

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

TITULAÇÃO DE VACINAS CONTRA O SOROTIPO 3 DO VÍRUS DA
DOENÇA DE MAREK POR PCR EM TEMPO REAL

Josiane Griebeler

Porto Alegre

2005

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

TITULAÇÃO DE VACINAS CONTRA O SOROTIPO 3 DO VÍRUS DA
DOENÇA DE MAREK POR PCR EM TEMPO REAL

Autor: Josiane Griebeler

Dissertação apresentada como requisito para
obtenção do grau de Mestre em Ciências
Veterinárias, na área de Medicina
Veterinária Preventiva – Sanidade Avícola.

Orientador: Prof. Dr. Cláudio Wageck Canal

Co-orientador: Prof. Dr. Nilo Ikuta

PORTO ALEGRE

2005

G848t Griebeler, Josiane

Titulação de vacinas contra o sorotipo 3 do vírus da Doença de Marek por PCR em tempo real/ Josiane Griebeler. – Porto Alegre: UFRGS, 2005.

42 f.; il. – Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Veterinária, Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, Porto Alegre, RS-BR, 2005. Cláudio Wageck Canal, Orient.

1. Sanidade avícola 2. PCR : aves : vírus HVT
3. Vacinas : Doença de Marek I. Canal, Cláudio Wageck, Orient.
II. Ikuta, Nilo, Co-orient. III. Título.

CDD 619.44

Aos meus pais, pelo exemplo de vida.

Aos meus irmãos e cunhado, pelo
carinho e incentivo.

Ao meu noivo, pelo amor e
companheirismo.

AGRADECIMENTOS

A Deus pela vida;

Ao prof. Dr. Cláudio Wageck Canal, pela oportunidade, confiança, orientação e apoio que foram imprescindíveis na realização desse trabalho;

Ao prof. Dr. Nilo Ikuta, pela valiosa co-orientação e ensinamentos repassados;

A prof^ª. Dra. Ana Paula Ravazzolo, pelas sugestões, incentivo e exemplo de perseverança;

Ao prof. Dr. Laerte Ferreira, pelo auxílio, principalmente, nos momentos em que tudo parecia dar errado;

Aos amigos e colegas do laboratório: Clarissa, Simone, Carla, Marisa, Cristiana, Laurício, Fabrício, Nilzane, Thales, André, Alfredo, Roberta, Laura, Márcia, Marina, Edna e Ubirajara pelo auxílio, conselhos, incentivo e amizade;

Às funcionárias Orema e Ana Cristina pelo carinho;

À empresa Simbios Biotecnologia Ltda por disponibilizar sua infra-estrutura e pessoal para que esse trabalho fosse realizado;

A todas as empresas produtoras de vacinas contra o vírus da doença de Marek que, gentilmente, cederam amostras das mesmas, imprescindíveis na realização desse trabalho;

A todas as pessoas que de alguma maneira auxiliaram na realização desse trabalho;

Ao Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias pela possibilidade de realização dessa dissertação;

Ao Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq) pela bolsa de mestrado.

RESUMO

A Doença de Marek é uma enfermidade linfoproliferativa das aves, causada por um alfa herpesvírus e caracterizada pela infiltração de células em nervos periféricos, gônadas, íris, vísceras, músculos e pele. Desde 1970, vacinas atenuadas têm sido utilizadas como ferramenta principal no controle da doença. Esse trabalho descreve a implantação da Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real (qPCR) para a titulação de vacinas contra o vírus da doença de Marek do sorotipo 3, herpesvírus dos perus (HVT). A qPCR foi comparada com a técnica tradicional de titulação, baseada no cultivo celular de fibroblastos de embrião de galinha. Foram avaliadas três vacinas vivas (congeladas, cepa FC126) provenientes de distintos fabricantes. A técnica molecular apresentou alta correlação entre os valores de *threshold cycle* (CT) e respectivas diluições das vacinas ($R^2 = 0,99$), indicando que, dentro desta faixa linear testada (10^2 a 10^4 PFU/dose), a qPCR foi capaz de quantificar as vacinas disponíveis no mercado. A reprodutibilidade da titulação em cultivo celular e qPCR foi avaliada pela realização dos testes em três dias distintos a partir de ampolas de um mesmo lote da vacina. Os títulos obtidos por ambos os métodos demonstraram alta reprodutibilidade e coerência com o fornecido pelo fabricante. Caracterizou-se também a proporção de vírus livres e associados às células, onde foi observado que, pelo menos, 90% dos vírus encontravam-se na forma associada. Este trabalho indicou que a qPCR é reprodutível, rápida e menos trabalhosa do que a titulação em cultivo celular tradicionalmente utilizada.

ABSTRACT

Marek's disease is a lymphoproliferative disease of chickens caused by an alphaherpesvirus and characterized by infiltration of cells in peripheral nerves, gonads, iris, various viscera, muscle and skin. Since 1970, attenuated vaccines have been used as the main tool for the control of the disease. This work describes the implementation of a real-time PCR (qPCR) assay and its applicability in the titration of vaccines based on serotype 3 (HVT) of Marek's disease virus. The qPCR assay was compared with the traditional titration technique based on embryo fibroblast cell culture. Three live frozen vaccines commercialized by three different laboratories (frozen, FC126 strain) were tested. The qPCR assay threshold cycle (CT) values were proportional to the vaccine dilutions. The analysis of the three vaccines produced a $R^2=0.99$ indicating qPCR as a valuable tool to titrate commercial vaccines in the dilutions tested in this work (10^2 until 10^4 plaque forming units/dose). To confirm the precision (reproducibility) of the two assays, three ampoules from the same batch were tested in different days in independent experiments. Both techniques, cell culture and qPCR, were highly reproducible. Also, the titers from both methods were similar to the titers indicated by the manufacturers. The evaluation of the proportion of cell-free and cell-associated virus in the vaccines through qPCR showed that at least 90% of the virus was in the cell-associated form. The qPCR assay reported here was effective, reproducible, fast and easier to process than the cell culture titration usually performed.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA.....	1
2 ARTIGO CIENTÍFICO	20
Titulação de vacinas contra o sorotipo 3 do vírus da doença de Marek por PCR em tempo real.....	21
REFERÊNCIAS	38

1 INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA

Das espécies domésticas exploradas comercialmente pelo homem, a galinha (*Gallus gallus*) é a que mais recebe o emprego de práticas de criação, como concentração da produção e integração vertical. Para isto, são incorporadas modernas metodologias científicas que visam uma melhor compreensão das interações entre genética, produção, meio ambiente, manejo, nutrição, saúde de rebanho e saúde pública (SESTI, 2004).

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). O país dispõe de um sistema de integração competente que concilia a eficiência produtiva dos avicultores com a capacidade de produção em escala dos frigoríficos, sendo 80% da produção avícola nacional integrada à agroindústria (AVICULTURA..., 2004).

O Brasil é hoje o maior exportador mundial de frangos em receita e o segundo em volume, comercializando seus produtos para mais de 120 países. O faturamento do setor avícola brasileiro é igual a 1,5% do PIB nacional (MARSHALL, 2004). Conforme dados preliminares da Associação Brasileira dos Produtores e Exportadores de Frangos (ABEF), o Brasil foi o terceiro maior produtor mundial de carnes de frango no ano de 2004, com uma produção de 8,4 milhões de toneladas.

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

Nesse contexto, as enfermidades virais recebem especial atenção, a exemplo da doença de Marek, uma doença linfoproliferativa das aves causada por um herpesvírus e caracterizada pela infiltração de células em um ou mais dos nervos periféricos, gônadas, íris, vísceras, músculos e pele (WITTER; SCHAT, 2003). 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).

A doença de Marek foi descrita pela primeira vez em 1907 por József Marek, na Hungria, como uma paralisia das aves causada pela infiltração mononuclear no plexo do nervo ciático (MAREK apud WITTER; SCHAT, 2003). Alguns anos depois, com os trabalhos de Pappenheimer et al. (1926, apud WITTER; SCHAT, 2003), ficou conhecida a natureza linfoproliferativa das lesões nos nervos periféricos e gânglio espinhal e as neoplasias linfóides dos ovários e em outros órgãos viscerais.

Inicialmente, o vírus da doença de Marek (MDV) foi classificado dentro da subfamília *Gamaherpesvirinae* por possuir tropismo por linfócitos, além de outras propriedades biológicas específicas. Mais recentemente, com a caracterização da estrutura molecular e organização genômica, o MDV foi incluído na subfamília *Alphaherpesviridae* (WITTER; SCHAT, 2003) e um novo gênero foi criado devido às propriedades genéticas e biológicas distintas deste grupo: *Marek's disease-like viruses* (VAN REGENMORTEL et al. 1999, apud BAATEN; BUTTER; DAVISON, 2004)

As partículas virais do MDV são típicas dos herpesvírus, sendo os vírions encontrados no núcleo e, mais raramente, no citoplasma e espaços extracelulares. Os nucleocapsídeos medem de 85 a 100 nm, e as partículas envelopadas têm 150 a 160 nm de diâmetro. As partículas virais preparadas do epitélio do folículo da pena medem 273 a 400 nm, e possuem uma aparência amorfa. O MDV possui genoma linear com moléculas de DNA fita dupla de, aproximadamente, 160 a 180 mil pares de bases (WITTER; SCHAT, 2003) que se supõe codificar para 103 proteínas (TULMAN et al., 2000).

