008).

A NDV está presente na lista das enfermidades infecciosas do “Office International of Epizooties - OIE (2015)”. Apresenta destaque no Plano Nacional de Sanidade Avícola - PNSA sendo considerado um dos problemas mais importantes do plantel avícola brasileiro. O surgimento de um surto dessa doença causaria perdas econômicas no país tornando-se um obstáculo para exportações de produtos avícolas para outros mercados consumidores (ALEXANDER 2001a, 2004b PAULILLO et al., 2000;).

Outro agente de importância em Medicina Veterinária é o *Poxvírus* aviário (AVP), causador da varíola aviária, pertencente à família *Poxviridae*, é um vírus envelopado constituído por uma molécula de DNA de cadeia dupla (GUBSER et al., 2004; JARMIN et al., 2006).

A varíola aviária é altamente contagiosa, acomete diferentes espécies de aves e se apresenta sob duas formas principais: cutânea e diftérica ou ambas (CANAL, 2007; GUBSER et al., 2004; JARMIN et al., 2006; MANAROLLA, 2010).

Com esta enfermidade as manifestações clínicas podem ser percebidas como lesões que evoluem de vesículas à crostas, sendo as áreas desprovidas de penas as mais acometidas. A forma diftérica apresenta lesões na parte superior do trato respiratório e digestivo resultando em dispneias, inapetência, descarga nasal e ocular, caracterizadas por placas salientes de coloração amarelada. Essa doença pode causar significativas perdas econômicas associadas com a queda na produção de ovos, redução do crescimento e aumento da mortalidade (CANAL, 2007; MANAROLLA, 2010).

Para realização do diagnóstico do APV, as lesões cutâneas e diftéricas podem ser examinadas histologicamente onde apresentam inclusões citoplasmáticas. Para o isolamento viral são usados ovos embrionados de galinha de 9 a 12 dias de incubação como via de inoculação a membrana corio-alantóide. A inoculação do APV na MCA de embriões de galinha resulta em lesões proliferativas brancas e opacas, que podem ser focais ou difusas, denominadas de lesão pox providas pela resposta inflamatória resultante da invasão do vírus nas células epiteliais da membrana e posteriormente é realizada uma análise histopatológica das lesões (CANAL, 2007; MAHY; KANGRO, 1996;).

A infecção pelo vírus da bronquite infecciosa das galinhas (IBV) está presente em todos os países que possuem avicultura comercial ou doméstica, pertencente à família *Coronaviridae* e ao grupo III dos *Coronavírus*, um vírus envelopado constituído por uma molécula de RNA de fita simples sentido positivo, sendo as galinhas consideradas a principal e única espécie naturalmente susceptível ao vírus e que desenvolve a doença. As aves podem apresentar distúrbios respiratórios, reprodutivos e/ou renais, (LOVATO; DEZENGRINI, 2007).

O sinal clínico comumente apresentado pelas aves é através do sistema respiratório com os sinais de respiração ofegante associada com acúmulo de material caseoso na siringe, tosse, estertores, espirro e descarga nasal, são sinais comuns em aves jovens e nas aves com idade superior a seis semanas ocorrem sintomas semelhantes, porém, a descarga nasal é observada com menor frequência. Em aves de postura podem ser observados além dos sinais respiratórios uma possível queda de produção e de qualidade dos ovos apresentando características como casca mole, deformada ou com ausência de casca devido às lesões ocorridas no oviduto (LOVATO; DEZENGRINI, 2007).

O método de diagnóstico mais utilizado para o isolamento do vírus é a inoculação em ovos embrionados de galinha de 9 a 11 dias que após o período de incubação apresentam alterações no embrião como nanismo, enrolamento e congestão dos vasos sanguíneos (LOVATO; DEZENGRINI, 2007).

Dentre os vírus que também possibilitam a utilização da técnica de inoculação em ovos embrionados podemos encontrar o vírus da Influenza Equina (EIV), pertencente à família *Orthomyxoviridae*, é um vírus envelopado constituído por uma molécula de RNA de polaridade negativa e é considerada uma das mais importantes dessa espécie devido aos prejuízos econômicos causados, principalmente em animais de competição (FLORES et al., 2007).

A influenza equina é amplamente disseminada na população equina do Brasil, os animais acometidos podem apresentar hiperemia, edema, necrose, descamação e erosões focais no epitélio respiratório como também produção de um exsudato rico em proteínas nas vias aéreas e nos alvéolos (FLORES et al., 2007).

As manifestações clínicas podem variar de acordo com a dose e virulência da cepa viral, das condições ambientais e manejo, e das defesas do hospedeiro. O primeiro sinal clínico evidenciado é a hipertermia frequentemente acompanhada por letargia, fraqueza, anorexia, secreção nasal serosa e tosse seca. Além disso, os animais podem apresentar secreção lacrimal, aumento dos linfonodos da região da cabeça, edema dos membros, laminite e pneumonia (FLORES et al., 2007).

Na realização do diagnóstico do (EIV) são usados ovos embrionados SPF, de 9 a 11 dias, via cavidade alantoíde ou amniótica. Após o período de incubação o líquido corio-alantóide e ou amniótico é coletado para o teste de hemaglutinação e para a confirmação da etiologia e caracterização do vírus isolado é realizado a prova de HI com soro imune específico (FLORES et al., 2007; JAENISCH et al., 2009).

Os ovos embrionados possuem características de replicação de vírus e também podem ser utilizados para cultivo primário originado a partir do crescimento das células de um fragmento obtido por ação mecânica ou enzimática (ALVES; GUIMARÃES, 2014). Em laboratório, observa-se que as células aderem à garrafa de cultivo formando uma monocamada possuindo característica do tecido de origem, podendo crescer em cultura por um determinado período de tempo, sendo comumente utilizada para estudar o comportamento fenotípico e genotípico (ALVES; GUIMARÃES, 2014).

As células de cultivo primário, de maneira geral, são mais sensíveis para o isolamento viral do que a linhagem, porém, nos laboratórios comumente utiliza-se as linhagens celulares pela facilidade de manutenção e multiplicação considerada mais eficiente (FLORES, 2007).

O objetivo deste trabalho foi avaliar utilização de ovos embrionados de codorna de casca branca da linhagem NISSEI para a replicação do vírus da doença de Newcastle, vírus da varíola aviária, vírus da bronquite infecciosa das galinhas, vírus da influenza equina bem como o emprego dos embriões para cultivo primário de células mantidas em laboratório.

