

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

ANÁLISE DE VACINAS CONTRA O SOROTIPO 3 DO VÍRUS DA DOENÇA DE
MAREK POR PCR EM TEMPO REAL E CULTIVO CELULAR

Carla Rosane Rodenbusch

Porto Alegre

2006

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

ANÁLISE DE VACINAS CONTRA O SOROTIPO 3 DO VÍRUS DA DOENÇA DE
MAREK POR PCR EM TEMPO REAL E CULTIVO CELULAR

Autor: Carla Rosane Rodenbusch

Dissertação apresentada como requisito para
obtenção do grau de Mestre em Ciências
Veterinárias, na área de concentração de
Microbiologia Veterinária.

Orientador: Prof. Dr. Cláudio Wageck Canal

PORTO ALEGRE

2006

À minha família, pela educação e apoio.
À minha irmã, pela amizade e incentivo.
Ao meu namorado Thiago Cruz, pelo
amor, companheirismo e dedicação.

AGRADECIMENTOS

Ao prof. Dr. Cláudio Wageck Canal, pela orientação, apoio, incentivo e amizade.

Ao prof. Dr. Nilo Ikuta pela co-orientação e ensinamentos transmitidos.

À empresa Simbios Biotecnologia Ltda, por disponibilizar sua infra-estrutura para a realização deste trabalho. À Thaís da Rocha Boeira e Ana Paula Wobeto pelo carinho, ajuda e pelas trocas de conhecimentos.

À Laura Lopes de Almeida pela ajuda com as células e cultivos, pela amizade e apoio nas horas difíceis.

Aos professores Laerte Ferreiro e Ana Paula Ravazzolo, por disponibilizar a infra-estrutura de seus laboratórios.

Aos colegas e amigos do Laboratório de Virologia: Marisa Macagnan, Clarissa Vaz, Fabrício Bortolanza, Cristiana Portz, Simone Simionatto e André Streck pela amizade, incentivo e auxílios prestados. Aos demais colegas que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

À Josiane Griebeler pela amizade e ensinamentos das técnicas de titulação em cultivo celular.

À Dona Orema pela ajuda com a vidraria, esterilização dos materiais e pelo carinho.

As empresas produtoras de vacinas contra a doença de Marek, que cederam as amostras utilizadas neste trabalho.

Ao Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias da UFRGS e a CAPES por possibilitarem a realização desta dissertação.

RESUMO

A doença de Marek (MD), causada por um alfa herpesvírus, é uma enfermidade linfoproliferativa que acomete principalmente galinhas. Como não existe tratamento, a melhor forma de prevenção e controle da MD é através do uso de vacinas atenuadas, que vêm sendo usadas desde 1970. Este trabalho descreve a análise de vacinas vivas congeladas contra o sorotipo 3 do vírus da doença de Marek (herpesvírus de peru – HVT) por PCR em tempo real (qPCR) e por cultivo em células de embrião de galinha. Foram avaliadas três vacinas (cepa FC126) provenientes de distintos fabricantes. As análises da homogeneidade inter e intra-lote apresentaram, respectivamente, média \pm desvio padrão de $2,6 \pm 1,7\%$, $2,1 \pm 1,1\%$ e $1,2 \pm 0,1\%$ e média \pm desvio padrão de $1,5 \pm 0,1\%$, $1,2 \pm 0,8\%$ e $1,0 \pm 0,3\%$ para A, B e C, respectivamente. A qPCR subestimou os títulos das vacinas concentradas 4x e superestimou os títulos das vacinas diluídas 8x, enquanto o cultivo celular superestimou os títulos das vacinas concentradas. As vacinas apresentaram quantidades diferentes de células/dose e unidade formadoras de placa/dose. Conseqüentemente, a relação PFU/célula também foi diferente, o que demonstra a necessidade de construção de curvas diferentes, para cada fabricante, para a titulação por qPCR.

ABSTRACT

Marek's disease (MD), caused by an alphaherpesvirus, is a lymphoproliferative disease of chickens. As no treatment is available, the main tool for prevention and control of the MD is the use of attenuated vaccines, which have been used since 1970. This work describes the analysis of frozen live vaccines against serotype 3 of the Marek's disease virus (herpesvirus turkey - HVT) by a real-time PCR assay (qPCR) and embryo fibroblast cell culture. Three vaccines were tested (FC126 strain) from distinct manufacturers. Analysis of the homogeneity inter and intra-lot presented, respectively, mean \pm standard deviation of the coefficient of variation inter-lot of $1.7 \pm 0.7\%$, $1.5 \pm 1.3\%$ and $1.5 \pm 0.6\%$ and the mean \pm standard deviation of the coefficient of variation intra-lot of $1.5 \pm 0.1\%$, $1.2 \pm 0.8\%$ and $1.0 \pm 0.3\%$ respectively for A, B and C. The qPCR assay underestimated the titration of concentrated vaccines 4x and overestimated the titration of diluted vaccines 8x, while the cellular culture overestimated the titration of concentrated vaccines. The vaccines presented different amounts of cells/dose and plaque forming units (PFU)/dose. Consequently the PFU/cell relation was also different, which demands elaboration of different curves, for each manufacturer, for the titration for qPCR.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA.....	8
1.1 Avicultura industrial	8
1.2 Doença de Marek	9
1.2.1 O vírus.....	9
1.2.2 A infecção pelo vírus, patogenia e sinais clínicos.....	11
1.2.3 Resistência genética e influência de citocinas	13
1.2.4 Imunidade humoral e celular.....	15
1.2.5 Diagnóstico	17
1.2.6 Tratamento e Prevenção (vacinas)	18
1.3 PCR em tempo real	20
2. ARTIGO CIENTÍFICO	23
ABSTRACT	25
INTRODUÇÃO	26
MATERIAL E MÉTODOS	27
RESULTADOS E DISCUSSÃO	31
AGRADECIMENTOS.....	35
REFERÊNCIAS	36
REFERÊNCIAS.....	45

1. INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA

1.1 Avicultura industrial

A indústria avícola se caracteriza pela contínua agregação de novas tecnologias. Essa característica tem feito com que a avicultura possua os mais destacados índices de produtividade entre os diversos segmentos da pecuária. Os indicadores de produção da avicultura brasileira são iguais ou, freqüentemente, melhores do que os encontrados em qualquer outro país do mundo (SALLE & SILVA, 2000) uma vez que a indústria avícola brasileira tem conseguido alinhar tecnologia, estruturas produtivas e condições naturais favoráveis para produzir um dos melhores frangos do mundo nos quesitos qualidade e custo (SONCINI, 2004).

Hoje, a produção avícola é eficiente e com alta produtividade, baseada em um sistema técnico-científico avançado, além da realização de um trabalho profissional em todos os níveis de atuação, como produção, comercialização, distribuição e exportação (FURLAN, 2000).

O Brasil é, hoje, o maior exportador mundial de frangos em receita e exporta para as Américas do Sul e Central, Europa, Rússia, Oriente Médio, Ásia e África. Segundo o boletim informativo da ABEF (Associação Brasileira de Produtores e Exportadores de Frango), o Brasil produziu 1 bilhão de aves no primeiro trimestre de 2005, sendo 1.583.844 toneladas destinadas ao mercado interno e 618.944 toneladas ao mercado externo.

Aliada ao crescimento mundial e à modernização da indústria avícola, está a evidente necessidade de uma maior atenção à saúde dos plantéis, principalmente devido ao fato da produção de frango ocorrer em sistemas intensivos de criação, com uma alta densidade animal em uma determinada área geográfica. Isso representa uma situação favorável para a multiplicação, a disseminação e a perpetuação de vários patógenos e a ocorrência de surtos de enfermidades que acarretam elevados prejuízos econômicos à indústria avícola (SESTI, 2004).

Nesse contexto, a doença de Marek merece especial atenção uma vez que é uma doença viral de fácil disseminação, considerada um sério problema para a avicultura antes do início do uso da vacinação. A doença chegou a causar, por exemplo, prejuízos de US\$ 150 milhões nos Estados Unidos e US\$ 40 milhões no Reino Unido na década de 70. Como a vacinação não é 100% eficiente ainda ocorrem perdas, mas elas são

consideradas pequenas quando comparadas com as anteriores (WITTER & SCHAT, 2003).

1.2 Doença de Marek

A doença de Marek (MD) é uma doença linfoproliferativa comum de galinhas, normalmente, caracterizada por infiltrado celular mononuclear em nervos periféricos e vários outros órgãos e tecidos, incluindo íris e pele. A doença é causada por um herpesvírus, é transmissível e pode ser distinguida etiologicamente de outras neoplasias linfóides de aves (WITTER & SCHAT, 2003). Também afeta perus, faisões e codornas, porém, não é comum nestas espécies (NAIR, 2004).

A doença de Marek foi descrita pela primeira vez por József Marek em 1907 como uma paralisia causada por infiltração mononuclear no plexo do nervo ciático. Alguns anos mais tarde, essa “polineurite” foi associada com o desenvolvimento de tumores em órgãos viscerais e passou a ser conhecida como “neurolymphomatosis gallinarum”. Era difícil distinguir a síndrome de outras condições neoplásicas do sistema hematopoiético das aves, chamado complexo linfóide leucótico, até que em 1960 foi proposta uma nova classificação com base na idade de infecção, tecido de distribuição e histopatogênese, e a paralisia das galinhas foi renomeada doença de Marek e distinguida das demais leucoses (BAATEN, BUTTER & DAVISON, 2004).

A incidência da MD e das leucoses linfóides aumentou consideravelmente de 1930 a 1950 devido à expansão da produção avícola. A forma visceral ou aguda da doença tornou-se a forma predominante de ocorrência em aves jovens e causou maior mortalidade do que a forma neural clássica. Em 1960, a morbidade e a mortalidade em matrizes de postura devido à MD variaram de 0 a 60% e as perdas foram superiores a 30% (BAATEN, BUTTER & DAVISON, 2004).

O vírus da doença de Marek (MDV) não é transmitido por infecção congênita do embrião, mas adquirido através da exposição a ambientes contaminados. O ambiente atual das criações comerciais de frango, onde as aves são criadas em alta densidade, tem aumentado a disseminação da doença (EIDSON, PAGE & KLEVEN, 1978).

1.2.1 O vírus

Devido aos problemas em distinguir a doença de Marek das outras leucoses e a natureza altamente associada à célula do vírus da doença de Marek (MDV), este só foi identificado em 1967 como um membro da família dos herpesvírus. Inicialmente, o

MDV foi definido como um membro da subfamília *Gamaherpesvirinae* devido às propriedades biológicas e tropismo por linfócitos. Mais tarde ficou claro que o vírus tinha uma estrutura genômica de alfa herpesvírus com uma região única longa (U_L) e uma região única curta (U_S), flanqueadas por repetições internas e terminais semelhantes às do herpes simplex (BAATEN, BUTTER & DAVISON, 2004).