Três sorotipos do MDV são descritos na literatura baseados no reconhecimento de epitopos comuns e distintos para cada sorotipo através de testes de vírus neutralização, precipitação em ágar gel e imunofluorescência. O sorotipo 1 inclui as amostras oncogênicas e virulentas do vírus, como a RB1B, Md5 e GA e também, a naturalmente avirulenta CVI 988 (Rispens), a qual é amplamente utilizada como vacina. O sorotipo 2 compreende os vírus isolados de galinhas clinicamente normais e são amostras apatogênicas ou de baixa patogenicidade, como a SB-1. O sorotipo 3 inclui os herpesvírus isolados de perus (HVT) que são utilizados na forma de vacinas contra a doença de Marek em galinhas (KAWAMURA; KING; ANDERSON, 1969; OKASAKI; PURCHASE; BURMESTER, 1970; RISPENS et al., 1972a; RISPENS et al., 1972b). As amostras do sorotipo 1 são ainda divididas em patótipos, referenciados como *mild* (m)MDV, *virulent* (v)MDV, *very virulent* (vv)MDV, e *very virulent plus* (vv+)MDV (WITTER; SCHAT, 2003).

A replicação dos três sorotipos do MDV é semelhante a outros herpesvírus associados às células. A infecção inicial por vírions envelopados, associados ou não às células, ocorre pela adsorção e penetração nas células susceptíveis. A transferência da infecção célula a célula é aumentada pela formação de pontes intracelulares e esse é, provavelmente, o principal modo de disseminação do vírus *in vitro* e *in vivo*. Três tipos gerais de interação vírus/célula são reconhecidos: produtiva, latente e transformante (WITTER; SCHAT, 2003).

Na infecção produtiva ocorre replicação do DNA viral e síntese de proteínas. Quando a infecção ocorre no epitélio do folículo de penas ocorre a produção de um grande número de vírions infecciosos completamente envelopados e é denominada “completamente produtiva”. Esta difere da infecção “produtiva restritiva” onde a maioria dos vírions não é envelopada e nem infecciosa, replicando em linfócitos B, algumas células epiteliais e em culturas de células (WITTER; SCHAT, 2003).

A infecção latente é definida pela presença de DNA viral e ausência de transcritos virais. A infecção não é produtiva e pode ser detectada através de métodos moleculares e pela reativação do genoma viral, como o cultivo *in vitro* (WITTER; SCHAT, 2003).

A infecção transformante ocorre somente em células infectadas com o sorotipo 1 do MDV. O fenótipo transformado é caracterizado pela expressão limitada de alguns genes do MDV, o que dificulta a diferenciação com a infecção latente. O principal, e muitas vezes o único, antígeno viral produzido pelas células transformadas é o pp38. Essas células também expressam um antígeno associado à superfície de tumores (MATSA), codificado pelas próprias células, o qual é importante para o diagnóstico diferencial da doença de Marek (WITTER; SCHAT, 2003).

Em culturas de células, a penetração viral ocorre dentro de uma hora após a inoculação do vírus no tapete celular e esse tempo é aumentado para o sorotipo 1 por fatores como ácido etilenodiaminotetracético - EDTA (ADLDINGER; CALNEK, 1972 apud WITTER; SCHAT, 2003). A difusão subsequente da infecção para outras células ocorre por contato direto com as células infectadas e a transferência do vírus, provavelmente, é acompanhada pela formação de pontes intracelulares (WITTER; SCHAT, 2003). Estudos recentes sugerem que as proteínas virais gE e gI possam ser importantes para a transferência do vírus a partir de células infectadas para células não infectadas (SCHUMACHER et al., 2001). As taxas de replicação viral variam com o

sorotipo do vírus, nível de passagem celular da amostra do vírus, tipo de célula e temperatura de incubação (WITTER et al., 1990).

A principal forma de transmissão natural da doença de Marek é pelo contato direto e indireto entre as galinhas. O MDV associado às penas e excretas é a principal fonte de infecção e permanece contaminando galpões por muitos meses. As aves começam a excretar o vírus por volta de duas semanas após a sua inoculação, sendo o nível máximo na terceira e quinta semanas (WITTER; SCHAT, 2003). Uma vez infectadas, as galinhas parecem excretar indefinidamente o vírus (WITTER et al., 1971). A transmissão vertical do vírus não ocorre (SOLOMON; WITTER, 1973) e a transmissão para a progênie através da contaminação externa do ovo é pouco provável em função da baixa sobrevivência do vírus aos níveis de temperatura e umidade utilizados durante o período de incubação dos ovos (CALNEK; HITCHNER, 1973).

De acordo com Shek et al. (1983, apud MORIMURA et al., 1998), as galinhas são, normalmente, infectadas pelo MDV durante as primeiras semanas de vida. Os vírus oncogênicos livres de células infectam naturalmente as galinhas via trato respiratório e chegam aos órgãos linfóides, provavelmente, através de macrófagos alveolares. Nos órgãos linfóides, o MDV, inicialmente, causa uma infecção citolítica de células B, induzindo a uma depressão da imunidade humoral (PAYNE; FRANZIER; POWELL, 1976 apud MORIMURA et al., 1998). Depois da fase citolítica, o MDV estabelece a infecção latente em linfócitos, principalmente células T CD4+; embora células T CD8+ e células B também possam estar envolvidas (WITTER; SCHAT, 2003). Durante a fase latente, as células T são transformadas e desenvolvem tumores em vários órgãos viscerais em 2 a 3 semanas após a infecção. Sugere-se que a infecção citolítica de células B ativa as células T, sendo essa ativação de células T um pré-requisito para a infecção e transformação das células (ROSS, 1999).

As galinhas são os hospedeiros naturais mais importantes para a doença de Marek, embora codornas, perus e faisões sejam também susceptíveis à infecção pelo MDV e desenvolvimento da doença (WITTER; SCHAT, 2003). Praticamente todas as galinhas, incluindo aves nativas e aves selvagens, são susceptíveis à infecção pelo MDV e desenvolvimento de tumores (CHO; KENZY, 1975). A maioria das outras espécies de aves, incluindo patos, pardais, perdizes e pombos é, provavelmente, refratária; embora patos inoculados com o MDV tenham desenvolvido anticorpos (KENZY; CHO, 1969). Mamíferos, incluindo várias espécies de primatas, também são refratários à inoculação experimental. Camundongos inoculados com células tumorais provenientes de aves que

desenvolveram a doença de Marek a campo tiveram uma alta taxa de neoplasias, contudo o papel etiológico do MDV nesses tumores não foi determinado (WITTER; SCHAT, 2003).

Os sinais clínicos associados com a doença de Marek variam de acordo com a síndrome específica. Em geral, os sinais relacionados com a disfunção dos nervos periféricos são àqueles associados com paresia seguida de paralisia espástica completa de uma ou mais das extremidades. O envolvimento do nervo vago pode levar à disfunção do papo, o qual pode aumentar muito de volume. A incoordenação e posturas incomuns das aves são, normalmente, os primeiros sinais observados em função dos distúrbios locomotores presentes na doença de Marek (CANAL; SILVA, 2000).

Um sinal clínico particularmente observado nas aves como resultado da paresia unilateral ou paralisia das patas é o estiramento de uma das patas da ave para frente e outra para trás do tronco. A síndrome da paralisia transitória foi descrita e reproduzida, embora não ocorra com frequência desde que a vacinação tem sido empregada. Existem duas formas dessa síndrome, a clássica e a aguda. Na forma clássica, as galinhas afetadas mostram graus variados de ataxia e paralisia flácida do pescoço ou membros que iniciam 8 a 12 dias após a inoculação do vírus e duram 1 a 2 dias. Algumas aves recuperam-se e podem, posteriormente, morrer em decorrência da doença de Marek clínica. A forma aguda resulta em morte das aves 24 a 72 horas após o início dos sinais de paralisia (WITTER et al., 1999).

A síndrome de mortalidade precoce resulta em alta mortalidade, observada 8 a 10 dias após a infecção de aves jovens com amostras virulentas do MDV (WITTER; SHARMA; FADLY, 1980). As aves apresentam severa depressão e morrem 48 horas após o início dos sinais. Galinhas com envolvimento ocular podem evidenciar cegueira, uni ou bilateral. A cegueira pode ser um resultado do envolvimento da íris e perda da habilidade de adequação à intensidade de luz. A pupila pode tornar-se irregular e, em estádios adiantados, torna-se somente um pequeno ponto (WITTER; SCHAT, 2003).

Sinais clínicos não específicos, como perda de peso, anorexia e diarreia, podem ser observados, especialmente, em aves em que o curso da doença é prolongado. Muitas vezes as aves morrem em decorrência da inanição por não conseguirem se deslocar até os comedouros e bebedouros (WITTER; SCHAT, 2003).

O MDV está presente em todos os países do mundo, principalmente naqueles em que a avicultura industrial se faz presente. A incidência da doença de Marek é bastante variável entre os lotes comerciais de aves. Antes da utilização de vacinas, a mortalidade

nos lotes afetados variava de poucas aves até 30% e, ocasionalmente, 60%. Atualmente, a maioria dos lotes de poedeiras é vacinada, o que reduziu as perdas para menos de 5% na maioria dos países. Nos frangos de corte, que também são vacinados em muitos países, a mortalidade varia de 0,1 a 0,5% e as condenações de 0,2% ou mais (WITTER; SCHAT, 2003).

Vários fatores relacionados ao vírus, hospedeiro e meio ambiente influenciam as perdas nos lotes afetados com a doença de Marek. Cepas do vírus associadas com surtos agudos da doença de Marek são mais virulentas, causam uma maior incidência da doença e mais linfomas viscerais do que as cepas associadas à forma clássica (CANAL; SILVA, 2000). Na Coreia, em 1997, por exemplo, o aumento repentino da doença de Marek foi relacionado com o aumento da virulência do vírus (SUNG, 2002). Em geral, as cepas mais virulentas podem causar síndrome de mortalidade precoce (WITTER; SHARMA; FADLY, 1980) e a infecção com as cepas vv+ pode resultar em dano prolongado ou permanente dos tecidos linfóides (CALNEK et al., 1998), o que é, provavelmente, consequência da prolongada replicação do vírus, resultando em ausência de latência (YUNIS, JAROSINSKI, SCHAT, 2004; JAROSINSKI et al., 2002).