2 Artigo

Uso de embriões de codorna (*Coturnix coturnix japonica*) da linhagem NISSEI para a propagação de vírus e cultivo de células primárias

Raulene Rodrigues Lobo; Alice Meireles Leite; Geferson Fischer; Marcelo de Lima; Silvia de Oliveira Hubner; Roberto de Andrade Bordin; Elisa Simone Viégas Salles; Gilberto D'Avila Vargas

Será submetido à revista Science and Animal Health

USO DE EMBRIÕES DE CODORNA (*Coturnix coturnix japonica*) DA LINHAGEM NISSEI PARA A PROPAGAÇÃO DE VÍRUS E CULTIVO DE CÉLULAS PRÍMARIAS

LOBO, Raulene Rodrigues ¹;

LEITE, Alice Meirelles ¹;

FISCHER, Geferson ¹;

LIMA, Marcelo de ¹;

HÜBNER, Silvia de Oliveira ¹;

BORDIN, Roberto de Andrade ²;

SALLIS, Eliza Simone Viegas ³;

VARGAS, Gilberto D'Ávila ¹.

¹Laboratório de Virologia e Imunologia da Faculdade de Veterinária – UFPEL; ²Faculdade de Tecnologia – FATEC – Mogi das Cruzes – Centro Paula Souza; ³Laboratório Regional de Diagnóstico – UFPEL.

RESUMO

O presente trabalho visa avaliar o potencial de replicação *in vivo* dos vírus Newcastle, varíola aviária, bronquite infecciosa das galinhas e influenza equina em ovos embrionados de codorna (*Coturnix coturnix japonica*) da linhagem NISSEI. As vias de inoculação utilizadas foram cavidade alantoíde e membrana corio-alantóide. Foram coletados líquido alantoíde e membranas corioalantóides para o teste de HA e análise das lesões e realizado o embriodiagnóstico de acordo com os vírus analisados. Nos ovos inoculados com o vírus da doença de Newcastle foi coletado o líquido alantoíde para a realização do teste de HA, tendo como melhor resultado a incubação por 72 horas com o volume de 100µl. Na inoculação do vírus da varíola aviária foram coletadas as membranas corioalantóides para analisar as lesões pox e, posteriormente, para uma análise histopatológica, sendo que todos os volumes utilizados apresentaram lesões características desta enfermidade. Para o vírus da bronquite infecciosa das galinhas, de todos os volumes utilizados, somente o de 40µl apresentou lesões no embrião, como nanismo e enrolamento. A replicação do vírus da influenza equina, assim como aconteceu com o VDN, foi dependente do volume e do tempo de incubação sendo o melhor tempo com 48 horas utilizando o volume de 40µl. Os ovos embrionados de codornas de casca branca podem ser utilizados para o cultivo primário de fibroblastos, podendo permanecer viáveis após quatro passagens *in vitro*.

Palavras-chave: Codornas. Líquido alantóide. Membrana corioalantóide. Ovo embrionado.

INTRODUÇÃO

A coturnicultura é um setor avícola de grande expansão. Com adequações constantes e com novas tecnologias, as atividades que eram de subsistência passaram a ser um setor promissor aos seus investidores (PASTORE et al., 2012). Deste modo, é conveniente promover investigações de novas formas de uso dos ovos de codorna (*Coturnix Coturnix Japonica*) além dos atuais, ou seja, dar a esse produto novas perspectivas de utilização.

Algumas vantagens podem ser atribuídas a esse setor como o custo menor de produção, tempo de incubação reduzido e menor espaço físico necessário para sua criação. Uma área a ser explorada neste segmento avícola é a utilização de ovos embrionados para fins de pesquisa em virologia. Os ovos embrionados de codorna possuem características de replicação de vírus e também podem ser utilizados para cultivo primário originado a partir do crescimento celular de fragmentos obtidos por ação mecânica ou enzimática. No entanto, para o uso destes ovos em laboratório ocorre a necessidade de algumas modificações nas técnicas já conhecidas e usadas em ovos embrionados de galinha (*Gallus domesticus*) (RAUSCHER et al., 1962).

Uma das maiores dificuldades para utilização de ovos comuns de codorna para pesquisa é a coloração da casca os quais são pigmentados, o que dificulta a visualização do embrião no processo de ovoscopia, etapa imprescindível, pós-inoculação, para avaliar sua viabilidade do embrião (WOODARD et al., 1973). Ao usarem ovos comuns (pigmentados) para este fim, alguns autores tentaram facilitar a visualização do embrião durante a ovoscopia aplicando o método de raspagem ou uso de ácido na casca dos ovos, ocorrendo morte consideradas inespecíficas provavelmente estando relacionado a metodologia utilizada (HIGGINS, 1972; RAUSCHER et al., 1962).

Diante das dificuldades encontradas no processo de avaliação da viabilidade do uso de ovos comuns (pigmentados) de codorna e seu potencial de replicação de alguns vírus que acometem as aves (vírus da doença de Newcastle - NDV, poxvírus - APV e bronquite infecciosa das galinhas - IBV) e de outras espécies como o vírus da influenza equina - EIV, pelas vias de inoculação cavidade alantoíde e membrana corio-alantóide optamos por fazer uso dos ovos (*Coturnix coturnix japonica*) de casca branca da linhagem NISSEI bem como seu emprego para cultivo primário de células.

MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram desenvolvidos no Laboratório de Virologia e Imunologia, da Universidade Federal de Pelotas - UFPel, em colaboração com o Laboratório Regional de Diagnóstico, ambos da Faculdade de Veterinária da UFPel.

Com vistas a avaliar o potencial de replicação viral, 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%. Os experimentos foram submetidos a uma avaliação pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da UFPel (CEEA- 1964/UFPel) e aprovados para execução da pesquisa.

Vírus Newcastle

Inicialmente utilizou-se uma amostra vacinal liofilizada do vírus da doença de Newcastle (vírus LA-Sota) produzida em ovos embrionados de galinha cedida pelo laboratório Bio-Vet S/A, a qual foi reconstituída em 3 ml de meio essencial mínimo (MEM) estéril (pH 7.0). As inoculações foram feitas aos 7 dias de incubação com a cepa lentogênica do vírus da doença de Newcastle (NDV) pela cavidade corio-alantóide. Foram utilizados quatro volumes de vírus, (20, 40, 80 e 100µl/dose), três períodos de incubação (24, 48 e 72 horas) com seis repetições que totalizaram 72 ovos.

Após o processo de inoculação e incubação foram realizadas ovoscopias diárias para verificação de mortalidade embrionária. Em cada período da incubação coletou-se líquido alantóide e forma asséptica para posteriormente ser centrifugado a 2.500 rpm e armazenado em ultrafreezer a -70°C até o dia da realização da titulação viral, que foi realizada através do teste de Hemaglutinação (HA), conforme o descrito por Alexander (1989).