As partículas virais são típicas dos herpesvírus, com vírions sendo normalmente encontrados no núcleo e, mais raramente, no citoplasma e espaços extracelulares (BAATEN, BUTTER & DAVISON, 2004). Os nucleocapsídeos medem de 85 a 100 nm e as partículas envelopadas medem de 150 a 160 nm de diâmetro. Partículas virais do epitélio do folículo das penas medem de 273 a 400 nm e possuem uma aparência amorfa (WITTER & SCHAT, 2003). O genoma é constituído de uma fita dupla de DNA linear, com um tamanho de 160 a 180 kb, que comporta de 70 a 80 genes (CANAL & SILVA, 2000) e codifica 103 proteínas (TULMAN et al., 2000).

São descritos 3 sorotipos do vírus da doença de Marek: sorotipo 1 (*Gallid herpesvirus 2*), sorotipo 2 (*Gallid herpesvirus 3*) e sorotipo 3 (*Meleagrid herpesvirus* ou *herpesvirus turkey* – HVT). A oncogenicidade está associada somente ao sorotipo 1, onde um vasto potencial patogênico é conhecido (BAATEN, BUTTER & DAVISON, 2004). A classificação de patotipos dentro do sorotipo 1 foi proposta por Witter (1983, 1997) e designa o vírus como “mild” (mMDV), “virulent” (vMDV), “very virulent” (vvMDV) ou “very virulent plus” (vv+MDV). Os sorotipos 2 e 3 são, naturalmente, não patogênicos, sendo que o 2 pode ser fracamente patogênico.

Aos 16-18 dias de incubação, o sorotipo 1 replica pouco em tecidos de embrião de galinha após inoculação aminiótica, enquanto aos 11-12 dias a replicação é intensa resultando em efeitos patogênicos graves com conseqüente mortalidade. Ao contrário, o HVT replica extensivamente no embrião em estágios tardios de desenvolvimento, resultando em alto título viral detectável no pulmão. Embriões infectados com sorotipo 1 e HVT apresentam patogenia diferente. O DNA do sorotipo 1 pode ser detectado nos pulmões e timos de embriões aos 3 dias pós-infecção (dpi), por hibridização “in situ”, enquanto o DNA do HVT somente está presente nos pulmões. As células-alvo nos pulmões e no timo são não-linfóides e linfóides, respectivamente. Ambos os vírus são detectados em todos os órgãos aos 5 dpi e persistem após a eclosão (HILL, SILVA & SHARMA, 2004).

1.2.2 A infecção pelo vírus, patogenia e sinais clínicos

A principal forma de transmissão natural da doença de Marek ocorre pelo contato direto ou indireto entre galinhas. As células epiteliais na camada de queratina dos folículos da pena são permissíveis à replicação do vírus infeccioso. O vírus associado às penas e fezes é a principal fonte de infecção e permanece contaminando galpões por muitos meses a 20-25°C ou por anos a 4°C. Muitas aves com aparência normal podem ser portadoras e transmitir a doença. Alguns insetos transportam o MDV passivamente. Contudo, mosquitos, ácaros de vida livre e oocistos de *Eimeria* não são associados com a transmissão. Não ocorre transmissão vertical e a transmissão pela contaminação externa do ovo é pouco provável devido à baixa resistência do vírus às condições de temperatura e umidade durante a incubação (CANAL & SILVA, 2000; WITTER & SCHAT, 2003).

O período de incubação da doença experimentalmente induzida é bem esclarecido. Pintos inoculados com 1 dia de vida começam a excretar o vírus 2 semanas após, com excreção máxima ocorrendo entre a terceira e a quinta semanas de vida. Sinais clínicos e lesões macroscópicas, contudo, não aparecem antes de 3 a 4 semanas. Embora esses números representem o menor período de incubação, existe uma grande variação influenciada pela cepa do vírus, dose, quantidade de anticorpos maternos e rota de inoculação, assim como pela linhagem e sexo do hospedeiro e doenças imunodepressoras concomitantes. Em condições de campo, o período de incubação é difícil de ser determinado. Embora surtos possam ocorrer em aves jovens, com 3 a 4 semanas de idade, a maioria dos casos inicia depois de 8 a 9 semanas. Em lotes de poedeiras, os sinais clínicos não aparecem antes de 16 a 20 semanas, iniciando entre 24-30 semanas e podendo ocorrer em aves de até 60 semanas de idade (CANAL & SILVA, 2000).

A patogenia da doença de Marek é complexa e não totalmente entendida. De acordo com o modelo proposto por Nair (2004), após a infecção, o vírus é transportado pelos macrófagos dos pulmões para os tecidos linfóides do baço, timo e Bursa de Fabricius, onde atinge os linfócitos. Inicialmente, os linfócitos B, que são a maior arma do sistema imune humoral, são os alvos dos vírus durante uma infecção lítica. Isto é seguido por uma infecção dos linfócitos T ativados que mediam a resposta imune mediada por células. Estes eventos citolíticos resultam em mudanças na bursa de Fabricius e timo, levando à severa debilidade do sistema imune e, conseqüentemente, imunossupressão.

Após a fase citolítica inicial, a infecção desencadeia uma fase latente de infecção nos linfócitos T, quando os órgãos linfóides vão gradualmente restaurando a sua arquitetura. Durante este período, o vírus também é carregado por linfócitos infectados para a pele onde ocorre uma ampla infecção produtiva no epitélio do folículo das penas, liberando vírus infeccioso livre de célula por aproximadamente 10 dias após a infecção. Em aves geneticamente suscetíveis, a infecção latente dos linfócitos T torna-se alvo para transformações neoplásicas, resultando no desenvolvimento de tumores linfomatosos em órgãos viscerais. Os eventos moleculares que induzem da latência à transformação não são ainda bem entendidos, mas Garcia-Camacho et al. (2003) sugeriram que dependem da combinação de suscetibilidade genética e condição imune do hospedeiro e da virulência da cepa viral. As principais células-alvo para a transformação na infecção natural são os linfócitos T CD4⁺, todavia o vírus também pode transformar células T CD8⁺ (VENUGOPAL, 2000)

A doença de Marek é uma doença progressiva com sinais clínicos variáveis onde, segundo MURPHY et al. (1999), 4 síndromes podem se sobrepor:

- 1) Neurolinfomatosa ou doença de Marek clássica: está associada com uma paralisia assimétrica de uma ou ambas as patas ou asas. Incoordenação é o sinal inicial mais comum; uma das patas é estendida para frente e a outra para trás devido à paresia ou paralisia unilateral. Asas caídas, pescoço e cabeça pendidos também são comuns. Se o nervo vago estiver envolvido, as aves podem apresentar-se ofegantes e o papo pode estar dilatado;
- 2) Doença de Marek aguda: ocorre em surtos de grandes proporções. As aves mostram depressão seguida, em poucos dias, por ataxia e paralisia. Ocorre uma mortalidade significativa sem apresentação de sinais neurológicos;
- 3) Linfomatose ocular: causada por infiltração de células linfoblastóides em um ou ambos olhos. A pupila é irregular e excêntrica e há cegueira parcial ou total;
- 4) Doença de Marek cutânea: é reconhecida rapidamente após a depena, quando são visualizadas as lesões nodulares e arredondadas de 1 cm de diâmetro nos folículos das penas.

Witter & Schat (2003) descreveram a doença como apresentando apenas duas formas: a clássica e a aguda. Na clássica, as aves afetadas apresentam vários graus de ataxia e paralisia flácida do pescoço e membros, iniciando 8 a 12 dias após a exposição ao vírus por inoculação ou contato. Os sinais duram de 1 a 2 dias seguidos de uma

rápida e completa recuperação, porém as aves podem sucumbir poucas semanas depois devido aos linfomas. A forma aguda (fatal) resulta em morte entre 24-72 horas após o início dos sinais de paralisia.

Antes da utilização das vacinas, a mortalidade nos lotes afetados variava de poucas aves até 30% e, ocasionalmente, 60%. Atualmente, quase todos os lotes de poedeiras são vacinados e isso reduziu as perdas para menos de 5% na maioria das regiões. Frangos de corte são vacinados na maioria dos países, podendo ocorrer perdas de 0,1 a 0,5% e condenações de 0,2% ou mais. A incidência da doença é muito variável e em geral a mortalidade é quase igual à morbidade (CANAL & SILVA, 2000).

Vários fatores relacionados ao vírus, hospedeiro e meio ambiente influenciam as perdas nos lotes afetados. Cepas associadas com surtos agudos são mais virulentas, causam uma maior incidência da doença e mais linfomas viscerais do que as associadas com a forma clássica. Fatores relacionados com o hospedeiro incluem o sexo, os anticorpos maternos, a genética e a idade. Os anticorpos maternos reduzem a mortalidade, sinais clínicos, paralisia transitória e mortalidade precoce, provavelmente, por limitarem a disseminação do vírus aos tecidos durante os primeiros dias após a exposição. Parece provável que a resposta imune do hospedeiro à infecção seja o fator mais importante e, possivelmente, a base comum do que é chamado de “resistência associada à idade” e “resistência genética”. Fatores ambientais e infecções intercorrentes, como alta concentração de aves, micotoxinas e infecções com outros vírus imunodepressores, também afetam a incidência e a severidade da doença de Marek (CANAL & SILVA, 2000).

1.2.3 Resistência genética e influência de citocinas

O genótipo do hospedeiro influencia fortemente o resultado da infecção por MDV, afetando a mortalidade, a distribuição dos vírions e a incidência de tumores. Galinhas resistentes permanecem infectadas de forma latente para o resto de suas vidas ao passo que, em genótipos suscetíveis ao MDV, podem aparecer linfomas em tecidos viscerais e/ou lesões neurais que resultam em paralisia. A resistência à MD aumenta gradualmente durante um período de semanas e esta “resistência relacionada à idade” é, provavelmente, dependente da maturidade do sistema imune, sendo expressa através da regressão das lesões e somente vista em linhagens de galinhas geneticamente resistentes (BAATEN, BUTTER & DAVISON, 2004).

A resistência genética à MD está associada a genes dentro do locus B, codificando o complexo principal de histocompatibilidade (MHC) da galinha. Por exemplo, galinhas com o haplótipo B²¹ são mais resistentes à doença de Marek do que aquelas com o haplótipo B¹⁹. As diferentes respostas à infecção por MDV são causadas por grandes variações entre MHC de classe I expressos na superfície das células. O haplótipo mais suscetível (B¹⁹) tem uma maior quantidade de MHC classe I expressa na superfície, enquanto o haplótipo mais resistente (B²¹) expressa menores quantidades (BAATEN, BUTTER & DAVISON, 2004).