Witter e colaboradores (1999), baseados nos sinais clínicos e na histopatologia de aves inoculadas com cepas altamente virulentas do MDV, determinaram uma nova forma aguda da paralisia transitória, sendo diferenciada da paralisia transitória clássica por sua natureza mais aguda e pela ausência, quase total, de recuperação espontânea das aves. Além da paralisia transitória clássica e paralisia transitória aguda, Gimeno et al. (1999) observaram duas novas síndromes neurológicas, as quais são influenciadas pela linhagem das aves e patótipo do vírus, sendo denominadas de enfermidade neurológica persistente e paralisia tardia. Mais recentemente, um novo sistema de classificação do MDV, baseado na resposta neurológica induzida pelo mesmo, foi proposto (GIMENO et al., 2002).

Vários trabalhos relacionando à resistência genética das aves para a doença de Marek estão disponíveis na literatura. Dois *loci* genéticos distintos que têm um importante papel no controle da resistência à doença de Marek foram identificados. A melhor associação caracterizada da resistência genética envolve o complexo de histocompatibilidade principal (MHC) das galinhas e a mais notável é a associação com o alelo B²¹ (LONGENECKER et al., 1977 apud VENUGOPAL, 2000). Um segundo tipo de resistência associada com genes que não do MHC foi observado em galinhas da

linhagem RPL 6₁ e 7₂, ambas homozigotas para o mesmo alelo do MHC, que demonstraram uma diferença acentuada na susceptibilidade à doença (COLE, 1968 apud VENUGOPAL, 2000).

Burgess e colaboradores (2001), utilizando aves resistentes à doença de Marek da linhagem N com haplótipo MHC B²¹ e da linhagem 6₁ com haplótipo MHC B² e aves susceptíveis da linhagem 7₂ com haplótipo MHC B² e da linhagem 15I com haplótipo MHC B¹⁵, observaram diferenças na susceptibilidade à doença genótipo-dependente, quando infectadas com a cepa HPRS-16 do MDV. Essa resistência genótipo-dependente ocorreu nas fases citolítica, latente e tumoral da doença.

Os trabalhos de Xing e Schat (2000) demonstraram que as culturas de fibroblastos de embrião de galinha obtidas da linhagem N2a possuem um maior potencial de produção de óxido nítrico do que as culturas obtidas de galinhas da linhagem P2a quando tratadas com interferon gama recombinante de galinhas e lipopolissacarídeo (LPS), sugerindo que o óxido nítrico pode ser um dos fatores envolvidos na resistência genética para a doença de Marek. Jarosinski et al. (2002) desafiaram aves com cepas atenuadas a muito virulentas do MDV e observaram que as cepas virulentas induziram níveis altos de produção de óxido nítrico no plasma dessas aves. Esses resultados sugerem que o óxido tem algum papel na patogênese da doença quando a mesma é ocasionada por cepas virulentas.

Djeraba et al. (2002) demonstraram que o interferon gama pode mediar à inibição da replicação do MDV através do óxido nítrico. Levy et al. (2003) sugeriram que a capacidade do interferon gama de regular o efeito inibitório do MDV oncogênico no MHC classe I desencadeia um importante papel na imunidade anti-MDV em galinhas. Fatores ambientais e infecções intercorrentes também afetam a incidência e a severidade da doença de Marek, como altas concentrações de aves, micotoxinas e infecções com outros vírus imunodepressores como, por exemplo, o vírus da anemia das galinhas (CANAL; SILVA, 2000).

Após a infecção pelo MDV, uma resposta imune humoral e mediada por células desenvolve-se nas aves imunocompetentes. Estas respostas podem ser direcionadas contra um grande número de antígenos do vírus e do tumor do próprio hospedeiro (CANAL; SILVA, 2000). Anticorpos vírus neutralizantes e precipitantes podem ser detectados em galinhas uma a duas semanas após o contato com o vírus e persistem durante toda a vida da ave. A maioria dos anticorpos não é relevante para uma resposta imune protetora contra a doença de Marek porque detectam proteínas não estruturais ou

proteínas que não são expressas no envelope viral ou na superfície de células infectadas pelo vírus. Anticorpos vírus neutralizantes são importantes somente quando galinhas são infectadas com vírus livres de células ou quando proteínas do MDV são expressas na superfície de células (WITTER; SCHAT, 2003).

Os anticorpos maternos reduzem a infecção citolítica (BURGOYNE; WITTER, 1973; CALNEK; SMITH, 1972) e podem interferir na imunidade vacinal por neutralizar a vacina antes que esta tenha induzido resposta imune (BAATEN; BUTTER; DAVIDSON, 2004). A resistência inata provida por células *natural killer*, macrófagos e citocinas podem ser importantes no controle da doença. Devido à resposta de anticorpos não ser necessária para a resistência à doença de Marek, deduz-se que a imunidade mediada por células seja importante, visto que células T e imunidade vacinal são necessárias para a proteção (CANAL; SILVA, 2000).

Vacinas com vírus vivos, seja o HVT, sorotipo 2, ou sorotipo 1 atenuado; protegem contra a replicação precoce dos vírus virulentos nos órgãos linfóides e reduzem o nível de infecção latente. As vacinas não previnem a infecção ou a eliminação do MDV virulento, mas evitam a formação de tumores. As vacinas inativadas induzem somente resposta de anticorpos. Embora essas vacinas estimulem níveis variáveis de proteção, não está claro se a resposta imune é direcionada contra aloantígenos expressos nas células tumorais ou contra antígenos virais. O MDV também causa uma depressão da resposta imune das aves, alterando a susceptibilidade das mesmas a outros patógenos (WITTER; SCHAT, 2003).

O diagnóstico da doença de Marek é feito com base nos sinais clínicos, lesões micro e macroscópicas, mortalidade, morbidade e idade das aves, entre outros. São comuns o aumento do diâmetro dos nervos periféricos e os linfomas viscerais em aves com a doença de Marek; no entanto, essas lesões não são patognomônicas. Assim, outros critérios, como a idade das aves e a localização das lesões, devem ser levados em consideração. Historicamente, as aves são consideradas positivas para a doença de Marek quando um dos seguintes achados estiver presente: aumento do volume dos nervos periféricos; tumores linfóides em vários tecidos de aves com menos de 16 semanas, como no fígado, pele, coração, gônadas, proventrículo e músculos; tumores linfóides em aves com mais de 16 semanas sem o envolvimento da bolsa de Fabrício; descoloração da íris e irregularidade da pupila. No entanto, o diagnóstico baseado somente nos critérios patológicos da doença não pode ser considerado definitivo e testes

laboratoriais devem ser incluídos para auxiliar na identificação da doença de Marek (WITTER; SCHAT, 2003).

O exame histológico de seções de tecidos corados com hematoxilina e eosina revela uma população mista de linfócitos pequenos e grandes, linfoblastos, plasmócitos e macrófagos em tumores da doença de Marek. A proporção do tipo de célula em tumores varia com o estágio da doença e com a virulência do vírus. Células CD4+, marcador celular AV37 e MATSA são normalmente encontrados nas células tumorais presentes na doença de Marek (WITTER; SCHAT, 2003).

A detecção de anticorpos específicos no soro de galinhas é útil em estudos da patogênese viral e para monitoramento de lotes livres de patógenos específicos. Esses anticorpos podem ser detectados através de testes como vírus neutralização, ágar gel precipitação, imunofluorescência e ELISA. No entanto, nenhum desses testes diferencia anticorpos contra os três sorotipos do vírus (WITTER; SCHAT, 2003).

A detecção de antígenos virais pode ser feita usando preferencialmente anticorpos monoclonais preparados contra epitopos comuns e específicos aos três sorotipos. Os antígenos virais podem ser detectados no epitélio do folículo da pena, tecidos linfóides infectados citoliticamente, cérebro ou culturas de células infectadas através do uso de anticorpos apropriados para testes de imunofluorescência, imunohistoquímica, precipitação em ágar gel e ELISA (WITTER; SCHAT, 2003). Antígenos virais, como pp38 ou *meq*, podem ser detectados em células tumorais por imunohistoquímica ou imunofluorescência. A técnica de hibridização *in situ* e a reação em cadeia da polimerase (PCR) são utilizadas para detectar o DNA do MDV em células tumorais (ROSS et al., 1997). Partículas de herpesvírus podem ser detectadas por microscopia eletrônica no epitélio do folículo da pena e em células infectadas produtivamente *in vitro* (CALNEK; ADLDINGER; KAHN, 1970). O MDV pode ser detectado a partir de um a dois dias após a infecção ou cinco dias após a exposição e daí até o fim de vida da ave (WITTER; SCHAT, 2003).

O MDV pode ser isolado e multiplicado em cultivos celulares para posterior caracterização ou produção de vacinas (CANAL; SILVA, 2000). Devido à forte associação do vírus com células, células viáveis são o inóculo preferido, embora preparações livres de células da pele, excretas e folículo da pena possam conter o MDV infeccioso (CALNEK; ADLDINGER; KAHN, 1970). As células de rim de galinhas e fibroblastos de embriões de patos são os substratos preferidos para o isolamento primário do sorotipo 1 do MDV, enquanto que células de fibroblastos de embriões de

galinhas normalmente são usadas para o isolamento do sorotipo 2 e 3, como também para o isolamento de amostras de vacinas atenuadas do sorotipo 1. As placas de lise celular, caracterizadas por grupos de células arredondadas e refratárias induzidas nessas culturas pelos diferentes sorotipos, podem ser distinguidas morfológicamente com alguma prática (WITTER, 1983). Contudo, a detecção e caracterização por anticorpos monoclonais específicos para o sorotipo promovem uma diferenciação mais acurada (WITTER; SCHAT, 2003). O tempo ótimo para observação das placas de lise varia com o tipo de célula utilizada e com o sorotipo do vírus (WITTER; SCHAT, 2003).