Vírus da varíola aviária

Foi feito uso também de uma amostra vacinal do *Avipoxvírus* - APV (amostra forte - vírus de pombo), produzida em ovos embrionados de galinha cedida pelo Laboratório Bio-Vet S/A. A amostra liofilizada foi reconstituída em 1 ml de diluente da vacina e as inoculações feitas aos 7 dias de incubação pela via da membrana corioalantoíde. Foram feitas duas diluições distintas (1:100 e 1:1000) de acordo com o descrito em VILELA (2010) e uma solução “mãe”. Nas diluições foram usadas quatro volumes para cada proporção (20, 40, 80 e 100µl/dose) e coleta das membranas corioalantóides feitas com 5 e 7 dias após inoculação viral. Para esta finalidade foram utilizados 6 repetições por tratamento e a avaliação da capacidade de replicação viral foi determinada macroscopicamente através da observação das lesões pox nas membranas que apresentaram de 1 a 3 lesões por membrana.

Na análise histopatológica das membranas corioalantóides (MCAs) foi utilizado um micrótomo para obter cortes com 5 µm de espessura dispostas em lâminas de vidro e corados com a técnica de hematoxilina e eosina, foram analisados também a hiperplasia epitelial, degeneração vacuolar, corpúsculos de inclusão, inflamação e congestão/edema nas MCAs de acordo com o descrito por ALLEN (1994).

Vírus da bronquite infecciosa das galinhas (VBI)

A amostra do VBI foi cedida pelo Centro Nacional de Pesquisa em Suínos e Aves (CNPISA) da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa) de Concórdia – SC. As inoculações ocorreram no oitavo dia de incubação pela cavidade corio-alantóide. Foram utilizados quatro volumes de vírus (20, 40, 80 e 100µl/dose) em dois períodos de incubação (5 e 7 dias) com seis repetições em um total de 64 ovos. A ovoscopia diária foi aplicada para verificar mortalidade embrionária e em cada período da incubação ocorreu a coleta dos embriões para avaliação macroscópica das possíveis lesões como nanismo, enrolamento e congestão dos vasos sanguíneos.

Vírus da influenza equina

A amostra do vírus EIV foi cedida pela Universidade Federal de Santa Maria, Setor de Virologia - SV. Na primeira passagem foi realizada a inoculação em 6 embriões com 7 dias de incubação utilizando a cavidade alantóide em um volume de 100µl/dose e, 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 µl/dose com dois períodos de coletas (24 e 48 horas) e com seis repetições, a titulação viral foi realizada através do teste Hemaglutinação (HA) de acordo com o descrito por Alexander (1989).

Cultivo primário

Os cultivos primários dos fibroblastos de embrião de codorna foram feitos segundo Mayr e Guerrero (1988) com adaptações. Os embriões de 2 e 3 ovos com 7 e 9 dias de incubação foram processados, sendo retiradas deles as patas, cabeças, asas e vísceras. O restante foi triturado com auxílio de um tamis de 100µm e a suspensão de células centrifugadas durante 10 minutos a 1500 rpm. O sedimento foi ressuspenso em meio de Eagle (Sigma-Aldrich – St. Louis, EUA.) com 10% de SFB. Para a contagem das células foi utilizado o corante pós-vital azul de Tripán (0,4%) e contadas às células vivas, não coradas em câmara de Fuchs-Rosenthal. Os fibroblastos foram contados e distribuídos em duas garrafas de 25 cm² com 10 ml de meio com a concentração de 5x10⁶ e 3,6x10⁶ células/ml. O cultivo de fibroblastos foi incubado por 24 horas a 37 °C e após este período foram trocados os meios e realizado a tripsinização como o utilizado em linhagens de células.

ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para os vírus titulados, foi aplicada uma análise de variância através do procedimento General Linear Models, do pacote estatístico Statistix 9.0, na procura de verificar, estatisticamente, as diferenças entre os tratamentos. As variáveis que apresentaram diferenças estatísticas ao teste (F) foram submetidas ao teste LSD.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A utilização de ovos embrionados de codorna para replicação viral já foi descrita pelos autores Higgins (1972) e Rauscher et al., (1962), que relataram dificuldade principalmente para realização da ovoscopia devido a coloração da casca (pigmentação). Neste experimento com ovos de casca branca (*Coturnix coturnix japonica*) da linhagem NISSEI essas dificuldades não foram encontradas, pois os ovos não pigmentados proporcionaram facilidade na visualização das estruturas embrionárias permitindo, desta forma, a execução de uma correta, e mais precisa, ovoscopia diária.

Quando utilizado o vírus da doença de Newcastle, os resultados demonstrados foram dependentes do tempo de incubação e do volume utilizada. O melhor tempo de incubação foi de 72 horas, sendo superior ao controle de vírus (zero hora), 24 e 48 horas proporcionando títulos virais mais elevados ($P < 0,0001$) (figura 1). Schiavo et. al., (2001), na produção de antígeno viral de Newcastle com ovos embrionados de galinha verificaram que o melhor momento para a coleta de líquido alantóide foi às 96 horas pós-inoculação. Segundo Lennete (1995) os vírus quando inoculados na cavidade alantóica se propagam nas células endodérmicas da membrana alantóide com subsequente liberação de vírus no fluido alantóico. Portanto, tanto a membrana quanto o fluido alantóico podem ser usados como fontes de vírus. O protocolo oficial da “Office International de Epizooties - OIE” (2008) preconiza a faixa de tempo de incubação pós-inoculação viral com embriões de galinha de 96 até 168 horas.

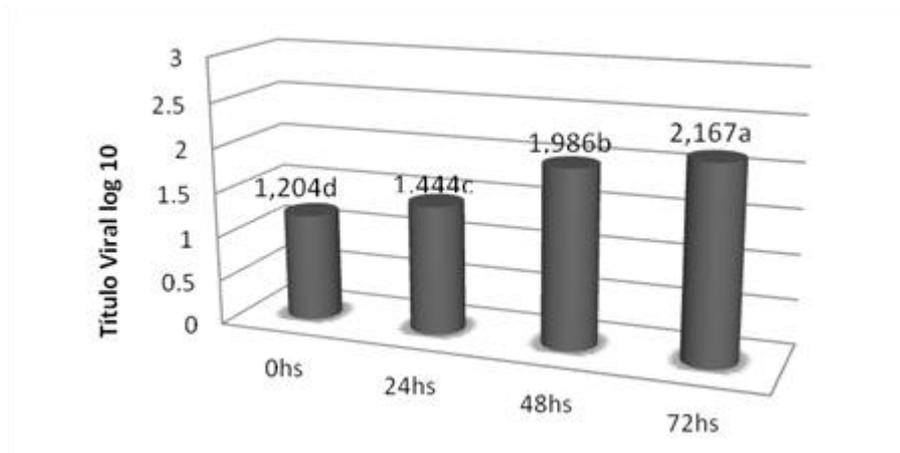


Figura 1 - Titulação do vírus de Newcastle da linhagem NISSEI inoculados em ovos embrionados de codorna de acordo com o tempo de coleta.