O envolvimento de outros alelos é evidente, uma vez que grandes diferenças na resistência têm sido observadas entre outras linhagens de galinhas. Os melhores exemplos são as linhagens 6 e 7 que compartilham o haplótipo B². Os antígenos Th-1, Ly-4 (células T) e Bu-1 (células B) são polimórficos entre essas linhagens de galinhas e associados à resistência/suscetibilidade à doença de Marek (BAATEN, BUTTER & DAVISON, 2004).

Embora fêmeas sejam consideradas mais suscetíveis à doença clínica do que os machos, há relatos conflitantes. A discrepância observada pode depender da carga genética da linhagem estudada. Emara et al. (2001) apud Baaten et al. (2004) descreveram um componente genético que afetava a perda de peso corporal durante a infecção por MDV e sugeriram que o gene responsável, provavelmente, influencia a suscetibilidade à paralisia, com crescente depressão das aves infectadas como efeito secundário.

Estudos de expressão temporal em galinhas resistentes (B²¹/B²¹) revelaram que a transcrição do interferon gama (IFN- γ) foi aumentada no terceiro dia pós-inoculação (dpi) e a quantidade relativa de mRNA de IFN- γ nos esplenócitos de aves infectadas no primeiro dia de vida foi de 16 a 64 vezes maior do que as aves controles aos 9 dpi (BAATEN, BUTTER & DAVISON, 2004). Kaiser, Underwood & Davison (2003) também observaram a grande expressão de IFN- γ na primeira semana de replicação viral em esplenócitos de galinhas com o haplótipo B²¹/B²¹, mas também em genótipos B²B² (resistentes e suscetíveis) e B¹³B¹³ (suscetíveis).. Esses estudos contrastam com os que relataram que genótipos resistentes têm maiores níveis de IFN após a infecção por MDV do que genótipos suscetíveis. Além disso, há relatos conflitantes sobre a produção de IFN como consequência da vacinação contra o MDV, que sugeriram que a diferença poderia ocorrer devido às cepas virais. Concomitante com a transcrição de IFN- γ , os

níveis de mRNA de IL-8 foram aumentados em linfócitos no baço. Ambas citocinas geraram um aumento da expressão da sintetase indutível de óxido nítrico (iNOS) em macrófagos (BAATEN, BUTTER & DAVISON, 2004).

Segundo Jarosinski et al. (2002), o óxido nítrico é uma molécula de radical livre que é produzida pela modificação da L-arginina para L-citrulina pela enzima óxido nítrico sintetase (NOS). Nos macrófagos, a (iNOS) é responsável pela produção de óxido nítrico que é uma parte importante da resposta de defesa contra muitos patógenos. Em seus experimentos, eles demonstraram que a inoculação do patótipos vvMDV causou um aumento significativo de NO plasmático quando comparado com vMDV em galinhas resistentes, mas não em galinhas suscetíveis aos 7 dpi. A inoculação de diferentes cepas (mMDV a vv+MDV) mostrou que as cepas mais virulentas induzem os mais altos níveis plasmáticos de NO.

Yunis, Jarosinski & Schat (2004) demonstraram a associação entre a taxa de replicação viral e a virulência de cepas do MDV através da inoculação de cepas vMDV e vv+MDV em aves resistentes e suscetíveis durante 10 dias pós infecção. Apenas o DNA viral estava presente no baço em quantidades decrescentes entre 1-3 dpi e aos 4 dpi, o DNA viral começou a aumentar concomitantemente com a transcrição viral, independentemente da cepa viral e resistência genética. Aos 6 dpi, a cepa vMDV iniciou latência nas aves resistentes e suscetíveis com baixos níveis de transcritos virais, mas a transcrição aumentou nas aves suscetíveis aos 9-10 dpi. Em contraste, a infecção com a cepa vv+MDV nunca levou à latência em ambas linhagens de galinha. A transcrição viral estava presente de 4-10 dpi, mostrando uma maior persistência da atividade viral que poderia levar a danos graves aos órgãos linfóides, resultando em aumento da imunodepressão e aumento da incidência da doença de Marek.

1.2.4 Imunidade humoral e celular

A infecção com MDV patogênico ou com cepas vacinais não somente resulta em ativação de respostas inatas ou não-específicas e adquiridas ou específicas, como também causa efeitos imunodepressores, especialmente após infecção com o sorotipo 1. O desenvolvimento de resposta imune durante a fase citolítica inicial da infecção é crucial para o resultado da infecção. Alterações da resposta imune durante esta fase retardam o estabelecimento da latência resultando em prolongamento da infecção lítica e a conseqüente destruição continuada de células imunes por apoptose induzida pelo vírus. A importância da resposta imune durante a persistência é relevante por proteger

contra a segunda fase lítica e é dependente da imunidade mediada por células (WITTER & SCHAT, 2003).

A resposta imune inata inclui a ativação de células “natural killer” (NK) e macrófagos e mudanças na expressão de citocinas. Células NK são a primeira linha de defesa porque essas células podem lisar células infectadas por vírus e tumores sem necessidade de exposição anterior ao patógeno. As células NK são também indutoras potentes de IFN- γ . As células NK reconhecem as células alvo como estranhas (por exemplo, o MCH classe I alterado, ou expresso em menor quantidade) e promovem a lise destas. Galinhas geneticamente suscetíveis que apresentam tumores têm diminuição da ativação das células NK, ao contrário das galinhas vacinadas ou geneticamente resistentes sem tumores, que apresentam altos níveis de células NK. As células NK são também rapidamente ativadas após a vacinação com HVT. O aumento da expressão do MHC classe I pode ser importante para aumentar a resistência das células não infectadas à lise pelas células NK, que são ativadas rapidamente após a infecção por MDV (WITTER & SCHAT, 2003; BAATEN, BUTTER & DAVISON, 2004).

Em um estudo realizado por Garcia-Camacho et al. (2003), galinhas geneticamente resistentes, quando infectadas, apresentaram uma resposta imune mediada por células caracterizada inicialmente por citotoxicidade ligada à NK que coincidiu com uma limitada citotoxicidade ligada ao MHC. Embora a citotoxicidade ligada às células NK e MHC seja demonstrada em galinhas geneticamente suscetíveis, quando infectadas, ambas decresceram rapidamente e permaneceram baixas durante os 20 dias de experimento.

Ainda que a defesa imune contra células infectadas seja predominantemente mediada por linfócitos T citotóxicos (CTL), a resposta imune humoral tem um papel importante nas infecções por herpesvírus. Os anticorpos são importantes principalmente em neonatos, onde os anticorpos maternos adiam o desenvolvimento da doença de Marek, reduzindo, mas não prevenindo a infecção por MDV. Todavia, os anticorpos maternos podem interferir com a imunidade vacinal por neutralizar a vacina antes de induzir imunidade (BAATEN, BUTTER & DAVISON, 2004). O estudo desenvolvido por Eidson, Page & Kleven (1978) mostrou que os anticorpos maternos contra HVT inibem a indução de viremia, mas também promovem uma resposta menos uniforme e demorada. Anticorpos vírus neutralizantes são importantes na modulação das fases iniciais da infecção por MDV. Os anticorpos são gerados contra um grande número de proteínas virais. Anticorpos contra gB, mas não gC, são associados com a indução da

proteção imune. Anticorpos contra gI e gE têm sido mostrados em soro de aves convalescentes e isto sugere que estes anticorpos podem ter um papel importante na proteção imune (BAATEN, BUTTER & DAVISON, 2004).

Giansanti et al. (2005) relataram que o MDV induz a síntese de ovotransferrina em fibroblasto de embrião de galinha infectado. A ovotransferrina é uma proteína ligada ao ferro com atividade antiviral importante na imunidade natural.

1.2.5 Diagnóstico

Na elaboração do diagnóstico, os sinais clínicos, as lesões micro e macroscópicas, a mortalidade, a morbidade e a idade das aves, entre outros fatores devem ser levados em conta. O aumento dos nervos periféricos e os linfomas são comuns na doença de Marek, entretanto nenhuma dessas lesões ocorre sempre ou é patognomônica da enfermidade. O exame histológico de seções de tecidos corados com hematoxilina-eosina revela uma população mista de linfócitos pequenos e grandes, linfoblastos e plasmócitos nos tumores da doença de Marek (CANAL & SILVA, 2000).

Devido ao fato do MDV estar em todos os tipos de criação de galinhas e a vacinação ser largamente empregada, a sua detecção por si só não tem valor prático se sua presença não estiver associada às lesões. A utilização da PCR e da imunohistoquímica para a detecção, respectivamente, de DNA e antígenos nas lesões possibilitou a correlação destas com a presença do agente (CANAL & SILVA, 2000). A qPCR usando vários seqüências de iniciadores tem sido usadas para detectar e determinar a carga viral em tecidos de aves infectadas (REDDY, WITTER & GIMENO, 2000; YUNIS, JAROSINSKI & SCHAT, 2004; ISLAM et al., 2004; BAIGENT et al., 2005).

O vírus pode ser isolado e multiplicado em cultivos celulares para posterior caracterização ou produção de vacinas ou, ainda, por inoculação na membrana corio-alantóide ou saco da gema de ovos embrionados. Devido à sua forte associação às células, as células viáveis são o inóculo preferido, embora preparações livres de células da pele, fezes e folículo das penas possam conter o vírus infeccioso. Podem, ainda, ser preparados inóculos a partir de linfócitos sanguíneos, sangue heparinizado, esplenócitos ou células tumorais. Células de rim de galinha e fibroblasto de embrião de pato são as células preferidas para o isolamento do sorotipo 1, enquanto que fibroblasto de embrião de galinha é a preferida para o isolamento dos sorotipos 2 e 3 (CANAL & SILVA, 2000; MURPHY et al., 1999; WITTER & SCHAT, 2003).

A detecção de antígenos virais ajuda na detecção do agente e pode ser utilizada também para sua sorotipagem. Anticorpos monoclonais contra epitopos específicos ou comuns aos 3 sorotipos de MDV são usados preferencialmente aos anticorpos policlonais para detecção de antígenos em tecidos. Ela envolve a detecção do antígeno por anticorpos monoclonais ou policlonais específicos para o vírus ou sorotipo do vírus nos cultivos celulares utilizados no isolamento, ou diretamente nos tecidos onde houver infecção produtiva. Esses anticorpos podem ser utilizados em diversos testes, como imunofluorescência, imunoperoxidase, ágar gel imunoprecipitação e ELISA de captura. A hibridização de ácidos nucléicos e a microscopia eletrônica também podem ser utilizadas, porém, na prática, devido à menor sensibilidade e maior custo, não o são (CANAL & SILVA, 2000; WITTER & SCHAT, 2003).

1.2.6 Tratamento e Prevenção (vacinas)

Não existe tratamento para a MD, logo, as medidas de controle e prevenção devem ser tomadas para diminuir os prejuízos da infecção pelo MDV (CANAL & SILVA, 2000).