Testes de PCR qualitativo, semiquantitativo e quantitativo são utilizados para detectar e tipificar o MDV (BECKER et al., 1992; DAVIDSON; BORENSHTEIN; WEISMAN, 2002; BORENSHTEIN; DAVIDSON, 1999; BUMSTEAD et al., 1997; REDDY; WITTER; GIMENO, 2000; HANDBERG; NIELSEN; JORGENSEN, 2001; BURGESS; DAVISON, 1999). Nos últimos anos, a PCR em tempo real tem emergido como uma técnica importante para a análise e quantificação de ácidos nucleicos de vários patógenos virais (MACKAY; ARDEN; NITSCHKE, 2002). Vários trabalhos na área da virologia humana e animal são publicados validando a tecnologia da PCR em tempo real e muitas estratégias para a detecção do DNA/RNA viral são baseadas no uso de sistema *TaqMan* (NIESTERS, 2001). A PCR em tempo real é cada vez mais preferida à PCR convencional por não requerer manipulações laboriosas após a amplificação das amostras, sendo os resultados gerados dentro de poucas horas. Uma sonda fluorogênica desenhada para anelar especificamente entre dois *primers* na seqüência alvo é clivada a cada ciclo de extensão, liberando o fluorocromo que permite que os produtos amplificados sejam quantificados no momento em que são gerados. Assim, não é utilizada a eletroforese para quantificar o *amplicon*. Outras vantagens da técnica incluem a sensibilidade aumentada, o uso do sistema em tubos fechados que reduz os riscos de contaminação, a habilidade de realizar reações múltiplas simultaneamente (BAIGENT et al., 2005; NIESTERS, 2001). Na literatura, existem trabalhos que descrevem a utilização da PCR em tempo real para quantificação do MDV (ISLAM et al., 2004; BAIEGENT et al., 2005).

Não existe nenhum tratamento efetivo para a doença de Marek. Portanto, medidas de controle e prevenção devem ser adotadas para diminuir os prejuízos da infecção pelo MDV. A vacinação representa a estratégia central para a prevenção e o controle da doença, contudo, a seleção genética e as práticas de biosseguridade também são importantes (CANAL; SILVA, 2000).

Existem vacinas para a doença de Marek baseadas nos três sorotipos virais, combinações destes sorotipos, e vacinas de DNA recombinante estão em estudo (OKAZAKI; PURCHASE; BURMESTER, 1970; RISPENS et al., 1972a; RISPENS et al., 1972b; WITTER et al., 1984; WITTER, 1991; REDDY et al., 1996; ROSS, 1998; SAKAGUCHI et al., 1998; TISCHER et al., 2002). Os vírus do sorotipo 1 atenuados, normalmente, induzem uma resposta imune mais efetiva quando comparados aos demais sorotipos, provavelmente, em função de sua similaridade antigênica com as amostras oncogênicas. Isolados naturalmente avirulentos do sorotipo 2 têm sido utilizados combinados ao HVT, devido à atividade sinérgica entre os sorotipos 2 e 3 na indução de imunidade protetora (WITTER, 1998). Vacinas de DNA recombinante, como a do vírus da bouba aviária que expressa a proteína gB do sorotipo 1 do MDV, têm demonstrado níveis significativos de proteção (NAZERIAN et al., 1992). O HVT recombinante que expressa os antígenos F e HN do vírus da doença de Newcastle, bem como as proteínas gC e gB do sorotipo 1 do MDV, quando administrado *in ovo*, protegeu as aves contra a doença de Newcastle sistêmica e também contra o desafio com a cepa RB1B do MDV (REDDY et al., 1996).

As vacinas do sorotipo 1 e 2 são disponíveis somente na forma associada à células, enquanto que as vacinas do sorotipo 3 (HVT) são disponíveis tanto na forma associada à células como na forma livre (WITTER; SCHAT, 2003). As vacinas contra a doença de Marek, geralmente, são bastante efetivas e, freqüentemente, induzem altos níveis de proteção em condições comerciais. No entanto, o aumento progressivo da virulência das amostras de campo do MDV e a exposição precoce das aves aos vírus virulentos de campo fazem com que haja risco de uma cobertura vacinal incompleta (WITTER; SCHAT, 2003).

As vacinas são, normalmente, administradas após a eclosão, por via parenteral, em doses usualmente maiores que 1.000 unidades formadoras de placas (PFU) (CANAL; SILVA, 2000). Estudos têm demonstrado que o uso de doses mais altas da vacina ou a prática de revacinação das aves oferecem pouca melhora nos resultados, não sendo, portanto, justificável sua utilização (BALL; LYMAN, 1977). As vacinas também são efetivas quando administradas em embriões com 18 dias de incubação, principalmente, por acelerar o desenvolvimento da imunidade em alguns dias antes da eclosão (SHARMA; BURMESTER, 1982). Após a administração das vacinas, são necessários até sete dias para que uma imunidade sólida seja estabelecida nas aves (CANAL; SILVA, 2000). Para assegurar que doses adequadas da vacina sejam

administradas às aves, a correta manipulação das mesmas é crucial durante o descongelamento, reconstituição e aplicação (HALVORSON; MITCHELL, 1979).

Este trabalho teve como objetivo implantar a técnica de PCR em tempo real (qPCR) para a quantificação de MDV sorotipo 3 em vacinas e averiguar o potencial deste método no controle de qualidade dos títulos das mesmas. Para isto, a qPCR foi comparada com a técnica tradicional de titulação da vacina HVT baseada no cultivo celular de fibroblastos de embrião de galinha.

2 ARTIGO CIENTÍFICO

2.1 Titulação de vacinas contra o sorotipo 3 do vírus da doença de Marek por PCR em tempo real

Trabalho que será submetido à Revista Pesquisa Veterinária Brasileira.

Titulação de vacinas contra o sorotipo 3 do vírus da doença de Marek por PCR em tempo real

Titration of Marek's disease virus serotype 3 vaccines through real-time PCR

J. Griebeler³, N. Ikuta^{1,2}, T.R. Boeira¹, C.R. Rodenbusch³, L.L. de Almeida³, V.R. Lunge^{1,2}, A.S.K. Fonseca¹, C.W. Canal^{3*}

¹Simbios Biotecnologia, Canoas, RS, Brasil.

²Universidade Luterana do Brasil (ULBRA), Canoas, RS, Brasil.

³Laboratório de Virologia, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Av. Bento Gonçalves 9090, CEP 91540-000, Porto Alegre, RS, Brasil.

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

ABSTRACT.- J. Griebeler, N. Ikuta, T.R. Boeira, C.R. Rodenbusch, L.L. de Almeida, V.R. Lunge, A.S.K. Fonseca, C.W. Canal. 2005. [**Titration of Marek's disease virus serotype 3 vaccines through real-time PCR**]. Titulação de vacinas contra o sorotipo 3 do vírus da doença de Marek por PCR em tempo real. *Pesquisa Veterinária Brasileira* XX(X):XX-XX. Laboratório de Virologia, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves 9090, Porto Alegre, RS 91540-000, Brasil. E-mail: claudio.canal@ufrgs.br

This paper describes the implantation of a real-time PCR (qPCR) assay and its applicability in the titration of vaccines based on serotype 3 (HVT) of Marek's disease virus. The qPCR assay was compared with the traditional titration technique based on embryo fibroblast cell culture. Three live frozen vaccines commercialized by three different laboratories were tested. The qPCR assay threshold cycle (CT) values were proportional to the vaccine dilutions. The three vaccines produced a R^2 0.99 indicating that is possible to titrate any vaccine commercialized in the dilution ratios used (10^2 until 10^4 plaque forming units/dose) through qPCR. To confirm the precision (reproducibility) of the two assays, three ampoules from the same batch were tested in different days. Both techniques, cell culture and qPCR, were highly reproducible. Also, the titers from both methods were similar to the titers indicated by the manufacturers. The evaluation of the proportion of cell-free and cell-associated virus in the vaccines through qPCR showed that at least 90% of the virus was in the cell-associated form. The qPCR assay reported here was effective, reproducible, fast and easier to process than the cell culture titration usually performed.

Index terms: titration, Marek disease virus, vaccine, HVT, cell culture, PCR.

RESUMO.- Esse trabalho descreve a implantação da Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real (qPCR) para a titulação de vacinas contra o vírus da doença de Marek do sorotipo 3, herpesvírus dos perus (HVT). A qPCR foi comparada com a técnica tradicional de titulação, baseada no cultivo celular de fibroblastos de embrião de galinha. Foram avaliadas três vacinas vivas (congeladas, cepa FC126) provenientes de distintos fabricantes. A técnica molecular apresentou alta correlação entre os valores de *threshold cycle* (CT) e respectivas diluições das vacinas ($R^2 = 0,99$), indicando que, dentro desta faixa linear testada (10^2 a 10^4 PFU/dose), a qPCR foi capaz de quantificar

as vacinais disponíveis no mercado. A reprodutibilidade da titulação em cultivo celular e qPCR foi avaliada pela realização dos testes em três dias distintos a partir de ampolas de um mesmo lote da vacina. Os títulos obtidos por ambos os métodos demonstraram alta reprodutibilidade e coerência com o fornecido pelo fabricante. Caracterizou-se também a proporção de vírus livres e associados às células, onde foi observado que, pelo menos, 90% dos vírus encontram-se na forma associada. Este trabalho indica que a qPCR é reprodutível, rápida e menos trabalhosa do que a titulação em cultivo celular tradicionalmente utilizada.