Com relação aos volumes dos vírus utilizados, os volumes de 20 e 40 μl /dose não diferiram entre si, mas promoveram um aumento nos títulos virais sendo superiores ao controle ($P < 0,0001$). Com os volumes de 80 e 100 μl /dose houve aumentos ainda maiores dos títulos virais, sendo a concentração de 100 μl /dose estatisticamente superior a todos os volumes utilizados neste experimento ($P < 0,0001$) (figura 2). Esta concentração já foi utilizada por outros autores proporcionando também elevação na titulação, porém com ovos embrionados de galinha, sendo com volume de 100 μl /dose (SCHIAVO et al., 2001; NUNES 2011).

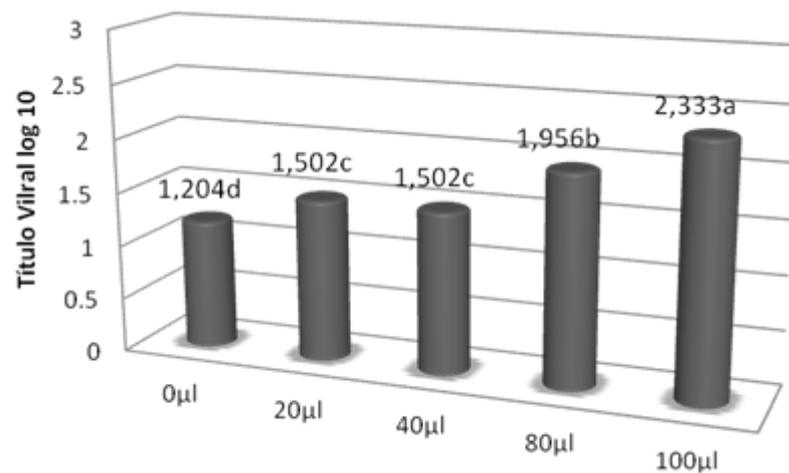


FIGURA 1 - TITULAÇÃO DO VÍRUS DE NEWCASTLE DA LINHAGEM NISSEI INOCULADOS EM OVOS EMBRIONADOS DE CODORNA DE ACORDO COM OS VOLUMES DAS COLETAS EM LÍQUIDO ALANTÓIDE DE OVOS EMBRIONADOS DE CODORNA.

Segundo Mahy e Kangro (1996), quando inoculado na membrana corioalantóide (MCA) de ovos embrionados de galinha, o *avipoxvirus* (APV) causa uma lesão de coloração esbranquiçada denominada lesão pox, que é, essencialmente, uma área de resposta inflamatória decorrente da invasão do vírus nas células epiteliais da membrana. Na abertura dos ovos embrionados com o vírus da varíola aviária de 5 e 7 dias pós-inoculação, foram observadas lesões macroscópicas tipo pox (MCA) em todas os volumes de vírus (20, 40, 80 e 100 μl /dose) e diluições utilizadas com (1:100 e 1:1000) e a solução “mãe”. Porém, a melhor visualização e identificação das lesões macroscópicas se deu com 7 dias (figura 3) sendo encontradas, em média, 3 lesões por membrana.



FIGURA 2 - MCA DE EMBRIÃO DE CODORNA DA LINHAGEM NISSEI FIXADA EM FORMALDEÍDO 10%, INOCULADA COM APV.

No exame histopatológico foram identificadas lesões na MCA como hiperplasia de células epiteliais com degeneração hidrópica, necrose e presença de corpúsculo de inclusão viral eosinofílico no citoplasma de células epiteliais. No mesoderma havia infiltrado inflamatório difuso e acentuado constituído de heterófilos e alguns linfócitos. Também se observou congestão e heterófilos na luz dos vasos sanguíneos. O diagnóstico definitivo desta enfermidade pode ser estabelecido a partir da presença de grandes corpúsculos de inclusão intra-citoplasmáticos eosinofílicos (Corpúsculo de Bollinger) (Figura 4) nas células epiteliais, referido como sinal patognomônico (BACK et al., 1995; MOHAN e FERNANDES, 2008; TAGELDIN et al., 2006). Estes dados corroboram com os dados obtidos, Vilela (2010), que apresentaram lesões histopatológicas similares diferenciando o tempo de incubação e período das coletas das MCA de embriões de galinha.

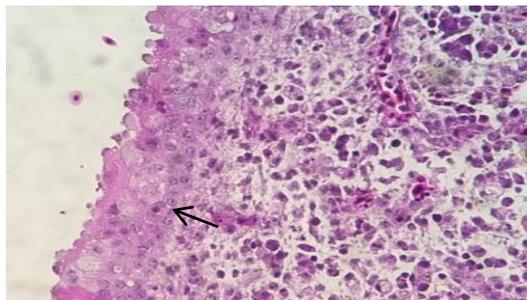


Figura 4 - MCA de embrião de codorna da linhagem NISSEI corada com hematoxilina eosina, observada em microscópio óptico.

* Seta na figura indica corpúsculos de inclusão intracitoplasmáticos eosinofílicos de células epiteliais do mesoderma.

Para o vírus da bronquite infecciosa das galinhas, dos 4 volumes de vírus utilizados (20, 40, 80 e 100µl/dose), somente com 40µl/dose puderam ser observadas as lesões de nanismo e enrolamento (figura 5). Estas lesões foram encontradas nos embriões submetidos ao período final de sete dias de incubação pós-inoculação viral. No volume de 20µl/dose não foi possível

observar estas lesões e nos volumes de 80 e 100 μ l/dose houve mortalidade embrionária em todos os períodos de incubação utilizados.

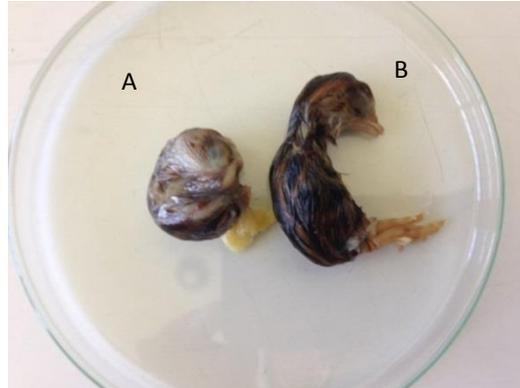


Figura 5 - Embrião de codorna apresentando lesões de nanismo e enrolamento causados pelo vírus da Bronquite Infecciosa das Galinhas (A) e controle (B).