Antes da introdução da vacinação em 1970, a doença de Marek era a doença linfoproliferativa mais comum em galinhas. A vacinação reduziu drasticamente a incidência da doença, mas não a infecção. O mecanismo pelo qual a vacinação previne a doença clínica não é completamente entendido. Em função das constantes perdas com a doença e custos com a vacinação, a doença de Marek é uma das doenças mais importantes na avicultura (MURPHY et al., 1999; ISLAM et al., 2004).

O desenvolvimento da vacina para controlar a doença de Marek foi um marco significativo na medicina aviária e nas pesquisas básicas contra o câncer, uma vez que esta foi a primeira vacina contra uma doença neoplásica (VENUGOPAL, 2000).

A primeira vacina desenvolvida foi uma cepa atenuada (HPRS-16) do sorotipo 1 do MDV, que foi logo substituída pela vacina baseada na cepa FC-126 do HVT (NAIR, 2004). A introdução do HVT como uma vacina viva resultou em uma significativa redução na incidência da doença e foi extensivamente usada por ser uma vacina eficiente e econômica (OKAZAKI, PURCHASE & BURMESTER, 1970). Poedeiras e frangos de corte eram vacinados no primeiro dia de vida e a doença de Marek retrocedeu, porém, dentro de 10 anos foram reportados surtos da doença clínica em lotes vacinados (EIDSON, PAGE & KLEVEN, 1978). Os vvMDV isolados dessas aves tinham um efeito patogênico maior do que os isolados de campo obtidos antes da

introdução da vacina (WITTER, 1983). O problema foi, provavelmente, exacerbado por algumas práticas de vacinação incorretas, onde lotes sucessivos de frangos de corte eram criados no mesmo galpão sem completa sanitização entre um lote e outro (BAATEN, BUTTER & DAVISON, 2004).

Em resposta ao aumento do número de surtos em lotes vacinados em 1980, novas vacinas contra o MDV, baseadas no sorotipo 2, foram introduzidas, normalmente em combinações bivalentes com HVT (WITTER et al., 1984). O uso de diferentes cepas como vacinas polivalentes promoveu maior proteção contra MDV do que quando usadas sozinhas. Esta estratégia foi efetiva inicialmente mas, na década de 90, ficou evidente que patotipos mais virulentos de MDV (vv+MDV) poderiam ser isolados de lotes vacinados com vacinas bivalentes (RISPENS et al., 1972; BAATEN, BUTTER & DAVISON, 2004) e mais uma vez a indústria foi forçada a introduzir uma vacina mais efetiva baseada em um isolado natural do sorotipo 1 (CVI988) (NAIR, 2004). Vírus do sorotipo 1 atenuado, normalmente, induzem uma resposta imune mais efetiva, provavelmente, devido à similaridade antigênica com as cepas oncogênicas. As vacinas contendo cepas do sorotipo 1 (CVI988/Rispens) estão sendo cada vez mais usadas em muitos países e são, provavelmente, a única vacina efetiva contra os patotipos vv e vv+MDV (VENUGOPAL, 2000).

Embora o mecanismo molecular que leva ao aumento da resistência não seja conhecido, mudanças genéticas no vírus e seleção de variantes que podem escapar da resposta imune do hospedeiro são os principais indicadores deste aumento de resistência (VENUGOPAL, 2000).

Buscaglia & Crosetti (1993) relataram falhas vacinais após a utilização de vacinas bivalentes e atribuem à infecção concomitante com o vírus da anemia das galinhas (CAV), enquanto Landman & Verschuren (2003) relacionam as falhas, ocorridas na Holanda, com a manipulação inadequada das ampolas de vacinas.

Os fatores mais importantes que afetam a eficiência vacinal são: dose, interferência de anticorpos maternos homólogos, idade de vacinação, rota de administração, revacinação, idade de desafio, cepa desafiante, estresse (imunodepressão), resistência genética e sexo, método de administração, reconstituição e aditivos. Os vírus das doenças de Gumboro, reticuloendoteliose, reovirose e anemia infecciosa das galinhas também são importantes nas falhas vacinais devido à imunodepressão que causam (LADMAN & VERSCHUREN, 2003). As vacinas, quando administradas no ovo por via amniótica ou intra-embriônica, ou por via

subcutânea no momento do nascimento, apresentam níveis de proteção de 90%, e quando administradas por via alantóidea ou câmara de ar o nível de proteção diminui para 50% (WAKENELL et al., 2002).

Vacinas recombinantes de DNA oferecem mais vantagens devido à pouca patogenicidade residual. Estão sendo desenvolvidas vacinas utilizando, como vetor, o poxvírus ou HVT, além de vacinas recombinantes de MDV expressando proteínas do vírus da doença de Newcastle (VENUGOPAL, 2000).

As vacinas de vírus vivo comercialmente vendidas, baseadas em HVT, são administradas por via parenteral, logo após a eclosão ou aos 18 dias de incubação, em doses normalmente maiores que 1000 PFU/dose (CANAL & SILVA, 2000; HILL, SILVA & SHARMA, 2004). Segundo a Portaria nº 186 de 13 de maio de 1997 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, que dispõe sobre o “Regulamento técnico para a produção, o controle e o emprego de vacinas, antígenos e diluentes para a avicultura”, as vacinas devem conter, no mínimo, título individual de 1500 PFU’s por dose, no ato de liberação da partida e, no mínimo, 1000 PFU’s por dose, até a data do vencimento.

Alta dosagem e revacinação oferecem poucas vantagens, porém a revacinação aos 7-12 dias continua sendo utilizada na Europa e, ocasionalmente, nos Estados Unidos, mesmo não sendo este procedimento validado por estudos laboratoriais (WITTER & SCHAT, 2003; EIDSON, PAGE & KLEVEN, 1978)

1.3 PCR em tempo real

A técnica laboratorial padrão para detecção da infecção por herpesvírus é a cultura de células e o reconhecimento do efeito citopático consequente, porém Doornum et al. (2003) relataram o aumento da sensibilidade do diagnóstico laboratorial dos herpesvírus simplex tipo 1 e 2, do vírus da varicela e de citomegalovírus em infecções humanas, quando usaram a amplificação de DNA.

O uso da PCR no diagnóstico molecular tem aumentado ao ponto de que agora ela é considerada o padrão ouro para detecção de ácidos nucléicos e é uma ferramenta essencial em pesquisas laboratoriais, inclusive em virologia. A qPCR tem tido uma maior aceitação do que a PCR devido ao aumento sensibilidade, reprodutibilidade e rapidez, além da redução do risco de contaminação (NIESTERS, 2001; MACKAY, ARDEN & NITSCHKE, 2002; BAIGENT et al., 2005).

A PCR convencional não é uma técnica quantitativa. A quantidade de produto de amplificação produzido não é linear e é dependente da quantidade inicial de DNA alvo, eficiência de cada ciclo de amplificação e número de ciclos. A eficiência da PCR declina durante os ciclos como resultado do consumo de iniciadores, dNTPs, produção de pirofosfatos inibidores e perda da atividade enzimática (REDDY, WITTER & GIMENO, 2000).

A implantação de técnicas moleculares no diagnóstico virológico tem sido um progresso, principalmente a introdução das técnicas em tempo real que possibilitam a quantificação do resultado. A quantificação de seqüências virais em amostras pode prover uma maior percepção no significado clínico da detecção do vírus (NIESTERS, 2001; DOORNUM et al., 2003).

Uma das técnicas moleculares mais utilizadas é a *Taqman PCR*, que consiste na adição de uma sonda fluorogênica que hibridiza especificamente entre os iniciadores na seqüência alvo da PCR. Esta sonda é clivada a cada ciclo de extensão, liberando o fluorocromo, o qual permite que os produtos amplificados sejam quantificados no momento em que são gerados. Para fazer a correlação entre a concentração inicial e a curva de detecção, um ponto onde a fluorescência excede a média, tem que ser determinado. Esse ponto é conhecido como “cycle threshold” ou valor Ct (NIESTERS, 2001).

O aumento da velocidade da qPCR se deve à redução do número de ciclos, remoção do processo de detecção pós-PCR e o uso de marcadores fluorogênicos. As desvantagens da qPCR em comparação à PCR convencional incluem a incapacidade de monitorar o tamanho do "amplicon" sem abrir o sistema, a incompatibilidade de algumas plataformas com alguns químicos fluorogênicos, a capacidade restrita de aplicação em multiplex (devido a limitações do hardware), além do custo inicial de implantação, principalmente em laboratórios pequenos (MACKAY, ARDEN & NITSCHKE, 2002).

Muitos trabalhos científicos e revisões tem sido publicados validando a qPCR em viroses humanas e animais e muitas estratégias de detecção para DNA e RNA viral baseiam-se no uso do sistema TaqMan (NIESTERS, 2001). Reddy, Witter & Gimeno (2000) desenvolveram uma PCR quantitativa competitiva para o sorotipo 1 do MDV. Na PCR comparativa quantitativa utiliza-se um DNA competidor que difere do DNA de interesse por possuir uma pequena inserção. O DNA competidor atua como um padrão interno para a estimativa do DNA viral na amostra desconhecida. A quantidade de DNA

viral na amostra é quantificado por co-amplificação na presença de quantidades conhecidas do DNA competidor. Os mesmos iniciadores que amplificam o DNA viral amplificam o DNA competidor. Para esse estudo os autores utilizaram iniciadores que amplificam a glicoproteína B do sorotipo 1 do MDV. Kaiser, Underwood & Davison (2003) utilizaram a RT-PCR em tempo real e a qPCR para quantificar, respectivamente, o mRNA de citocinas e a carga viral de MDV, através do gene *meq*, em esplenócitos durante o curso da doença em aves suscetíveis e resistentes. O gene *meq* do sorotipo 1 do MDV tem sido identificado como um oncogene envolvido no desenvolvimento de tumores associados a este sorotipo. Islam et al. (2004) desenvolveram uma PCR em tempo real que diferenciava e quantificava os três sorotipos do vírus de Marek. O gene *meq* foi utilizado para identificar o sorotipo 1, enquanto os sorotipos 2 e 3 foram identificados pela amplificação respectivamente dos genes da DNA polimerase do sorotipo 2 e o gene *sorf1* (gene codificado apenas no sorotipo 3). Baigent et al. (2005) utilizaram qPCR para a quantificação absoluta do número de cópias do genoma do MDV em penas e linfócitos. Para quantificar o vírus e o genoma da ave foram usados, respectivamente Cromossomos bacterianos artificiais contendo o gene *meq* e um fragmento do gene da ovostransferina da galinha. Islam et al. (2005) também descrevem uma qPCR para quantificação absoluta dos sorotipos 1 e 3 do MDV em linfócitos e penas através dos genes *meq* e *sorf1*, respectivamente. Griebeler (2005) demonstrou que a qPCR era uma técnica reprodutível, rápida e menos trabalhosa do que o cultivo celular para a titulação de vacinas contra o sorotipo 3 do vírus da doença de Marek.