Termos de indexação: titulação, vírus da doença de Marek, vacina, HVT, cultivo celular, qPCR.

INTRODUÇÃO

A doença de Marek é uma enfermidade linfoproliferativa das aves causada por um alfa herpesvírus e caracterizada pela infiltração de células em nervos periféricos, gônadas, íris, vísceras, músculos e pele (Witter & Schat 2003). 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).

O desenvolvimento de vacinas para o controle da doença de Marek ocorreu no final da década de 60 e representou um grande avanço nas pesquisas de patologia aviária e oncologia, já que foi a primeira vacina efetiva contra o câncer em todas as espécies (Canal & Silva 2000). Atualmente, existem vacinas para a doença de Marek baseadas nos três sorotipos virais (Okazaki et al. 1970, Rispens et al. 1972a, Rispens et al. 1972b, Witter et al. 1984, Witter 1991) e vacinas de DNA recombinante estão sendo desenvolvidas (Reddy et al. 1996, Ross 1998, Sakaguchi et al. 1998, Tischer et al. 2002).

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). De forma geral, as empresas avícolas que utilizam as vacinas não controlam os títulos virais, já que a técnica é demorada, necessitando de, em média, sete dias, além de ser de difícil execução no que diz respeito à disponibilidade de ovos SPF e estrutura laboratorial para cultivo celular, entre outros fatores. Além disso, cada empresa produtora de vacina utiliza um protocolo próprio para controle de qualidade dos títulos das mesmas, o que dificulta a comparação dos resultados. A determinação dos títulos virais é de suma importância num programa de vacinação, já que este é o parâmetro principal para uma resposta imunológica eficiente.

A reação em cadeia da polimerase (PCR) tem sido amplamente utilizada para a detecção e quantificação do ácido nucléico de vários patógenos virais (Mackay et al. 2002). Atualmente, estudos na área da virologia humana e animal abordam a validação da quantificação viral através do uso de um novo sistema denominado PCR em tempo real - *real time* PCR (Niesters 2001). Uma das formas, denominada *Taqman PCR* 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.

Islam e colaboradores (2004) desenvolveram uma PCR em tempo real (qPCR) que avalia a viremia dos três sorotipos do MDV em galinhas, determinando com precisão a relação entre a vacinação e a excreção de amostras desafio. Baigent et al. (2005) propuseram um método de qPCR que possibilitou a quantificação do MDV em relação ao número de células do hospedeiro.

O presente trabalho teve como objetivo verificar o potencial da técnica de qPCR na quantificação de vacinas comerciais contra o MDV do sorotipo 3. Para isto, a qPCR foi comparada com a técnica tradicional de titulação das vacinas para doença de Marek baseada no cultivo de FEG.

MATERIAL E MÉTODOS

Vacinas

Foram tituladas três vacinas vivas contra o MDV do sorotipo 3 (*herpesvirus turkey*, HVT), congeladas e associadas à células, disponíveis comercialmente e provenientes de três laboratórios produtores de vacinas. Essas vacinas foram armazenadas e transportadas em nitrogênio líquido até o momento das análises.

Células

Cultivos de fibroblasto de embrião de galinha (FEG) foram preparados a partir de ovos embrionados de galinhas livres de patógenos específicos (SPF, Granja Rezende, MG) com 11 dias de incubação, de acordo com os procedimentos padrões de cultivo celular propostos por Rovozzo & Burke (1973). As culturas de células foram mantidas em estufa a 38°C, em atmosfera úmida e 5% de CO₂. As células foram cultivadas e mantidas em meio mínimo essencial de Eagle (Gibco – Invitrogen Corporation, cat. n. 41500-067) 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, cat. n. 10270-160) no cultivo primário e na titulação, respectivamente.

Titulação das vacinas através do cultivo celular

As vacinas foram tituladas em placas de Petry (60 x 15 mm) contendo uma camada confluyente de células secundárias de FEG. Cada vacina foi reconstituída no seu respectivo diluente (200 mL), conforme as recomendações do fabricante, sendo então realizadas diluições seriais em base logarítmica em meio mínimo essencial de Eagle com 2% de soro fetal bovino (Wakenell et al. 2002). Foram tituladas três diluições ($10^{-4,9}$, $10^{-5,2}$ e $10^{-5,51}$) utilizando-se 2 mL de cada diluição. Utilizou-se meio mínimo essencial de Eagle com 1% de metilcelulose (Sigma, cat. n. M0512) na titulação. Utilizaram-se cinco placas por diluição de cada vacina, além de uma placa controle. O procedimento de titulação usado foi o descrito por Landman & Verschuren (2003). 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 a determinação do número de unidades formadoras de placa (PFU) foi calculada utilizando-se a contagem da diluição que continha entre 20 e 80 PFU por placa. O título da vacina foi expresso em PFU por dose (0,2 mL) e foi obtido multiplicando-se o número médio de PFU pelo fator de diluição e dividindo-se pelo fator de correção do inóculo.

Reprodutibilidade da técnica de cultivo celular

Para verificar a reprodutibilidade da técnica de titulação de vacinas através do cultivo celular, três ampolas de um mesmo lote de vacinas foram tituladas em dias diferentes, conforme protocolo descrito acima.

Extração de DNA

O DNA do vírus HVT foi extraído a partir de alíquotas das vacinas reconstituídas utilizadas na titulação em cultivo de FEG, de acordo com o protocolo descrito por Boom et al. (1990). Alíquotas de 100 μ L de amostras da vacina foram transferidas para tubos de 1,5 mL contendo 900 μ L de solução de lise (5 M tiocianato de guanidina, 0,1 M Tris HCl pH 6,9, 1% Triton X-100 e 0,5 M EDTA) e incubadas a temperatura ambiente por 10 minutos. A seguir, foram adicionados 20 μ L de suspensão de sílica (4 mg/20 μ L) e essa preparação foi homogeneizada vigorosamente e então incubada por 10 minutos a temperatura ambiente, agitando-se por inversão a cada dois minutos. Concluído o período de incubação, o material foi agitado vigorosamente em um agitador de tubos, centrifugado a 5.400 x g durante 1 minuto e o sobrenadante foi

descartado. O sedimento foi lavado duas vezes com 1 mL de solução de lavagem (5 M tiocianato de guanidina, 0,1 M Tris HCl pH 6,2), duas vezes com 1 mL de etanol 75% e uma vez com acetona e então, secado em bloco térmico a 60°C por 10 minutos. O sedimento foi eluído em 50 µL de TE (10mM Tris HCl pH 8,0 e 1mM EDTA) e estocado a -20°C até ser utilizado na qPCR.

PCR em tempo real (qPCR)

Iniciadores e sonda

A seqüência dos iniciadores (F: 5' – GGCAGACACCGCGTTGTAT-3' e R: 5'-TGTCCACGCTCGAGACTATCC-3') e da sonda 5'- (FAM) AACCCGGGCTTGTGGACGTCTTC (MGB)-3' utilizados neste trabalho foram os descritos por Islam e colaboradores (2004) para o gene SORF1 do HVT e foram sintetizados pela Applied BioSystems (Foster City, EUA).

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 µL contendo 15 µL TaqMan Universal PCR Master Mix, 0,25 µM de cada primer, 0,12 µM de sonda e 2 µL da amostra de DNA. Os parâmetros dos ciclos utilizados foram: 50°C por 2 minutos; 95°C por 10 minutos seguidos de 45 ciclos, sendo a desnaturação a 94°C por 15 segundos e o anelamento/extensão a 60°C por 60 segundos.

Análise da qPCR

A leitura dos resultados foi realizada utilizando o Software ABI PRISM 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems, Foster City, EUA). Os valores da qPCR foram comparados com os títulos das vacinas fornecidos pelo fabricante e com os títulos gerados no presente trabalho, ambos determinados em cultivo celular.

Reprodutibilidade da qPCR

Para avaliar a reprodutibilidade da qPCR, três ampolas de um mesmo lote de vacinas foram tituladas em dias diferentes, conforme protocolo descrito acima.

Análise do vírus na forma livre e associada à células através da qPCR

Para verificar se era possível analisar os vírus na forma livre e associada à células através da qPCR, uma vacina previamente reconstituída foi centrifugada a 500 xg durante 10 minutos e, posteriormente, foi separado o sedimento (vírus associado à célula) do sobrenadante (vírus livre de célula). Ambas as amostras obtidas foram submetidas à qPCR.

RESULTADOS, DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

Em nosso País, o regulamento técnico para a produção, controle e emprego de vacinas para avicultura (Brasil 1997) determina que as vacinas contra a doença de Marek devem conter, no mínimo, um título de 1.500 PFU/dose no momento da liberação da partida e, no mínimo, 1.000 PFU/dose até o seu vencimento. Pressupondo-se que as vacinas analisadas estavam de acordo com as normas deste regulamento, foram utilizadas, na titulação através do cultivo celular, três diluições ($10^{-4,9}$, $10^{-5,2}$ e $10^{-5,51}$) que permitiram avaliar vacinas com títulos entre 800 a 12.800 PFUs por dose. Todas as vacinas testadas apresentaram título superior ao mínimo exigido (Tabela 1).