De acordo com o descrito por Raj et al., (2004) pode haver a necessidade de três ou mais passagens para ocorrer as lesões sendo que alguns isolados de campo VBI não induzem lesões embrionárias específicas durante várias passagens. Para Lovato e Dezengrini (2007), encontraram-se as mesmas lesões nos embriões, porém, considera-se necessário para a visualização das lesões de três a quatro passagens da amostra de campo.

Cabe salientar que neste estudo houve apenas uma passagem do vírus em ovo embrionado de codorna, desta forma acredita-se que com mais passagens às lesões poderiam ocorrer em maior número. De acordo com a portaria 186/1997 do MAPA (Porto, 1997), que trata das normas para a produção, controle e emprego de vacinas contra a bronquite infecciosa, os embriões de galinha são examinados do 5º ao 7º dia após inoculação considerando-se positivos aqueles que evidenciarem lesões típicas VBI.

A replicação do vírus influenza equina, assim como aconteceu com o VDN, foi dependente da concentração e o tempo de incubação. O melhor tempo de incubação foi com 48 horas, sendo superior aos demais ($P=0$). Às 24 horas de incubação não houve aumento nos títulos virais não ocorrendo diferença para o título inicial do vírus utilizado (figura 6). Algumas fontes como Oliveira et al., (2005) e manuais técnicos (OIE, 2012) relatam que o tempo indicado para coleta do líquido alantoide deva ser de 72 horas quando são utilizados embriões de galinha para este fim, porém, neste experimento, com o período de 48 horas

pós-inoculação, foi verificado através de ovoscopia que os embriões de codorna já estavam mortos, sendo neste momento coletadas as amostras para titulação.

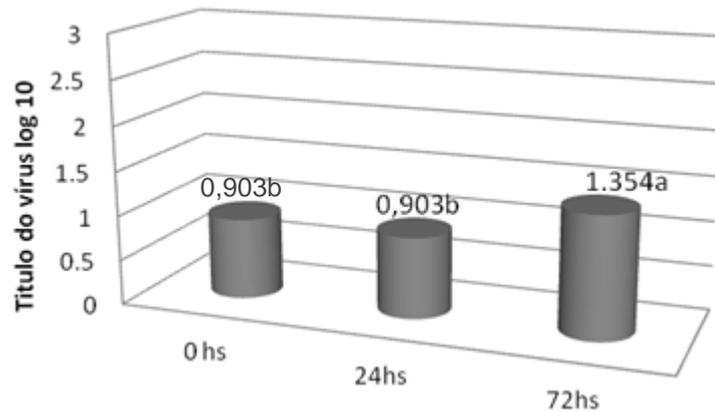


FIGURA 3 - TITULAÇÃO DO VÍRUS DA INFLUENZA EQUINA EM OVOS EMBRIONADOS DE CODORNA DA LINHAGEM NISSEI DE ACORDO COM O TEMPO DE COLETA.

Levando-se em conta o volume de vírus utilizado neste experimento, o volume que proporcionou os títulos virais mais elevados foi o de 40µl/dose com (figura 7). Da mesma forma tanto os volumes de 20µl/dose quanto os de 100µl/dose foram superiores ao título inicial do vírus Normalmente quando se trabalha com embriões de galinha o volume de vírus utilizado é de 100µl/dose (MÜLLER, et al., 2008).

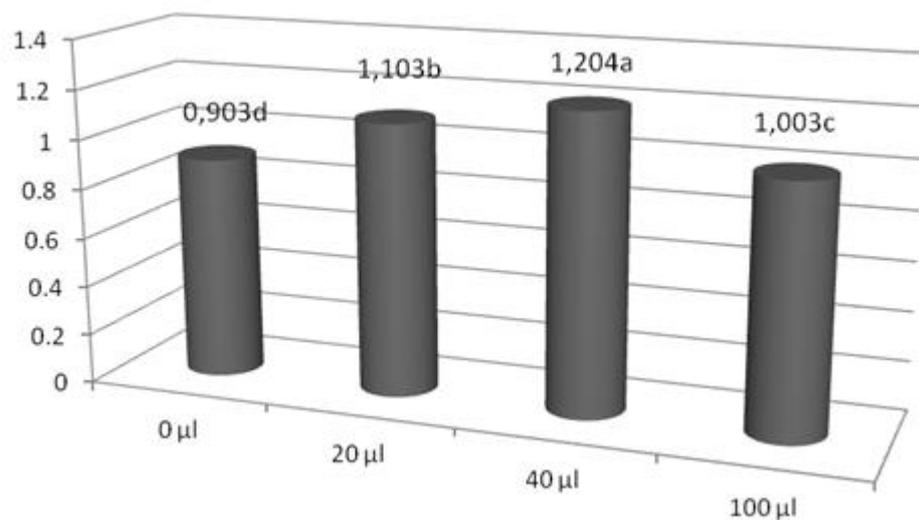


Figura 7 - Titulação do vírus da influenza equina de acordo com os volumes coletados em líquido alantóide de ovos embrionados de codorna da linhagem NISSEI.

Alguns micro organismos necessitam de fibroblastos de embrião de galinha para a sua propagação in vitro (SOUZA et al., 2006). Raros são os trabalhos que utilizam embriões de codornas para esta finalidade. A técnica de cultivo primário de ovos embrionados utilizados nesse experimento foi similar ao descrito por LADEIRA et al., (2008) diferindo na forma de obtenção das células que ao invés de enzimática com tripsina foi realizado de forma mecânica com o uso de um tamis. Em nosso trabalho, embora não haja um padrão pré-estabelecido para o cultivo primário de embrião de codorna, foram realizadas adequações na técnica utilizada para o cultivo primário de embriões de galinha. Num primeiro experimento com dois ovos embrionados de codorna com 7 dias de incubação foram obtidas $3,8 \times 10^6$ células, já num segundo momento com três embriões foram obtidas 5×10^6 células. Já no trabalho de Ladeira et al. (2008), com 5 ovos embrionados de galinha, foram obtidos $3,6 \times 10^6$ células, desta forma, mostrando-se muito semelhante em número de células viáveis, quando são utilizados tanto embriões de galinha quanto de codorna. Salienta-se que este cultivo primário de fibroblastos de embrião de codorna mostrou-se viável durante quatro passagens (figura 8) sendo que é descrito na literatura para cultivos primários uma capacidade de multiplicação de 3 a 20 passagens in vitro (UFMG).