Este trabalho teve como objetivo analisar vacinas contra o sorotipo 3 do MDV, de diferentes fabricantes, através da qPCR e cultivo celular, na tentativa de desenvolver uma qPCR que pudesse ser utilizada como ferramenta auxiliar na titulação de vacinas.

2. ARTIGO CIENTÍFICO

2.1 Análise de vacinas contra o sorotipo 3 do vírus da doença de Marek por PCR em tempo real e cultivo celular

Trabalho que será submetido à revista Avian Pathology.

Análise de vacinas contra o sorotipo 3 do vírus da doença de Marek por PCR em tempo real e cultivo celular

Carla R. Rodenbusch¹, Thaís R. Boeira², Josiane Griebeler¹, Laura L. Almeida¹, Vagner R. Lunge², André S.K. Fonseca², Cláudio W. Canal^{1*}, Nilo Ikuta²

¹Laboratório de Virologia, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brasil.

²Simbios Biotecnologia, Canoas, RS, Brasil.

*Corresponding author: Av. Bento Gonçalves 9090, Porto Alegre, RS, Brasil, CEP 91540-000. E-mail: claudio.canal@ufrgs.br

ABSTRACT

Marek's disease (MD), caused by an alphaherpesvirus, is a lymphoproliferative disease of chickens. As no treatment is available, the main tool for prevention and control of the MD is the use of attenuated vaccines, which have been used since 1970. This work describes the analysis of frozen live vaccines against serotype 3 of the Marek's disease virus (herpesvirus turkey - HVT) by a real-time PCR assay (qPCR) and embryo fibroblast cell culture. Three vaccines were tested (FC126 strain) from distinct manufacturers. Analysis of the homogeneity inter and intra-lot presented, respectively, mean \pm standard deviation of the coefficient of variation inter-lot of $1.7 \pm 0.7\%$, $1.5 \pm 1.3\%$ and $1.5 \pm 0.6\%$ and the mean \pm standard deviation of the coefficient of variation intra-lot of $1.5 \pm 0.1\%$, $1.2 \pm 0.8\%$ and $1.0 \pm 0.3\%$ respectively for A, B and C. The qPCR assay underestimated the titration of concentrated vaccines 4x and overestimated the titration of diluted vaccines 8x, while the cellular culture overestimated the titration of concentrated vaccines. The vaccines presented different amounts of cells/dose and plaque forming units (PFU)/dose. Consequently the PFU/cell relation was also different, which demands elaboration of different curves, for each manufacturer, for the titration for qPCR.

INTRODUÇÃO

A doença de Marek é uma doença linfoproliferativa comum em galinhas, caracterizada por infiltrado celular mononuclear em nervos periféricos e vários outros órgãos e tecidos, incluindo íris e pele. A doença é causada por um herpesvírus e pode ser distinguida etiologicamente de outras neoplasias linfóides de aves (Witter & Schat, 2003). Perus, faisões e codornas também podem ser afetados, porém a doença não é comum nestas espécies (Nair, 2004). Essa doença tem um grande impacto econômico na indústria avícola em função dos custos de vacinação, mortalidade, condenações de carcaças e diminuição na produção de ovos (Landman & Verschuren, 2003).

Uma vez que não existe tratamento, as medidas de controle e prevenção são as principais formas de diminuir os prejuízos da infecção pelo MDV (Canal & Silva, 2000).

O desenvolvimento da vacina para controlar a doença de Marek foi um marco significativo na medicina aviária e nas pesquisas básicas contra o câncer, uma vez que esta foi a primeira vacina contra uma doença neoplásica (Venugopal, 2000). Atualmente, existem vacinas para a doença de Marek baseadas nos três sorotipos virais (Okazaki, Purchase & Burmester, 1970; Rispens et al. 1972a; Rispens et al. 1972b; Witter et al. 1984; Witter, 1991).

A reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR) tem sido amplamente utilizada para a detecção e quantificação do vírus da doença de Marek (MDV). Islam et al. (2004) desenvolveram uma qPCR que quantificou e diferenciou os 3 sorotipos do MDV, enquanto Baigent et al. (2005) e Islam et al. (2005) desenvolveram uma qPCR que possibilitou a quantificação do MDV em relação ao número de células do hospedeiro em diversos tecidos de galinhas, inclusive nas penas.

As vacinas contra a doença de Marek são produzidas e tituladas em monocamadas de cultura de fibroblastos de embrião de galinha (FEG) obtidas a partir de ovos livres de patógenos específicos (SPF) ou em linhagem de células (BRASIL, 1997).

O objetivo deste trabalho foi analisar vacinas contra o sorotipo 3 do MDV, de diferentes fabricantes, através da qPCR e cultivo celular, na tentativa de desenvolver uma qPCR que pudesse ser utilizada como ferramenta auxiliar na titulação de vacinas..

MATERIAL E MÉTODOS

Amostras

Foram utilizadas vacinas vivas contra o MDV fornecidas por 3 fabricantes distintos. As vacinas, todas contra o sorotipo 3 (*herpesvirus turkey*, HVT), cepa FC126, eram congeladas, associadas à célula e continham 1000 doses por frasco. Essas vacinas foram transportadas e armazenadas em nitrogênio líquido até o momento das análises.

Cultivo celular

Para a titulação das vacinas, foram preparados cultivos de fibroblasto de embrião de galinha (FEG) a partir de ovos embrionados SPF (“specific pathogen free” - Sadia S.A., MG) com 11 dias de incubação, de acordo com os procedimentos padrões de cultivo celular propostos por Rovozzo & Burke (1973). As células foram cultivadas e mantidas em meio mínimo essencial de Eagle (MEM, Gibco – Invitrogen Corporation) com 0,22% de bicarbonato de sódio, 200 UI/mL de penicilina e 200 µg/mL de estreptomicina, acrescidos de 5% e 2% de soro fetal bovino (Gibco – Invitrogen

Corporation) no cultivo primário e na titulação, respectivamente. Os cultivos foram mantidos em estufa bacteriológica a 38°C e 5% de CO₂.

Titulação das vacinas em cultivo celular

A titulação foi realizada em placas de Petry (60 x 15 mm) contendo uma camada confluyente de um cultivo secundário de FEG.

As vacinas foram reconstituídas em 200 mL de seus respectivos diluentes, de acordo com as instruções dos fabricantes. Foram realizadas diluições seriadas (Figura 1) das vacinas já reconstituídas em MEM com 2% de soro fetal bovino (Wakenell et al. 2002). Para as titulações foram utilizados 2 mL das diluições 10^{-4,9}, 10^{-5,2} e 10^{-5,51}. Na titulação utilizou-se MEM com 1% de metilcelulose (Sigma). Para cada vacina, foram utilizadas 5 placas por diluição, além de uma placa controle. O procedimento de titulação usado foi o descrito por Landman & Verschuren (2003) e, após cinco dias de incubação, as culturas de FEG foram coradas utilizando-se a técnica descrita por Burleson et al. (1992). A seguir, as placas de lise foram contadas em microscópio ótico (10x) e o número de unidades formadoras de placa (PFU) foi determinado utilizando-se a contagem da diluição que continha entre 20 e 100 PFU por placa (Fenner et al., 1974). Os títulos das vacinas foram expressos em PFU por dose.

Extração de DNA

O DNA foi extraído a partir de 100 µL das vacinas reconstituídas utilizadas na titulação em cultivo de FEG. Foi utilizado o protocolo descrito por Boom et al. (1990), onde a amostra é purificada em uma reação contendo sílica e um tampão de lise contendo tiocianato de guanidina. Após a lise, o complexo sílica-ácido nucléico é lavado duas vezes com um tampão de lavagem contendo tiocianato de guanidina, duas

vezes com etanol 75% e uma vez com acetona. O complexo é, então, seco e eluído em TE (10 mM Tris HCl pH 8,0 e 1mM EDTA). O DNA foi estocado a -20°C até ser utilizado na qPCR.

PCR em tempo real (qPCR)

Iniciadores e sondas

Um par de iniciadores complementar ao gene *sorf1*, presente apenas no sorotipo 3 do MDV, foi utilizado para detecção e quantificação do HVT, enquanto que, para a quantificação do número de células, foram utilizados iniciadores complementares ao gene para colágeno $\alpha 2$ (VI) de galinha. A Tabela 1 mostra os iniciadores e sondas sintetizados pela Applied BioSystems (Foster City, EUA) e usados neste trabalho, como descritos por Islam et al (2004).

Reação de amplificação

A reação de amplificação foi realizada em um ABI PRISM 7000 Sequence Detection System (SDS 7000, Applied BioSystems, Foster City, EUA), utilizando um volume final de 30 μ L contendo 15 μ L TaqMan Universal PCR Master Mix, 0,25 μ M de cada iniciador, 0,12 μ M de sonda e 2 μ L da amostra de DNA. Os parâmetros dos ciclos utilizados foram: 95°C por 3 minutos, seguidos de 45 ciclos com desnaturação a 95°C por 15 segundos e anelamento/extensão a 60°C por 60 segundos.

A análise dos resultados foi realizada utilizando o Software ABI PRISM 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems, Foster City, EUA).

Curva padrão

DNA de sangue de galinha foi extraído através do protocolo descrito por Boom et al. (1990) e a concentração determinada através da leitura em espectrofotômetro (260 nm). Uma vez que cada reação continha 25 ng de DNA do hospedeiro e que cada célula diplóide de galinha tem 2,5 pg de DNA (Gregory, 2005), isso equivale a 10.000 células de galinha por reação. Diluições seriadas na base 5 foram preparadas para as curvas.

Para a titulação das vacinas, foram preparadas curvas-padrões, para cada fabricante, através da diluição na base 5 do DNA extraído das vacinas e do título fornecido pelo fabricante.

Os títulos fornecidos pelos fabricantes são originados a partir de titulações em cultivo celular de fibroblasto de embrião de galinha.

Determinação do número de células por dose de vacina

O número de células por mL de vacina reconstituída foi determinado utilizando-se a câmara de Neubauer. O número encontrado foi multiplicado por 0,2 (0,2 mL = volume da dose). A viabilidade das células foi determinada por adição de solução de azul de tripan 0,5% na suspensão de células (Hoskins, 1967).

Para a determinação do número de células através da câmara de Neubauer e da qPCR, foram utilizadas 4, 5 e 2 lotes, respectivamente, das empresas A, B e C (Tabela 2). O valor de PFU/dose foi a média dos valores obtidos no cultivo celular ou na qPCR, e o valor PFU/células foi obtido pela divisão do número de PFU/dose pelo número de células/dose.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste artigo analisamos vacinas produzidas por três fabricantes distintos por cultivo celular e qPCR. Foi analisada a capacidade da qPCR em titular vacinas através da construção de curvas distintas para cada fabricante, das titulações, da acuidade da técnica em titular vacinas concentradas e diluídas e através da avaliação da homogeneidade intra e interlote das vacinas. Além destes dados, foi calculada a relação PFU/célula das vacinas analisadas.