A contagem das unidades formadoras de placas deve ser realizada assim que estas se tornem maduras, pois placas secundárias podem ocorrer quando as culturas de células são mantidas em meio líquido (Witter & Schat 2003) e, no caso do vírus HVT, quando a leitura for realizada após cinco dias da sua inoculação (Calnek et al. 1972). Para minimizar a formação das placas secundárias geradas pelo vírus quando migra de uma célula para outra, foi adicionado 1 % de metilcelulose ao meio de cultura usado na titulação, tornando-o semi-sólido. Esta concentração de metilcelulose foi a mesma usada por Landman & Verschuren (2003) quando titularam vacinas de MDV do sorotipo 1. No presente trabalho, a contagem das PFUs foi realizada no quinto dia após a inoculação das vacinas, sendo o mesmo período de leitura utilizado por Wakenell e colaboradores (2003) quando titularam vacinas do sorotipo 2 (SB-1) e 3 (HVT). Estudos anteriores de titulação de vacinas de MDV do sorotipo 3 associadas à células descreveram a contagem das PFUs entre o quarto e o quinto dia (Calnek et al. 1972), ou após o quinto dia (Eidson et al. 1978) da inoculação destas no tapete celular.

Ao se trabalhar com vacinas congeladas contra a doença de Marek, alguns cuidados no descongelamento e na reconstituição devem ser observados para que não ocorra diminuição do título viral. Halvorson & Mitchell (1979) sugeriram que possa

existir uma diminuição de até 50% no título das vacinas quando estas são mantidas por mais de quinze minutos em banho de água para que sejam descongeladas. Além disso, observaram uma diminuição de aproximadamente 25% do título quando a temperatura da água no descongelamento foi superior a 40°C ou inferior a 17°C. Esses mesmos autores também descreveram uma diminuição de 20% do título quando o diluente usado estava refrigerado a 4°C. Considerando-se estes fatores e seguindo-se as recomendações do fabricante, as vacinas foram descongeladas em banho de água a 27°C por 30 segundos sob leve agitação. Os diluentes das vacinas estavam à temperatura ambiente no momento em que foram usados. Para evitar possíveis danos ao vírus e conseqüente diminuição no título vacinal, foram utilizadas agulhas com tamanho superior a 40 x 16 para retirar o conteúdo das ampolas.

Os resultados da Figura 1A e 1B são exemplos das leituras gráficas de qPCR geradas pelo equipamento SDS 7000. Os valores dos títulos virais e respectivas diluições seriadas incluídas na curva padrão foram lançados no programa do equipamento, o qual calcula automaticamente os dados de regressão linear, demonstrando a coerência entre os valores do *threshold cycle* (CT) e as respectivas diluições das vacinas. Como exemplificado na Figura 1B, as três vacinas testadas apresentaram R^2 de 0,99.

Os valores dos títulos das vacinas HVT fornecidos pelos fabricantes (respectivas diluições seriadas) e o *threshold cycle* (CT), gerados no ensaio de qPCR, estão demonstrados na Tabela 2. As vacinas com títulos mais elevados ($B > A > C$) apresentaram os CTs mais elevados, contudo, pode-se observar que não houve uma relação direta entre os títulos virais das três vacinas testadas e os CTs. Estes dados indicam que devem ocorrer diferenças entre a quantidade total de vírions por dose e o número de PFUs por dose, pois sabe-se que, no caso do vírus HVT, um PFU pode ser originado por uma única célula infectada (independentemente do número de vírus que esta célula possuir), 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, entre outros; quantidade de vírus livre ou associado à células; quantidade de vírus viável entre outros fatores. Os resultados indicam a necessidade de preparar uma curva padrão para cada empresa a ser testada. A Tabela 1 apresenta os resultados comparativos dos títulos fornecidos pelos fabricantes das vacinas (A, B e C) e os gerados no presente trabalho através do cultivo celular e qPCR. Os valores encontrados são muito semelhantes

independentemente da técnica utilizada, indicando que a utilização de uma curva padrão por vacina de cada empresa foi eficiente para a padronização dos resultados da qPCR.

A titulação das vacinas através do cultivo celular em FEG, realizada neste trabalho, foi essencial para padronizar os títulos das diferentes empresas antes do estabelecimento da qPCR. Os resultados obtidos demonstram que os títulos gerados neste trabalho são reprodutíveis (Tabela 3) e compatíveis com os dados informados pelos fabricantes (Tabela 1).

Os dados da Tabela 3 estão relacionados com a reprodutibilidade das técnicas de cultivo celular e qPCR para as vacinas da empresa A. Foi demonstrado que, tanto a titulação em cultivo celular como a qPCR, foram bastante reprodutivas. Ressalta-se que, neste ensaio, foram utilizados três frascos de um mesmo lote de vacinas e as avaliações foram feitas em três dias distintos. Os resultados deste experimento confirmam os dados da Tabela 1 para a mesma empresa.

No presente trabalho, foi avaliada através da qPCR a proporção de vírus livre e associado às células relativa às três vacinas comerciais estudadas. As amostras foram previamente descongeladas e centrifugadas a baixa rotação para separação da fração celular. Os dados da Tabela 4 mostram que menos de 10% dos vírions se encontravam no sobrenadante, indicando que a maior parte das PFUs analisadas estão relacionadas aos vírions associados à células.

Esse foi o primeiro trabalho a descrever o uso da qPCR para titular vacinas contra o MDV. Verificou-se, pelos dados gerados, que a qPCR foi bastante efetiva e reprodutível. Uma das grandes vantagens da qPCR quando comparada com a técnica tradicional de titulação da vacina HVT baseada no cultivo celular de FEG está relacionada com o tempo necessário para a obtenção dos resultados (poucas horas) e ao número de amostras de vacina que podem ser tituladas simultaneamente. No entanto, o custo do equipamento é elevado, sendo um dos poucos fatores limitantes da técnica. Por outro lado, o cultivo celular também foi um método efetivo e reprodutível e é considerado “padrão ouro” no processo de titulação de vacinas de MDV. Porém, o cultivo celular é uma técnica trabalhosa, que necessita de alguns dias para a obtenção dos resultados e é dependente da disponibilidade de ovos embrionados SPF. Uma vez que os protocolos de titulação em cultivo celular utilizados possuem algumas diferenças, deve-se ter um cuidado especial ao se comparar os títulos de vacinas obtidos por diferentes empresas. Entre alguns fatores que influenciam na obtenção dos resultados entre laboratórios estão: propriedades físico-químicas dos diluentes

utilizados, qualidade do meio de cultura, condição das células no momento da inoculação da vacina (concentração, uniformidade, presença de grumos), genótipo das reprodutoras SPF que geraram os ovos embrionados, tipo de célula empregada (cultivo primário ou secundário), condições de incubação, tempo decorrido entre a inoculação da vacina e a leitura das PFUs, entre outros.

De acordo com os resultados apresentados nesse trabalho, foi possível concluir que ambas as técnicas, cultivo celular e qPCR, foram altamente reprodutivas. Os títulos obtidos por ambos os métodos foram coerentes com os títulos apresentados pelos fabricantes das vacinas. A qPCR foi uma técnica reprodutível, rápida e menos trabalhosa do que a titulação em cultivo celular tradicionalmente utilizada na titulação de vacinas contra o sorotipo 3 do vírus da doença de Marek.

Agradecimentos

À FINEP, pelo financiamento do projeto. Ao CNPq, pela bolsa de mestrado fornecida a Josiane Griebeler. As empresas produtoras de vacinas contra a doença de Marek pela doação das mesmas.

REFERÊNCIAS

- 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.
- 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: 20 de jul. 2004
- Boom, R., Sol, C. J. A., Salimans, M. M. M., Jansen, C. L., Dillen, P. M. E. & Noordaa, J. Van Der. 1990. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *Journal of Clinical Microbiology*, 28(3):495-503.
- Burleson, F. G., Chambers, T. M. & Wiedbrauk, D. L. 1992. *Virology: A Laboratory Manual*, San Diego: Academic Press, p.74-84.
- Calnek, B. W., Garrido, C., Okazaki, W. & Patrascu, I. V. 1972. *In vitro* methods for assay of turkey herpesvirus. *Avian Diseases*, 16(1):52-56.
- Canal, C. W. & Silva, E. N. 2000. Enfermidade de Marek, complexo leucótico aviário e reticuloendoteliose, p. 255-265. In.: Berchieri Júnior, A. & Macari, M. *Doenças das aves*. Campinas: Facta.
- Eidson, C. S., Page, R. K. & Kleven, S. H. 1978. 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*, 22:583-597.
- Halvorson, D. A. & Mitchell, D. O. 1979. Loss of cell-associated Marek's disease vaccine titer during thawing, reconstitution, and use. *Avian Diseases*, 23:848-853.
- 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.

- Landman, W.J.M. & Verschuren, S.B.E. 2003. Titration of Marek's disease cell-associated vaccine virus (CVI 988) of reconstituted vaccine and vaccine ampoules from dutch hatcheries. *Avian Diseases*, 47:1458-1465.
- Mackay, I.M., Arden, K.E. & Nitsche, A. 2002. Real-time PCR in virology. *Nucleic Acids Research*, 30(6):1292-1305.
- Niesters, H.G.M. 2001. Quantitation of viral load using real-time amplification techniques. *Methods*, 25: 419-429.
- Okasaki, W., Purchase, H. G. & Burmester, B. R. 1970. Protection against Marek's disease by vaccination with a herpesvirus of turkeys. *Avian Diseases*, 14(2):413-429.
- Reddy, S. K., Sharma, J. M., Ahmad, J., Reddy, D. N., McMillen, J. K., Cook, S. M., Wild, M. A. & Schartz, R. D. 1996. Protective efficacy of a recombinant herpesvirus of turkeys as an in ovo vaccine against Newcastle and Marek's diseases in specific-pathogen-free chickens. *Vaccine*, 14(6):469-477.
- Rispens, B.H., Vloten, H. V., Mastenbroek, N. & Maas, H. J. L. 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(1):108-125.
- Rispens, B.H., Vloten, H. V., Mastenbroek, N. & Maas, H. J. L. 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(1):126-138.
- Ross, L.J.N. 1998. Recombinant vaccines against Marek's disease. *Avian Pathology*, 27:S65-S73.
- Rovozzo, G.C. & Burke, C.N. 1973. A manual of basic virological techniques New Jersey: Prentice-hall, 274p.
- Sakaguchi, M., Nakamura, H., Sonoda, K., Okamura, H., Yokogawa, K., Matsuo, K. & Hira, K. 1998. Protection of chickens with or without maternal antibodies against both Marek's and Newcastle diseases by one-time vaccination with recombinant vaccine of Marek's disease virus type 1. *Vaccine*, 16(5): 472-479.
- Tischer, B. K., Schumacher, D., Beer, M., Beyer, J., Teifke, J. P., Osterrieder, K., Wink, K., Zelnik, V., Fehler, F. & Osterrieder, N. 2002. A DNA vaccine containing an

infectious Marek's disease virus genome can confer protection against tumorigenic Marek's disease in chickens. *Journal of General Virology*, 83: 2367-2376.