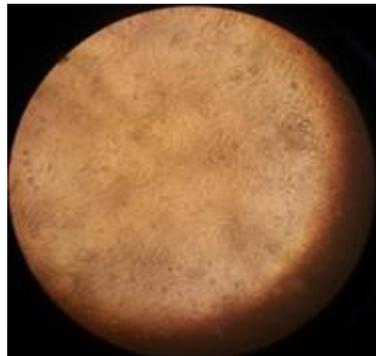


FIGURA 4 - CULTIVO DE FIBROBLASTO DE EMBRIÃO DE CODORNA DE CASCA BRANCA.

CONCLUSÃO

Neste estudo, os ovos embrionados de codorna foram eficientes para replicação do vírus da doença de Newcastle, vírus da varíola aviária, vírus da bronquite infecciosa das galinhas e vírus da influenza equina. Estes embriões se mostraram aptos também para serem utilizados em cultivo primário de fibroblastos

**USE OF EMBRYONATED EGGS OF QUAILS (*Coturnix coturnix japonica*)
FROM NISSEI LINEAGE TO PROPAGATION OF VIRUSES AND PRIMARY CELL
CULTURE**

ABSTRACT

The present work aims to evaluate the potential for replication *in vivo* of Newcastle virus, fowlpox, avian infectious bronchitis of chickens and equine influenza virus in embryonated eggs of quail (*Coturnix coturnix japonica*) of the NISSEI lineage. The routes of inoculation used were allantois and chorioallantoic membrane. Allantoic liquid and chorion membranes were collected for HA test, observing the injury and performing embryo diagnostic according to the viruses analyzed. In inoculated eggs with Newcastle disease virus it was collected the allantoic liquid to perform the test of HA, with a best result of incubation for 72 hours with the volume of 100 μ l. In inoculation of fowlpox virus, samples collected were chorion membranes to analyze pox lesions and, subsequently, to a histopathological analysis, being that all volumes used showed characteristic lesions of this illness. For infectious bronchitis virus of chickens, among all volumes used, only the 40 μ l presented lesions in the embryo, such as dwarfism and winding. The equine influenza virus replication, as happened with the VDN, was dependent on the volume and the incubation time, being the best time with 48 hours using the volume of 40 μ l. Embryonated eggs quail white bark can be used for the primary fibroblasts cell culture, and may remain viable after four *in vitro* passages.

Keywords: Chorioallantoic membrane. Allantoic fluid. Quail. Embryonated egg.

**USO DE EMBRIONES DE CODORNIZ (*Coturnix coturnix japonica*) LINAJE
NISSEI PARA LA PROPAGACIÓN DE VIRUS Y CULTURA CELULAR PRIMARIA**

RESUMEN

Este estudio tiene como objetivo evaluar El potencial de replicación *in vivo* de los virus de Newcastle, de la viruela aviaria, de la bronquitis infecciosa de las gallinas y de la gripe equina en huevos embrionados de codorniz (*Coturnix coturnix japonica*) de la lineage Nissei. La cavidad alantoides y la membrana corioalantoidea fueran utilizadas como rutas de inoculación de los virus. Los fluidos alantoides y las membranas corioalantoideas fueron recogidas para la realización del teste de HA y análisis de las lesiones en los embriones de acuerdo con los virus estudiados. En huevos inoculados con el virus de Newcastle se recogieron fluidos alantoides para la realización de la prueba de HA donde el mejor resultado se obtuvo con la incubación fluidos alantoides y las membranas corioalantoideas recogidas para la realización del teste de HA

análisis de las lesiones en los embriones de acuerdo con los virus estudiados. En huevos inoculados con el virus de Newcastle se recogieron fluidos alantoideos para la realización de la prueba de HA donde el mejor resultado se obtuvo con la incubación durante 72 horas con el volumen de 100 μ l. En la inoculación de la viruela aviar se recogieron las membranas corioalantoideas para analizar las lesiones del virus y, posteriormente, para el análisis histopatológico donde todos los volúmenes utilizados mostraron lesiones características de esta enfermedad. Para el virus de la bronquitis infecciosa, de todos los volúmenes utilizados, solo los huevos inoculados con 40 μ l tenían lesiones como enanismo y sinuoso en el embrión. La replicación del virus de la gripe equina, así como con el VDN fue dependiente del volumen y el tiempo de incubación siendo el mejor tiempo con 48 horas utilizando el volumen de 40 μ l. Incluso se observó que los huevos embrionados de codornices línea NISSEI pueden ser utilizados para el cultivo primario de fibroblastos que pueden permanecer viables in vitro por cuatro pasajes.

Palabras clave: Codorniz. Alantoides. Membrana corioalantoidea. Huevos embrionados.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes), pelo suporte financeiro; à Granja Fujikura, pelo fornecimento dos ovos e ao Laboratório Bio-Vet S/A – Vargem Grande Paulista, SP – Brasil, pelo fornecimento da vacina comercial.

REFERÊNCIAS

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

ALLEN, T. C. Hematoxilin and eosin. In: Prophet, E. B.; MILLS, B.; ARRINGTON, J. B.; SOBIN, L. H. **Laboratory Methods in Histotechnology**– Armed Forces Institute of Pathology. p. 53-57, 1994.

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.

HIGGINS, D. A. Growth of Newcastle Disease Virus In: Fertile eggs of the Japanese quail (*Coturnix coturnix japonica*). **Journal of Comparative Pathology**, v. 82, p. 87-91, 1972.

LADEIRA, S.; GOMES, F. R.; VIDOR, T.; PORTIANSKI, E. L.; GIMENO, E. J. Efeito da *Mannheimia granulomatis* sobre cultivo de fibroblastos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 60, n. 2, 2008.

LENNETE, E. H.; LENNETE, D. A.; LENNETE, E. T. Diagnostic Procedures for Viral, Rickettsial, and Chlamydial Infections. **American Public Health Association**. 7 ed. 1995.p. 22,

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

MAHY, B. W. J.; KANGRO, H. O. **Virology Methods Manual**. London, Academic Press. p. 374, 1996.

MAYR, A.; GUERREIRO, M. G. **Virologia Veterinária**. 3. ed. Porto Alegre: Sulina, 1988. 476p.

MOHAN, M.; FERNANDEZ, T. F. A case report of Pigeon Pox -Histopathologic Diagnosis. **Veterinary World**, v. 1, p. 117-118, 2008.

MULLER, I.; PINTO, E.; SANTIBANEZ, M. C.; CELEDON, M. O.; VALENZUELA, P. D. Isolation and characterization of the equine influenza virus causing the 2006 outbreak in Chile. **Veterinary Microbiology**, v. 137, p. 172–177, 2009.