Quanto a construção das curvas, a curva-padrão para o gene colágeno $\alpha 2$ apresentou R^2 de 0,99 e as curvas das vacinas apresentaram R^2 de 0,98, 0,99 e 0,97 respectivamente para os fabricantes A, B e C, indicando que há uma forte correlação entre as diluições e os títulos obtidos (Figura 2).

A análise dos títulos (Tabela 2) mostrou que o fabricante C apresentou os maiores títulos em relação aos outros. O mesmo fabricante também apresentou os maiores valores de Ct (cycle threshold), o que corresponde a uma menor quantidade total de genomas virais. Provavelmente a maior titulação deste fabricante deve-se ao maior número de partículas virais por célula que apresenta (Tabela 4). Os títulos obtidos no cultivo celular e na qPCR foram semelhantes aos fornecidos pelo fabricante e todas as vacinas apresentaram títulos superiores a 1000 PFU/dose (Tabela 2), valor mínimo exigido para vacinação das aves.

A empresa C apresentou os maiores valores de Ct, os maiores títulos entre as empresas testadas (Tabela 2) e a maior relação PFU/célula (Tabela 4). Embora a qPCR seja diferente do cultivo celular, uma vez que mede o número de genomas virais e não o número de células infectadas, o resultado das duas técnicas possui boa correlação, ou seja, os títulos obtidos na qPCR são semelhantes aos do cultivo celular. Acredita-se que

uma PFU possa ser formada por uma única célula infectada (independentemente do número de vírus que ela possua), ou por um vírus em sua forma livre. Assim, as diferenças podem estar relacionadas com os procedimentos utilizados na produção das vacinas, tais como, concentração de células, meio de cultura, tipo de célula ou linhagem celular, quantidade de vírus livre ou associado às células e quantidade de vírus viável, entre outros fatores. Segundo Griebeler (2005) as vacinas vivas congeladas contra o HVT apresentam em média 90% dos vírus na forma associada à célula e 10% na forma livre.

Para verificar a homogeneidade inter-lote de uma mesma empresa, foram analisados 4, 9 e 4 lotes, respectivamente das empresas A, B e C, pelo cultivo celular e pela qPCR (Tabela 2). Foram realizadas duas análises em dias diferentes, em duplicata. Para verificar a homogeneidade intra-lotes, foram analisadas, no mesmo dia, de duas a três ampolas, em duplicata, de 2, 4 e 2 lotes, respectivamente das empresas A, B e C, por qPCR (Tabela 3). A variabilidade inter e intra-lotes foi expressa em coeficiente de variação (CV) que corresponde ao desvio padrão (DP)/média, expresso em % (Abdul-Careem et al., 2005). A média \pm DP da variabilidade interlote foi $2,6 \pm 1,7\%$, $2,1 \pm 1,1\%$ e $1,2 \pm 0,1\%$ e a média \pm DP da variabilidade intralote foi $1,5 \pm 0,1\%$, $1,2 \pm 0,8\%$ e $1,0 \pm 0,3\%$ respectivamente para A, B e C. As médias de CV obtidos nas análises inter e intra-lotes foram $<5\%$, valor considerado aceitável (Islam et al., 2004).

Na avaliação da relação PFU/célula, a empresa C apresentou o menor número de células/dose e os maiores títulos/dose, conseqüentemente, a relação PFU/célula foi alta em ambas as técnicas (Tabela 4). As empresas A e B apresentaram valores de PFU/dose semelhantes nas duas técnicas e valores de células/dose semelhantes na qPCR, porém diferentes na contagem na câmara de Neubauer. O fabricante A apresentou um valor

menor de células/dose na contagem na câmara de Neubauer do que o fabricante B, conseqüentemente a relação PFU/célula do A foi maior do que o B.

Para verificar se a qPCR e o cultivo celular eram capazes de detectar diferenças de concentrações nas vacinas, as mesmas foram preparadas 1x e 4x concentradas, e 8x diluídas e tituladas, tanto pela qPCR quanto pelo cultivo celular (Tabela 5). Foram realizadas 5 repetições para cada uma das três concentrações. As linhas qPCR/cultivo e qPCR/fabricante correspondem aos títulos obtidos na qPCR com as curvas padrões construídas, respectivamente, com os títulos obtidos no cultivo celular e os fornecidos pelo fabricante. A linha fabricante corresponde aos títulos fornecidos pelo fabricante (1x) e as variações teóricas de 4x e 1/8 do valor.

Existe uma maior correlação entre os valores da qPCR/fabricante e os valores do cultivo celular ($R^2 = 0,98$) do que a qPCR/cultivo ($R^2 = 0,96$). A correlação entre os valores do cultivo celular e os títulos fornecidos pelos fabricantes foi de 98%, enquanto que entre a qPCR/fabricante e os títulos fornecidos pelos fabricantes foi de 99%. Os títulos gerados no cultivo celular foram inferiores aos fornecidos pelos fabricantes, provavelmente, devido a grande quantidade de análises realizadas durante o mesmo dia, uma vez que de cada concentração foram tituladas 5 repetições de cada diluição. De acordo com Halvorson & Mitchell (1979), manter as ampolas descongelando por mais que 15 minutos pode resultar em perda de título de até 50%. Se a temperatura do banho estiver alta (40°C) ou baixa (17°C) a perda de título pode ser de aproximadamente 25%, considerando que lavar a ampola pode levar a perda de 15% do título. O uso de diluente refrigerado (4°C) também pode resultar em perda (20%). A Tabela 5 mostra que a qPCR tende a subestimar os títulos de vacinas concentradas 4x e superestimar os de vacinas diluídas 8x, como por exemplo, o título 25.800 PFU/dose do fabricante B é inferior a 4 vezes o título 10.972 PFU/dose e o título 1.964 PFU/dose é superior a 1/8 do

valor de 10.972 PFU/dose. Por sua vez o cultivo celular superestima os títulos das vacinas concentradas 4x, como por exemplo, o título 15.477 PFU/dose do fabricante B é superior a 4 vezes o título 3.690 PFU/dose.

A presença do DNA viral não necessariamente indica a quantidade de vírus infeccioso em uma amostra ou a quantidade de vírus liberado por um hospedeiro infectado. A qPCR superestima a quantidade de vírus porque detecta todas as formas virais, como os genomas não-enpacotados, os intermediários da replicação e os vírus maduros inativados. Enquanto essas formas são um erro potencial, se cada amostra contiver uma quantidade equivalente destas seqüências, o nível de erro será o mesmo em cada amostra (Islam et al., 2004).

Podemos verificar, através dos resultados, que a qPCR foi uma técnica bastante efetiva para a titulação de vacinas contra o HVT. A principal vantagem da qPCR em relação ao cultivo celular é o tempo de titulação. Atualmente a titulação de vacinas contra este sorotipo é realizada por cultivo celular em fibroblasto de embrião de galinha, o que demora uma média de 7 dias. A qPCR além de oferecer o resultado em uma média de 4 horas ainda permite a titulação de um número maior de vacinas. Um dos fatores limitantes da técnica é o alto custo do equipamento, enquanto que o cultivo tem como fator limitante a obtenção de ovos SPF para a preparação dos cultivos, uma vez que os ovos são fornecidos por poucas empresas.

De acordo com os resultados obtidos neste trabalho podemos concluir que os títulos obtidos no cultivo celular e na qPCR são semelhantes aos fornecidos pelos fabricantes, que as vacinas apresentam homogeneidade intra e interlote, que houve uma maior correlação dos títulos fornecidos pelos fabricantes com a qPCR do que com o cultivo celular, que as empresas apresentam relação PFU/célula diferentes, o que demonstra a necessidade de construção de curvas diferentes para cada fabricante e

finalmente, que a qPCR pode ser usada como uma ferramenta auxiliar para a titulação de vacinas contra o sorotipo 3 do vírus da doença de Marek.

AGRADECIMENTOS

À CAPES pela bolsa de mestrado fornecida a Carla Rosane Rodenbusch e as empresas produtoras de vacinas contra a doença de Marek pela doação das mesmas.

REFERÊNCIAS

- Abdul-Careem, M.F., Hunter, B.D., Nagy, E., Read, L.R., Sanei, B., Spencer, J.L. & Sharif, S. (2005). Development of a real-time PCR assay using SYBR Green chemistry for monitoring Marek's disease virus genome load in feather tips. *Journal of Virological Methods*. In press
- Baigent, S.J., Petherbridge, L.J., Howes, K., Smith, L.P., Currie, R.J.W. & Nair, V.K. (2005). Absolute quantitation of Marek's disease virus genome copy number in chicken feather and lymphocyte samples using real-time PCR. *Journal of Virological Methods*. 123, 53-64.
- Boom, R., Sol, C.J.A., Salimans, M.M.M., Jansen, C.L., Wertheim-van Dillen, P.M.E. & van der Noordaa, J. (1990) Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *Journal of Clinical Microbiology*. 28, 495-503.
- BRASIL (1997) Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria n° 186 de 13 de maio de 1997. Dispõe sobre o Regulamento técnico para a produção, o controle e o emprego de vacinas, antígenos e diluentes para a avicultura. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 13 de maio de 1997. Disponível em: <<http://agricultura.gov.br>>. Acesso em: 24 de novembro de 2005.
- Bumstead, N., Sillibourne, J., Rennie, M., Ross, N. & Davison, F. (1997). *Journal of Virological Methods*. 65, 75-81.
- Burleson, F.G., Chambers, T.M. & Wiedbrauk, D.L. (1992) *Virology: A Laboratory Manual* (pp.74-84). San Diego: Academic Press.
- Canal, C.W. & Silva, E.N. (2000). Enfermidade de Marek, complexo leucótico aviário e reticuloendoteliose. In.: Berchieri Jr, A.& Macari, M. *Doenças das aves*. (pp. 255-265). Campinas: Facta.
- Fenner, F., Mc Auslan, B.R., Mims, C.A., Sambrook, J. & White, D.O. (1974). Cultivation, assay, and analysis of viruses. In:_____. *The biology of animal viruses* (pp.35-71). Academic Press.
- Gregory, T.R. (2005). Animal Genome Size Database. Disponível em: <<http://www.genomesize.com>>. Acesso em: 01 de novembro de 2005.
- Griebeler, J. (2005). Titulação de vacinas contra o sorotipo 3 do vírus da doença de Marek por PCR em tempo real. 42 f. *Dissertação* (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.
- Halvorson, D.A.; Mitchell, D.O. (1979). Loss of cell-associated Marek's disease vaccine titer during thawing, reconstitution and use. *Avian Disease*. 23, 848-853.
- Hoskins, J.M. (1967). Tissue culture techniques. In:_____. *Virological Procedures* (pp.18-72). London: Butterworth & Co.
- Islam, A., Harrison, B., Cheetham, B.F., Mahony, T.J., Young, P.L. & Walkden-Brown, S.W. (2004). Differential amplification and quantitation of Marek's disease viruses

using real-time polymerase chain reaction. *Journal of Virological Methods*. 119, 103-113.