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

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

Figura 1 – Gráfico das leituras da qPCR.

A – Curvas de amplificação originadas a partir de diluições em base 5 de uma vacina comercial B. No eixo X se apresentam o número de ciclos da qPCR e o eixo Y a intensidade da fluorescência (ΔRn). **B** – Gráfico entre *threshold cycle* (CT) e os valores em log dos títulos vacinais fornecidos pelo fabricante (coeficiente de correlação 0,99).

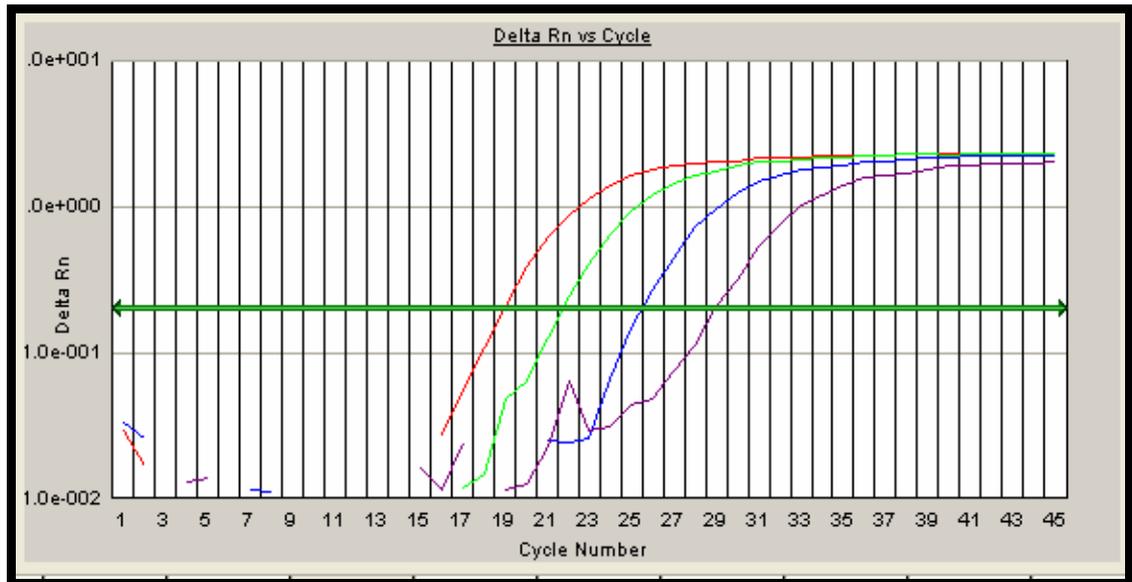
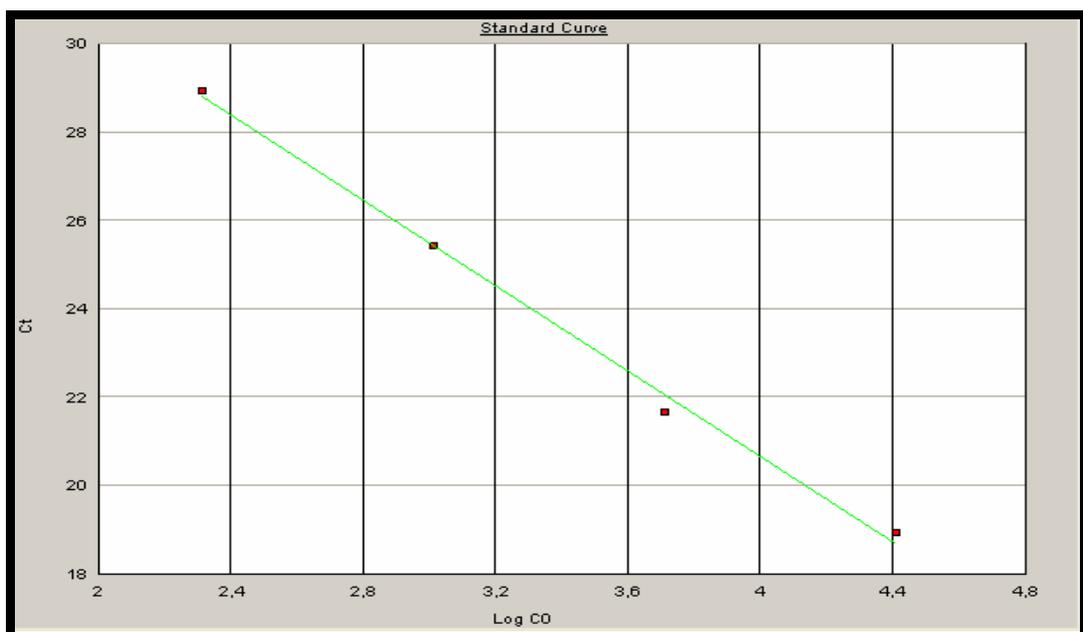
A**B**

Tabela 1 – Títulos de 3 vacinas comerciais de HVT. Comparação entre os dados fornecidos pelos fabricantes e os gerados no presente trabalho através do cultivo celular e qPCR.

Vacinas	PFU/dose		
	Fabricante	Cultivo celular	qPCR*
A	6.460	4.267	6.983
B	9.575	9.632	6.407
C	5.183	2.008	3.689

* Valores equivalentes a PFU/dose.

Tabela 2 – Relação entre os títulos das vacinas HVT fornecidos pelos fabricantes (diluições seriadas em base 5) e *threshold cycle* (CT) gerados no ensaio de qPCR.

Diluições seriadas	Empresa A		Empresa B		Empresa C	
	PFU/dose	CT	PFU/dose	CT	PFU/dose	CT
1x	25.800	18,9	38.300	19,1	20.732	17,3
5x*	5.160	21,7	7.660	21,8	4.146	20,0
25x	1.032	25,4	1.532	25,3	829	23,6
125x	206	29,5	306	29,2	166	28,2

* Diluição recomendada pelo fabricante.

Tabela 3 – Reprodutibilidade da técnica de cultivo celular e qPCR através de três titulações distintas de um mesmo lote de vacina da empresa A.

Titulação	PFU/dose	
	Cultivo celular	qPCR*
Primeira	4.368	6.965
Segunda	4.224	6.800
Terceira	4.208	5.945

* Valores equivalentes a PFU/dose.

Tabela 4 – Determinação da concentração viral na forma livre e associada à célula por qPCR.

Vírus	Empresa A		Empresa B		Empresa C	
	qPCR*	%	qPCR*	%	qPCR*	%
Livre	601	8,8	622	5,7	454	6,5
Associado à célula	6.202	91,2	10.264	94,3	6.543	93,5
Total	6.803	100	10.886	100	6.997	100

* Valores equivalentes a PFU/dose.

PERSPECTIVAS

Não foi objetivo deste trabalho caracterizar as variações existentes dentro ou entre lotes de uma empresa produtora de vacinas. Portanto, nas próximas etapas, será analisado um maior número individual de vacinas por lote para que sejam caracterizadas as variações existentes. Talvez assim, possam ser justificadas as diferenças nos títulos encontradas neste trabalho com os fornecidos pela empresa C. Além disso, um maior número de lotes por empresa deverá ser analisado para que seja caracterizada se as titulações por qPCR são passíveis de serem realizadas com uma curva padrão por empresa. Também, faz-se necessária uma melhor caracterização dos vírions associados e livres de células através da análise de um número maior de ampolas e de lotes de vacinas. Um potencial da qPCR que deverá ser testado nos próximos trabalhos é o de titular especificamente vacinas mistas, o que é de difícil realização pela titulação em cultivo celular. Neste caso, com a qPCR, será possível diferenciar títulos de vacinas do sorotipo HVT associado com Rispens, assim como títulos de outros vírus, como o IBDV.

REFERÊNCIAS

ABEF. **Frango brasileiro: primeiro lugar absoluto no mercado internacional.**

Disponível em: <<http://www.abef.com.br>>. Acesso em: 07 jan. 2005.

AVICULTURA brasileira está consolidada em termos econômicos. **Aveworld**, Paulínia, v. 2, n. 8, p. 4-6, fev./mar. 2004.

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 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.

BALL, R. F.; LYMAN, J. F. Revaccination of chicks for Marek's disease at twenty-one days old. **Avian Diseases**, v. 21, n. 03, p. 400-444, 1977.

BECKER, Y. et al. Polymerase chain reaction for differentiation between pathogenic and non-pathogenic serotype 1 Marek's disease viruses (MDV) and vaccine viruses of MDV-serotypes 2 and 3. **Journal of Virological Methods**, V 40, p. 307-322, 1992.