NUNES, C. F. **Atividade virucida de um extrato etanólico de própolis verde in vitro e in vivo**. Pelotas: UFPEL, 2011. 81f. Dissertação (Mestrado em Veterinária), Faculdade de Veterinária Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2011.

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. Acesso em 20 dez. 2014.

OIE (Office International de Epizooties). Equine influenza, 2012. Disponível em < http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.05.07_EQ_INF.pdf> Acesso em 20 dez. 2014.

OLIVEIRA, G. S.; SCHIAVO, P. A.; MAZUR, C.; ANDRADE, C. M. Prevalência de anticorpos para o vírus da Influenza Equina, subtipo H3N8, em equídeos apreendidos no Estado do Rio de Janeiro. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 35, n. 5, p. 1213-1215, 2005.

PASTORE, S. M.; OLIVEIRA, W. P.; MUNIZ, J. C. L. **Panorama da coturnicultura no Brasil Artigo180**, v. 9, n. 06, p. 2041–2049, 2012.

PORTO, A. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Portaria nº.186, de 13 de maio de 1997. **Lex**: Regulamento técnico para a produção, o controle e o emprego de vacinas, antígenos e diluentes para avicultura, 13 mai. 1997.

RAJ, G. D.; RATNAPRABA, S.; MATHESWARAN, K.; NACHIMUTHU, K. Egg: embryo weight ratio as an indicator of dwarfism induced by infections bronchitis virus. **Avian Pathology**, v. 33, n. 3, p. 307-309, 2004.

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.

SCHIAVO, P. A.; OLIVEIRA, G. ANDRADE S.; PORTZ, C.; OLIVEIRA, J. G. J.; LOUREIRO, B. O.; MAZUR, C.; MORAES C. Cinética da produção de antígeno viral em ovos embrionados a partir de amostras patogênicas e apatogênicas do Vírus da Doença de Newcastle, 11, 2001. **Anais: XI Jornada de Iniciação Científica da UFRRJ**, 2001. p. 165-168,

SOUZA, L. L. A.; RODENBUSCH, C. R.; MARKS, F. S.; CANAL, C. W. Avaliação de protocolos de descongelamento de cultivo celular primário *in vitro* de fibroblasto de embrião de galinha. Salão de Iniciação Científica, 18. **Livro de Resumos**. UFRGS, Porto Alegre, 2006.

TAGELDIN, M.H.; JOHNSON, E.H.; AL-AMRI, I.S.; ALI AISHA, A. Cutaneous tumor-like lesions associated with poxvirus infection in laughing doves. **Journal of Avian Medicine and Surgery**, v. 20, p. 94-96, 2006.

UFMG. Cultura de Células Departamento de Microbiologia. Instituto de Ciências Biológicas Universidade Federal de Minas Gerais. Disponível em: <http://icb.ufmg.info/mic/diaadia/wp-content/uploads/2012/10/Cultura-de-c%C3%A9lulas.pdf> . Acesso em 25 Nov. 2014.

VILELA, C. O. **Atividade antimicrobiana de extrato etanólico de própolis verde**. Pelotas:UFPEL, 2010. 100f. Dissertação (Mestrado em Veterinária), Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, 2010.

WOODARD, A. E.; ABPLANALP, H.; WILSON, W. O.; VOHRA, P. Japanese Quail Husbandry in the Laboratory. **Department of Avian Sciences/University of California, Davis**, p. 1-22, 1973.

Autor para correspondência:

Raulene Rodrigues Lobo – Mestranda do Programa de Pós-Graduação em Veterinária da Faculdade de Veterinária – UFPEL.

Laboratório de Virologia e Imunologia/Favet/UFPEL, Campus Universitário, Capão do Leão (RS). CEP 96010-900. raulenelobo@gmail.com

3 Considerações Finais

Neste estudo, os ovos embrionados de codorna foram eficientes para replicação do vírus da doença de Newcastle, vírus da varíola aviária, vírus da bronquite infecciosa das galinhas e vírus da influenza equina. Estes embriões se mostraram aptos também para serem utilizados em cultivo primário de fibroblastos.

Referências

ALEXANDER, D.J. Newcastle Disease. **British Poultry Science**, v.42, p.5 - 22, 2001a.

ALEXANDER, D.J., BELL J.G., ALDERS, R.G. **Technology Review**: Newcastle Disease. Roma, FAO.p1-6, 2004b.

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

ALLEN, T.C. Hematoxilin and eosin. In: PROPHET, E.B.; MILLS, B.; ARRINGTON, J.B.; SOBIN, L.H. Ed. **Laboratory Methods in Histotechnology – Armed Forces Institute of Pathology**. Washington: American Registry of Pathology, 1994. p.53-57.

ALVES, E. A.;GUIMARAES, A. C. R. **Cultivo celular**. Disponível em: <http://www.epsjv.fiocruz.br/upload/d/capitulo_5_vol2.pdf> Acesso em: 24 Jul. 2014.

ARNS, C. W.; SPILKI, F. R.; ALMEIDA, R. S. PARAMYXOVIRIDAE, in: FLORES E., **Virologia Veterinária**. Ed. Santa Maria: UFSM, 2007.p. 659-686,

BACK A., SONCINI RA, RUTHES O, MADUREIRA JS, FLORES R. An atypical fowl pox outbreak in broilers in Southern Brazil. **Avian Diseases**, v. 39, p. 902-906,1995. FLORES, E.F.;LOVATO, L. T.; SILVA, M.S.,DEZENGRINI, R., DIEL, D. G.

ORTHOMYXOVIRIDAE in: FLORES E.,**Virologia Veterinária**. Ed.Santa Maria:UFSM. .p. 735 e 738.

GUBSER, C.;HUÉ, S. KELLAM,;P.; SMITH, G. L. Poxvirus genomes: a phylogenetic analysis. **Journal of General Virology**, v. 85, p.105 - 117, 2004.

HIGGINS, D. A. Growth of Newcastle Disease Virus In Fertile eggs of the Japanese quail (*Coturnix coturnix japonica*). **Journal of Comparative Pathology**. v.82, p.87-91, 1972.

JAENISCH, F.R.; TREVISOL, I. M; SILVA;J.C.R.;VIEIRA, M. S;OLIVEIRA, P. A. V. **Influenza a gripe no meio rural: Manual do extensionista**. Brasília: EMBRAPA Informação Tecnológica.2009p. 46,.

JARMIN, S.; MANVELL, R.; GOUGH, R. E.; LAIDLAW, S.M.; SKINNER, M. A. Avipoxvirus phylogenetics: identification of a PCR length polymorphism that discriminates between the two major clades. **Journal of General Virology**, v. 87, p. 2191 - 2201, 2006.