Islam, A., Cheetham, B.F., Mahony, T.J., Young, P.L., & Walkden-Brown, S.W. (2005). Absolute quantitation of Marek's disease virus and herpesvirus of turkeys in chicken lymphocyte, feather tip and dust samples using real-time PCR. *Journal of Virological Methods*. In press

Landman, W.J.M. & Verschuren, S.B.E. (2003). Titration of Marek's disease cell-associated vaccine virus (CVI988) of reconstituted vaccine and vaccine ampoules from dutch hatcheries. *Avian Diseases*. 47, 1458-1465.

Nair, V. (2005). Evolution of Marek's disease – a paradigm for incessant race between the pathogen and the host. *The Veterinary Journal*. 170, 175-183.

Okasaki, W., Purchase, H.G. & Burmester, B.R. (1970). Protection against Marek's disease by vaccination with a herpesvirus of turkeys. *Avian Diseases*. 14, 413-429.

Rispens, B.H., van Vloten, H., Mastebroek, N., Maas, H.J.L. & Schat, K.A. (1972a). Control of Marek's disease in the Netherlands. I. Isolation of an avirulent Marek's disease virus (strain CVI 988) and its use in laboratory vaccination trials. *Avian Diseases*. 16, 108-125.

Rispens, B.H., van Vloten, H., Mastebroek, N., Maas, H.J.L. & Schat, K.A. (1972b). Control of Marek's disease in the Netherlands. II. Field trials on vaccination with an avirulent strain (CVI 988) of Marek's disease virus. *Avian Diseases*. 16, 126-138.

Rovozzo, G.C. & Burke, C.N. (1973). *A manual of basic virological techniques*. New Jersey: Prentice-hall.

Venugopal, K. Marek's disease: an update on oncogenic mechanisms and control. (2000) *Research in Veterinary Science*. 69, 17-23.

Wakenell, P.S., Bryan, T., Schaeffer, J., Avakian, A., Williams, C. & Whitfill, C. (2002). Effect of *in ovo* vaccine delivery route on herpesvirus of turkeys/SB-1 efficacy and viremia. *Avian Diseases*. 46, 274-280.

Witter, R.L. & Schat, K.A. (2003). Neoplastic diseases: Marek's disease. In: Saif, Y.M., Barnes, H.J., Fadly, A.M., Clisson, J.R., McDougald, L.R. & Swayne, D.E. (2003). *Diseases of poultry*. 11th ed.(pp.407-465). Ames: Iowa State University.

Witter, R.L., Sharma, J.M., Lee, L.F., Opitz, H.M. & Henry, C.W. (1984). Field trials to test the efficacy of polyvalent Marek's disease vaccines in broilers. *Avian Diseases*. 28, 44-60.

Witter, R.L. (1991) Attenuated revertant serotype 1 Marek's disease virus: Safety and protective efficacy. *Avian Diseases*. 35, 877-891.

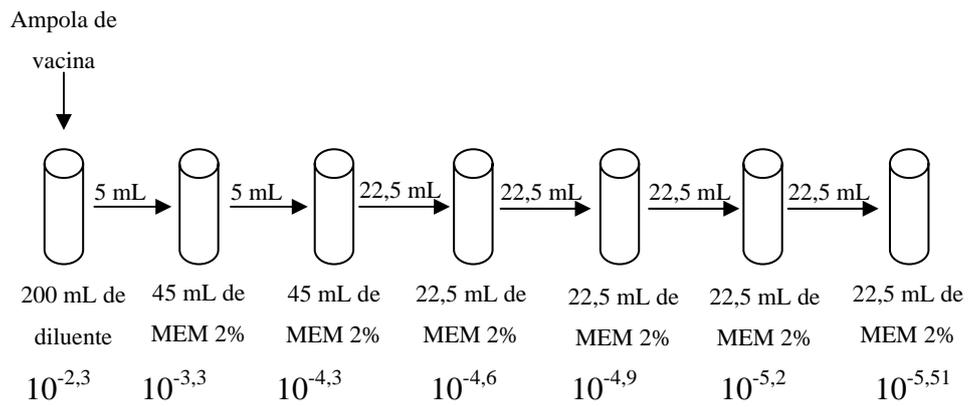


Figura 1: Diluições realizadas nas vacina após a reconstituição no diluente.

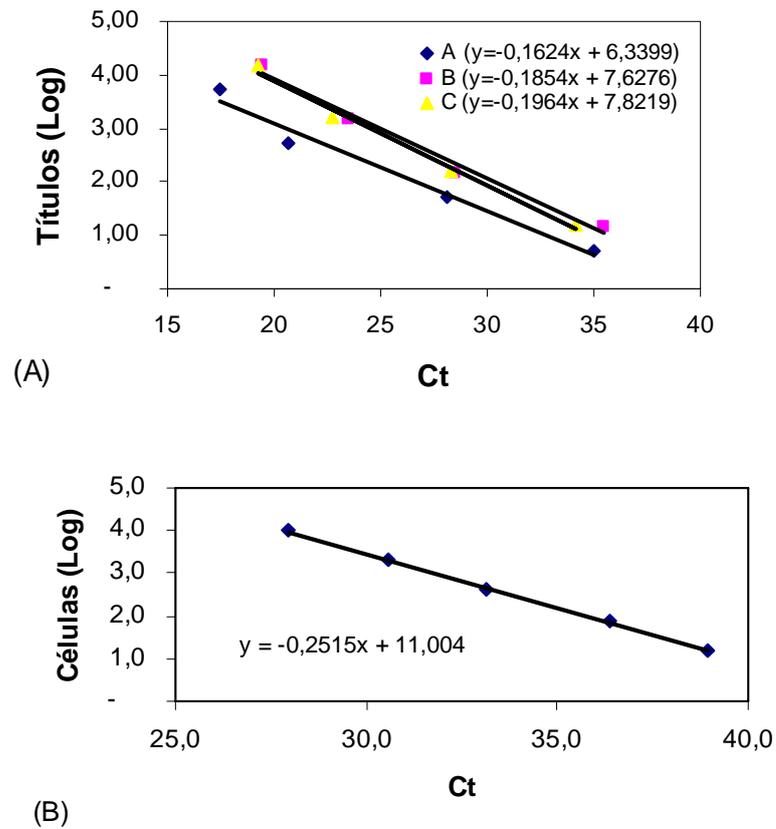


Figura 2: (A) Curvas padrões dos três fabricantes, geradas para o gene *sorf1*. Os valores de regressão linear são 0,98, 0,99 e 0,97, respectivamente para A, B e C. (B) Curva padrão para o gene colágeno $\alpha 2$ com regressão linear de 0,99 para as vacinas de todos fabricantes testados. Cada ponto das curvas corresponde a três repetições.

Gene alvo	Sonda e iniciadores	Amplicon (pb)
<i>sorf1</i>	F: 5' – GGCAGACACCGCGTTGTAT-3' R: 5'-TGTCCACGCTCGAGACTATCC-3' 5' - (FAM) AACCCGGGCTTGTGGACGTCTTC (MGB)-3'	77
Colágeno $\alpha 2$ (VI)	F: 5' – GGGAAGTGGAGAACCCAATTT – 3' R: 5' – CGTGCCGCTGTCTCTACCAT – 3' 5' – (VIC) CCCTTAACTGAGTCCCCAGCTACTGCAG (MGB) –3'	76

Tabela 1: Iniciadores e sondas usados na qPCR para amplificar os genes *sorf1* e colágeno $\alpha 2$ (VI).

Fabricante	Lote	Título Fabricante	Título Cultivo	Título qPCR	Ct 1	Ct 2	Ct 3	Ct 4	Ct Médio	DP	CV (%)
A	1	6.250	5.116	4.145	18,80	17,70	19,13	18,42	18,51	0,61	3,32
	2	5.617	6.183	3.014	18,50	18,30	18,78	18,18	18,44	0,26	1,42
	3	6.260	1.983	5.657	17,80	18,00	18,19	18,17	18,04	0,18	1,00
	4	6.283	5.383	7.717	16,60	16,60	18,10	17,90	17,30	0,81	4,70
B	1	8.150	6.700	9.934	18,50	18,30	17,43	18,00	18,06	0,47	2,58
	2	7.250	5.500	6.411	18,20	18,40	18,71	18,28	18,40	0,22	1,22
	3	7.130	6.233	5.868	18,20	19,30	19,14	18,24	18,72	0,58	3,11
	4	7.250	6.933	7.814	18,30	18,20	18,05	18,20	18,19	0,10	0,57
	5	5.040	4.166	6.548	19,10	18,30	18,10	18,86	18,59	0,47	2,52
	6	6.787	6.675	5.678	18,50	18,60	19,18	18,32	18,65	0,37	1,99
	7	7.110	6.350	3.757	19,30	19,20	19,39	19,49	19,35	0,12	0,64
	8	6.120	5.516	3.440	19,10	19,00	19,81	19,40	19,33	0,36	1,88
	9	5.910	5.450	6.624	18,90	19,40	17,79	19,41	18,88	0,76	4,03
C	1	8.080	7.750	9.981	21,30	20,80	21,23	21,13	21,12	0,22	1,05
	2	9.275	9.000	9.961	21,30	20,90	20,97	21,43	21,15	0,26	1,21
	3	11.100	8.233	7.757	21,20	21,40	21,88	21,41	21,47	0,29	1,34
	4	10.650	9.000	8.473	21,00	21,20	21,41	21,54	21,29	0,24	1,12

Tabela 2: Títulos (PFU/dose) e valores de Ct (cycle threshold) gerados na qPCR para *sorf-1* das vacinas A, B e C, demonstrando a variação inter-lotes através do coeficiente de variação (CV), que corresponde ao desvio padrão (DP)/média, expresso em %. Os valores de Ct 1-2 e Ct 3-4 foram realizados em dias diferentes.