BORENSHTEIN, R.; DAVIDSON, I. Development of the hot spot-combined PCR assay for detection of retroviral insertions into Marek's disease virus. **Journal of Virological Methods**, v. 82, p. 119-127, 1999.

BUMSTEAD, N. et al. Quantification of Marek's disease virus in chicken lymphocytes using the polymerase chain reaction with fluorescence detection. **Journal of Virological Methods**, v. 65, p. 75-81, 1997.

BURGESS, S. C.; DAVISON, T. F. A quantitative duplex PCR technique for measuring amounts of cell-associated Marek's disease virus: differences in two populations of lymphoma cells. **Journal of Virological Methods**, v. 82, p. 27-37, 1999.

BURGESS, S. C.; BASARAM, B. H.; DAVISON, T. F. Resistance to Marek's disease herpesvirus-induced lymphoma is multiphasic and dependent on host genotype. **Veterinary Pathology**, v. 38, n. 2, p. 129-142, 2001.

BURGOYNE, G. H.; WITTER, R. L. Effect of passively transferred immunoglobulins on Marek's disease. **Avian Diseases**, v. 17, p. 824-837, 1973.

CALNEK, B. W.; ADLDINGER, H. K.; KAHN, D. E. Feather follicle epithelium: a source of enveloped and infectious cell-free herpesvirus from Marek's disease. **Avian Diseases**, v. 14, n. 2, p. 219-233, 1970.

CALNEK, B. W.; HITCHNER, S. B. Survival and disinfection of Marek's disease virus and the effectiveness of filters in preventing airborne dissemination. **Poultry Science**, v. 52, p. 35-43, 1973.

- CALNEK, B. W. et al. Relationship between the immunosuppressive potential and the pathotype of Marek's disease virus isolates. **Avian Diseases**, v. 42, p. 124-132, 1998.
- CALNEK, B. W.; SMITH, M. W. Vaccination against Marek's disease with cell-free turkey herpesvirus: interference by maternal antibody. **Avian Diseases**, v. 16, p. 954-957, 1972.
- CANAL, C. W.; SILVA, E. N. Enfermidade de Marek, complexo leucótico aviário e reticuloendoteliose. In.: BERCHIERI JÚNIOR, A.; MACARI, M. **Doenças das aves**. Campinas: Facta, 2000. p. 255-265.
- CHO, B. R.; KENZY, S.G. Virologic and serologic studies of zoo birds for Marek's disease virus infection. **Infection and Immunity**, v. 11, n. 4, p. 809-814, 1975.
- COLE, R. K. Studies on genetic resistance to Marek's disease. **Avian Diseases**, v. 12, p. 9-28, 1968.
- DAVIDSON, I.; BORENSHTEIN, R.; WEISMAN, Y. Molecular identification of the Marek's disease virus vaccine strain CVI 988 in vaccinated chickens. **J. Vet. Med.**, v. 49, p. 83-87, 2002.
- DJERABA, A. et al. Protective effect of avian myelomonocytic growth factor in infection with Marek's disease virus. **Journal of Virology**, v. 76, n. 3, p. 1062-1070, 2002.
- GIMENO, I. M.; WITTER, R. L.; NEUMANN, U. Neuropathotyping: a new system to classify Marek's disease virus. **Avian Diseases**, v. 46, p. 900-918, 2002.
- GIMENO, I. M.; WITTER, R. L.; REED, W. M. Four distinct neurologic syndromes in Marek's disease: effect of viral strain and pathotype. **Avian Diseases**, v. 43, n. 4, p. 721-737, 1999.
- HANDBERG, K. J.; NIELSEN, O. L.; JORGENSEN, P. H. The use of serotype 1- and serotype 3-specific polymerase chain reaction for the detection of Marek's disease virus in chickens. **Avian Pathology**, v. 30, p. 243-249, 2001.
- HALVORSON, D. A.; MITCHELL, D. O. Loss of cell-associated Marek's disease vaccine titer during thawing, reconstitution, and use. **Avian Diseases**, v. 23, p. 848-853, 1979.
- 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.
- 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.
- KAWAMURA, H.; KING, D. J. Jr.; ANDERSON, D. P. A herpesvirus isolated from kidney cell culture of normal turkeys. **Avian Diseases**, v. 13, p. 853-863, 1969.

- KENZY, S. G.; CHO, B. R. Transmission of classical Marek's disease by affected and carrier birds. **Avian Diseases**, Georgia, v. 13, p. 211-214, 1969.
- LANDMAN, W. J. M.; VERSCHUREN, S. B. E. Titration of Marek's disease cell-associated vaccine virus (CVI 988) of reconstituted vaccine and vaccine ampoules from dutch hatcheries. **Avian Diseases**, v. 47, p. 1458-1465, 2003.
- LEVY, A. M. et al. Major histocompatibility complex class I is downregulated in Marek's disease virus infected chicken embryo fibroblast and corrected by chicken interferon. **Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases**, v. 26, p. 189-198, 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.
- MARSHALL, Pablo. Mercado internacional de frangos: barreiras e perspectivas. In: SIMPÓSIO BRASIL SUL DE AVICULTURA, 5., 2004, Chapecó. **Anais**. Concórdia: Embrapa Suínos e Aves, 2004. p. 130-134.
- MORIMURA, T. et al. Pathogenesis of Marek's disease (MD) and possible mechanisms of immunity induced by MD vaccine. **Journal of Veterinary Medicine Science.**, v. 60, n. 1, p. 1-8, 1998.
- NAZERIAN, K. et al. Protection against Marek's disease by a fowlpox virus recombinant expressing the glycoprotein B of Marek's disease virus. **Journal of Virology**, v. 66, n. 03, p. 1409-1413, 1992.
- 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. K. et al. Protective efficacy of a recombinant herpesvirus of turkeys as an in ovo vaccine against Newcastle and Marek's diseases in specific-pathogen-free chickens. **Vaccine**, v. 14, n. 6, p. 469-477, 1996.
- REDDY, S. M.; WITTER, R. L.; GIMENO, I. Development of a quantitative-competitive polymerase chain reaction assay for serotype 1 Marek's disease virus. **Avian Diseases**, 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**, Georgia, v. 16, n. 1, p. 108-125, 1972a.
- RISPENS, B. H. et al. 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**, v. 16, n. 1, p. 126-138, 1972b.

- ROSS, N. L. J. T-cell transformation by Marek's disease virus. **Trends in Microbiology**, v. 7, n. 1, p. 22-29, 1999.
- ROSS, L. J. N. Recombinant vaccines against Marek's disease. **Avian Pathology**, v. 27, p. S65-S73, 1998.
- ROSS, N. et al. Marek's disease virus EcoRI-Q gene (meq) and a small RNA antisense to ICP4 are abundantly expressed in CD4 cells and cells carrying a novel lymphoid marker, AV37, in Marek's disease lymphomas. **Journal of General Virology**, v. 78, p. 2191-2198, 1997.
- SAKAGUCHI, M. et al. Protection of chickens with or without maternal antibodies against both Marek's and Newcastle diseases by one-time vaccination with recombinant vaccine of Marek's disease virus type 1. **Vaccine**, v. 16, n. 5, p. 472-479, 1998.
- SCHUMACHER, D. et al. Glycoproteins E and I of Marek's disease virus serotype 1 are essential for virus growth in cultured cells. **Journal of Virology**, v. 75, n. 23, p. 11307-11318, 2001.
- 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.
- SHARMA, J. M.; BURMESTER, B. R. Resistance to Marek's disease at hatching in chickens vaccinated as embryos with the turkey herpesvirus. **Avian Diseases**, v. 26, n. 1, p. 134-139, 1982.
- SOLOMON, J. J.; WITTER, R. L. Absence of Marek's disease in chicks hatched from eggs containing blood or meat spots. **Avian Diseases**, v. 17, p. 141-144, 1973.
- 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.
- SUNG, H. W. Recent increase of Marek's disease in Korea related to the virulence increase of the virus. **Avian Diseases**, v. 46, p. 517-524, 2002.
- TISCHER, B. K. et al. A DNA vaccine containing an infectious Marek's disease virus genome can confer protection against tumorigenic Marek's disease in chickens. **Journal of General Virology**, v. 83, p. 2367-2376, 2002.
- 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.
- WITTER, R. L. Characteristics of Marek's disease viruses isolated from vaccinated commercial chicken flocks: association of viral pathotype with lymphoma frequency. **Avian Diseases**, v. 17, p. 113-132, 1983.
- WITTER, R. L. Attenuated revertant serotype 1 Marek's disease virus: Safety and protective efficacy. **Avian Diseases**, v. 35, p. 877-891, 1991.

WITTER, R. L. The changing landscape of Marek's disease. **Avian Pathology**, v. 27, supplement 1, p. S46-S53, 1998.

WITTER, R. L. et al. Long term studies of Marek's disease infection in individual chickens. **Avian Diseases**, v. 15, n. 2, p. 346-365, 1971.

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

WITTER, R. L et al. An acute form of transient paralysis induced by highly virulent strains of Marek's disease virus. **Avian Diseases**, v. 43, n. 4, p. 704-720, 1999.

WITTER, R. L.; LEE, L. F.; SHARMA, J.M. Biological diversity among serotype 2 Marek's disease viruses. **Avian Diseases**, v. 34, p. 944-957, 1990.

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

WITTER, R. L.; SHARMA, J. M.; FADLY, A. M. Pathogenicity of variant Marek's disease virus isolants in vaccinated and unvaccinated chickens. **Avian Diseases**, v. 24, n. 01, 1980.

XING, Z.; SCHAT, K. A. Inhibitory effects of nitric oxide and gamma interferon on in vitro and in vivo replication of Marek's disease virus. **Journal of Virology**, v. 74, n. 8, p. 3605-3612, 2000.

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.