LADEIRA, S.; GOMES, F. R.; VIDOR, T.; PORTIANSKI, E. L.; GIMENO, E. J. Efeito da *Mannheimia granulomatis* sobre cultivo de fibroblastos.**Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 60, n. 2, 2008.

LENNETE, E.H.;LENNETE, D.A.;LENNETE, E.T. Diagnostic Procedures for Viral, Rickettsial, and Chlamydial Infections. **American Public Health Association**.7ed. 1995. p. 22.

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

MAHY, B. W. J., KANGRO, H.O. **Virology Methods Manual**. London, Academic Press,1996. p. 374.

MAYR, A.; GUERREIRO, M.G.**Virologia Veterinária**. 3.ed.Porto Alegre: Sulina, 1988.p.476.

MOHAN, M.; FERNANDEZ T. F.A case report of Pigeon Pox-Histopathologic Diagnosis.**Veterinary World**, v.1, p.117-118,2008.

MANUGUERRA, J. C., HANNOUN, C. Grippe; et autres viroses respiratoires. **Institut Pasteur**.p.187, 1999.

MAYO M.A. A summary of taxonomic changes recently approved by ICTV. **Archives of Virology**, v. 147, p.1655 - 6, 2002.

MELLO, W. A. O papel do diagnóstico laboratorial da influenza. **Rev. Pan-Amazônica de Saúde**, Ananindeua, v. 1, n. 1, 2010.

MULLER, I. PINTO, E.; SANTIBANEZ, M.C.; CELEDON, M.O.; VALENZUELA, P.D. Isolation and characterization of the equine influenza virus causing the 2006 outbreak in Chile. **Veterinary Microbiology**, v. 137, p. 172–177, 2009.

NUNES, Cristina Freitas. **Atividade virucida de um extrato etanólico de própolis verde in vitro e in vivo**. 81f. Dissertação (Mestrado) –Faculdade de Veterinária. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas. 2011.

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. Acesso em 20 dez. 2014.

OIE (Office International de Epizooties). Equine influenza, 2012. Disponível em < http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.05.07_EQ_INF.pdf> Acesso em 20 dez. 2014.

OIE (Office International de Epizooties) Listed diseases, infections and infestations in force, 2015. Disponível em: < <http://www.oie.int/animal-health-in-the-world/oie-listed-diseases-2015/>> Acesso em 20 dez. 2014.

OLIVEIRA, G.S.; SCHIAVO, P.A.; MAZUR, C.; ANDRADE, C.M. Prevalência de anticorpos para o vírus da Influenza Equina, subtipo H3N8, em equídeos apreendidos no Estado do Rio de Janeiro. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 35, n.5, p.1213-1215, 2005.

PASTORE, S.M.; OLIVEIRA, W. P.; MUNIZ, J. C. L. Panorama da coturnicultura no Brasil Artigo 180. **Revista eletrônica nutritime**, v. 9, n. 6, p. 2041 – 2049 - 2012.

PAULILLO, A. C.; SILVA, G.C.; JUNIOR, D.; GAMA, N.M.S.Q.; NISHIZAWA, M.; SCHOCKEN-ITURRINO, F. Importância das perdizes (*Rhynchotus rufescens*) como fonte potencial de vírus patogênico da doença de NEWCASTLE para aves domésticas. **Arquivo. Instituto .Biológico**, São Paulo, v.72, n.3, p.313-317, 2005.

PETROLI, T.G.; MATEUS, K.; RODRIGUES, M. CRIAÇÃO DE CODORNAS: Pequenas e Lucrativas. **SB Rural**. 16 jun. 2011.

PINTO, R.; FERREIRA, A. S.; ALBINO, L. F. T.; GOMES, P. C.; VARGAS, J. G. J. Níveis de Proteína e Energia para Codornas Japonesas em Postura. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.31, n.4, p.1761 - 1770, 2002.

PORTO, A. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Portaria n°.186, de 13 de maio de 1997. **Lex:** Regulamento técnico para a produção, o controle e o emprego de vacinas, antígenos e diluentes para avicultura, 13 mai. 1997.

RAJ, G. D.; RATNAPRABA, S.; MATHESWARAN, K.; NACHIMUTHU, K. Egg: embryo weight ratio as an indicator of dwarfism induced by infections bronchitis virus. **Avian Pathology**, v.33, n.3, p.307 - 309, 2004.

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

REIS, L.F.S.D. Codornizes, criação e exploração. In: Pastore, S. M.Oliveira, W. P. de., Muniz, J. C. L. Panorama da coturnicultura no Brasil. Revista eletrônica nutritime, v. 9, n.6, p. 2041–2049, 2012.

RIZZO, E.; TUCHYA, H.; MARTINEZ, C.H. **Técnicas básicas de cultura celular**. São Paulo: Instituto Butantan. Instituto Adolfo Lutz, 1983.

SCHIAVO, P. A.; OLIVEIRA, G. ANDRADE S.; PORTZ, C.; OLIVEIRA, J. G. J.; LOUREIRO, B. O.; MAZUR, C.; MORAES C. Cinética da produção de antígeno viral em ovos embrionados a partir de amostras patogênicas e apatogênicas do Vírus da Doença de Newcastle, 11, 2001. **Anais:** XI Jornada de Iniciação Científica da UFRRJ, 2001. p. 165-168,

SOUZA, L. L. A.; RODENBUSCH, C. R.; MARKS, F. S.; CANAL, C. W. Avaliação de protocolos de descongelamento de cultivo celular primário in vitro de fibroblasto de embrião de galinha. Salão de Iniciação Científica 18. **Livro de Resumos**. UFRG, Porto Alegre, 200

TAGELDIN M.H.; JOHNSON E. H.; AL-AMRI IS.; ALI AISHA A. Cutaneous tumor-like lesions associated with poxvirus infection in laughing doves. **Journal of Avian Medicine and Surgery**. v. 20, p. 94-96, 2006.

UFMG. Cultura de Células. Departamento de Microbiologia Instituto de Ciências Biológicas Universidade Federal de Minas Gerais. Disponível em: <<http://icb.ufmg.info/mic/diaadia/wp-content/uploads/2012/10/Cultura-de-c%C3%A9lulas.pdf>> Acesso em 25 Nov. 2014.

VILELA,C.O. **Atividade antimicrobiana de extrato etanólico de própolis verde.** **2010.** 100f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Veterinária. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2010

WOODARD, A. E.; ABPLANALP, H.; WILSON, W.O.; VOHRA, P. Japanese Quail Husbandry in the Laboratory. Department of Avian Sciences **University of California, Davis** ,p. 1 - 22, 1973.