Fabricante	Lote	Ct 1	Ct 2	Ct médio	DP	CV (%)
A	5 (1)	14,80	15,00	15,05	0,208	1,4
	5 (1)	15,10	15,30			
	6 (1)	14,60	14,80	14,93	0,234	1,6
	6 (2)	14,90	15,30			
	6 (3)	15,00	15,00			
	B	11 (1)	15,20	15,30	15,33	0,126
11 (2)		15,30	15,50			
12 (1)		17,90	18,30	18,23	0,222	1,2
12 (2)		18,40	18,30			
C	5 (1)	17,30	17,90	17,33	0,419	2,4
	5 (2)	16,90	17,20			
	6 (1)	17,70	17,70	17,68	0,126	0,7
	6 (2)	17,80	17,50			
	7 (1)	16,50	16,60	16,63	0,126	0,8
	7 (2)	16,80	16,60			
	8 (1)	17,60	17,70	17,48	0,183	1,0
	8 (2)	17,40	17,60			
	8 (3)	17,20	17,40			

Tabela 3: Valores de Ct (cycle threshold) gerados na qPCR para *sorf-1* das vacinas produzidas pelos fabricantes A, B e C. O coeficiente de variação (CV) representa o desvio padrão (DP)/ média, expresso em %. Os números entre parênteses correspondem ao número dado as ampolas de um mesmo lote.

Fabricante	Câmara de Neubauer Cultivo Celular			qPCR		
	cél./dose	PFU/dose	PFU/cél.	cél./dose	PFU/dose	PFU/cél.
A	29.500	5.736	0,19	43.213	5.133	0,12
B	40.200	5.906	0,15	42.399	6.230	0,15
C	13.250	8.375	0,63	11.272	9.043	0,80

Tabela 4: Valores médios de 5 repetições dos títulos em PFU/dose e desvios padrões (DP). O valor de PFU/célula corresponde a divisão do valor de PFU/dose por célula/dose.

Técnica	Fabricante A			Fabricante B			Fabricante C		
	4x	1x	1/8x	4x	1x	1/8x	4x	1x	1/8x
Cultivo celular ¹	7.562	1.512	216	15.477	3.690	425	23.029	3.704	387
qPCR/cultivo ²	5.360	1.659	124	14.760	6.175	1.312	15.552	4.675	1.982
qPCR/fab ³	20.700	5.451	399	25.800	10.972	1.964	38.400	11.110	3.608
Fabricante ⁴	20.732	5.183	648	25.840	6.460	808	38.300	9.575	1.197

¹Títulos obtidos no cultivo celular de fibroblasto de embrião de galinha.

²Títulos obtidos na qPCR a partir de curvas padrões com valores de referências obtidos no cultivo celular.

³Títulos obtidos na qPCR a partir de curvas padrões com valores de referências fornecidos pelos fabricantes.

⁴Valores de referência fornecidos pelos fabricantes (1x) e valores estimados de 4 vezes concentrado e 8 vezes diluído.

Tabela 5: Títulos médios (5 repetições) em PFU/dose das vacinas.

REFERÊNCIAS

ABEF. **Informativo ABEF**. Ano VI, Edição 72. Março, 2005. Disponível em: <<http://www.abef.com.br>>. Acesso em: 21 Nov. 2006.

BAATEN, B. J. G.; BUTTER, C.; DAVISON, T. F. Study of host-pathogen interactions to identify sustainable vaccine strategies to Marek's disease. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 100, p. 165-177, 2004.

BAIGENT, S. J et al. Absolute quantitation of Marek's disease virus genome copy number in chicken feather and lymphocyte samples using real-time PCR. **Journal of Virological Methods**. v. 123, p. 53-64, 2005.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria nº 186 de 13 de maio de 1997. Dispõe sobre o Regulamento técnico para a produção, o controle e o emprego de vacinas, antígenos e diluentes para a avicultura. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 13 de maio. 1997. Disponível em: <<http://agricultura.gov.br>>. Acesso em: 24 de nov. 2005.

BUSCAGLIA, C.; CROSETTI, C. Studies on Marek's disease vaccination failures in Argentina. In: SECOND MEETING ON THE COOPERATIVE RESEARCH PROJECT IN THE AREA OF VETERINARY SCIENCES BETWEEN NATIONAL UNIVERSITY OF LA PLATA AND JAPAN INTERNATIONAL COOPERATION AGENCY NULP-FVS/ JICA, 1993, La Plata. **Anais**. La Plata, 1993. p. 19-21.

CANAL, C. W.; SILVA, E. N. Enfermidade de Marek, complexo leucótico aviário e reticuloendoteliose. In.: BERCHIERI Jr, A.; MACARI, M. (Eds.). **Doenças das aves**. Campinas: Facta, 2000. p. 255-265.

DOORNUM, G. J. J., et al. Diagnosing herpesvirus infections by real-time amplification and rapid culture. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 41, n. 2, p. 576-580, 2003.

EIDSON, C. S., PAGE, R. K. & KLEVEN, S. H. Effectiveness of cell-free or cell-associated turkey herpesvirus vaccine against Marek's disease in chickens as influenced by maternal antibody, vaccine dose, and time of exposure to Marek's disease virus. **Avian Diseases**. v. 22, p. 583-597, 1978.

FURLAN, R. L. Anatomia – Fisiologia. In.: BERCHIERI Jr, A.; MACARI, M. (Eds.). **Doenças das aves**. Campinas: Facta, 2000. p. 15-28.

GARCIA-CAMACHO, L., et al. Early cell-mediated immune responses to Marek's disease virus in two chicken lines with defined major histocompatibility complex antigens. **Veterinary Immunology and Immunopathology**. v. 95, p. 145-153, 2003.

GIANSANTI, F., et al. Antiviral activity of ovotransferrin derived peptides. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. v. 331, p. 69-73, 2005.

- GRIEBELER, J. (2005). Titulação de vacinas contra o sorotipo 3 do vírus da doença de Marek por PCR em tempo real. 42 f. *Dissertação* (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.
- HILL, C. A. S.; SILVA, R. F.; SHARMA, J. M. Detection and localization of avian alphaherpesviruses in embryonic tissues following in ovo exposure. **Virus Research**. v. 100, p. 243-248, 2004.
- ISLAM, A., et al. Differential amplification and quantitation of Marek's disease viruses using real-time polymerase chain reaction. **Journal of Virological Methods**. v. 119, p. 103-113, 2004.
- ISLAM, A., et al. Absolute quantification of Marek's disease virus and herpesvirus of turkeys in chicken lymphocyte, feather tip and dust samples using real-time PCR. **Journal of Virological Methods**. In Press, 2005.
- JAROSINSKI, K. W. et al. Influence of genetic resistance of the chicken and virulence of Marek's disease virus (MDV) on nitric oxide responses after MDV infection. **Avian Diseases**. v. 46, p. 636-649, 2002.
- KAISER, P., UNDERWOOD, G., DAVISON, F. Differential cytokine responses following Marek's disease virus infection of chickens differing in resistance to Marek's disease. **Journal of Virology**. v. 77, n. 1, p. 762-768, Jan 2003.
- LANDMAN, W. J. M.; VERSCHUREN, S. B. E. Titration of Marek's disease cell-associated vaccine virus (CVI988) of reconstituted vaccine and vaccine ampoules from dutch hatcheries. **Avian Disease**. v.47, p. 1458-1465, 2003.
- MACKAY, I. M.; ARDEN, K. E.; NITSCHKE, A. Real-time PCR in virology. **Nucleic Acids Research**. v. 30, n. 6, p. 1292-1305, 2002.
- MURPHY, F. A., GIBBS, E. P. J., HORZINEK, M. C. & STUDDERT, M. J. Herpesviridae. In: _____. **Veterinary Virology**. 3 ed. California: Academic Press, 1999, Chapter 18, p. 301-325.
- NAIR, V. Evolution of Marek's disease – a paradigm for incessant race between the pathogen and the host. **The Veterinary Journal**. v. 170, n. 2, p. 175-183, 2005.
- NIESTERS, H. G. M. Quantitation of viral load using real-time amplification techniques. **Methods**, v. 25, p. 419-429, 2001.
- OKASAKI, W.; PURCHASE, H. G.; BURMESTER, B. R. Protection against Marek's disease by vaccination with a herpesvirus of turkeys. **Avian Diseases**. v. 14, n. 2, p. 413-429, 1970.
- REDDY, S. M., WITTER, R. L. GIMENO, I. Development of quantitative-comparative polymerase chain reaction assay for serotype 1 Marek's disease virus. **Avian Disease**. v. 44, p. 770-775, 2000.

RISPENS, B. H. et al. Control of Marek's disease in the Netherlands. I. Isolation of an avirulent Marek's disease virus (strain CVI 988) and its use in laboratory vaccination trials. **Avian Diseases**. v. 16, n. 1, p. 108-125, 1972.

SALLE, C. T. P.; SILVA, A. B. Prevenção de doenças/Manejo profilático/ Monitoração. In.: BERCHIERI JÚNIOR, A.; MACARI, M. **Doenças das aves**. Campinas: Facta, 2000. p. 3-12.

SESTI, Luiz. Biosseguridade em granjas de frangos de corte: conceitos e princípios gerais. In: SIMPÓSIO BRASIL SUL DE AVICULTURA, 5., 2004, Chapecó. **Anais**. Concórdia: Embrapa Suínos e Aves, 2004. p. 55-72.

SONCINI, R, A. Barreiras sanitárias na avicultura. In: SIMPÓSIO BRASIL SUL DE AVICULTURA, 5., 2004, Chapecó. **Anais**. Concórdia: Embrapa Suínos e Aves, 2004. p. 9.

TULMAN, E. R. et al. The genome of a very virulent Marek's disease virus. **Journal of Virology**, v. 74, n. 17, p. 7980-7988, Sept 2000.

VENUGOPAL, K. Marek's disease: an update on oncogenic mechanisms and control. **Research in Veterinary Science**. v. 69, p. 17-23, 2000.

WAKENELL, P.S., BRYAN, T., SCHAEFFER, J., AVAKIAN, A., WILLIAMS, C. & WHITFILL, C. Effect of *in ovo* vaccine delivery route on herpesvirus of turkeys/SB-1 efficacy and viremia. **Avian Diseases**. v. 46, p. 274-280, 2002.

WITTER, R. L.; SCHAT, K. A. Neoplastic diseases: Marek's disease. In: SAIF, Y. M., BARNES, H. J., FADLY, A. M., GLISSON, J. R., MCDUGALD, L. R.; SWAYNE, D. E. (Eds). **Diseases of poultry**. 11th ed. Ames: Iowa State University. 2003. p. 407-465

WITTER, R. L. Characteristics of Marek's disease viruses isolated from vaccinated commercial chicken flocks: association of viral pathotype with lymphoma frequency. **Avian Disease**. v. 27, p. 113-132, 1983.

WITTER, R. L. et al. Field trials to test the efficacy of polyvalente Marek's disease vaccines in broilers. **Avian Diseases**. v. 28, p. 44-60, 1984.

WITTER, R. L. Increased virulence of Marek' disease virus field isolates. **Avian Disease**. v. 41, p. 149-163, 1997.

YUNIS, R.; JAROSINSKI, K. W.; SCHAT, K. A. Association between rate of viral genome replication and virulence of Marek's disease herpesvirus strains. **Virology**. v. 328, p. 142-150, 2004.