

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
ESCOLA DE VETERINÁRIA  
Colegiado dos Cursos de Pós-Graduação**

**Carolina Kymie Vasques Nonaka**

**VALIDAÇÃO DE UMA PCR EM TEMPO REAL PARA O DIAGNÓSTICO DA DOENÇA DE  
AUJESZKY**

Dissertação apresentada a Escola de Veterinária da UFMG como requisito parcial para obtenção de grau em Mestre em Ciência Animal.

Área de concentração: Medicina Veterinária Preventiva

Orientador: Prof. Dr. Marcos Bryan Heinemann

Belo Horizonte  
Escola de Veterinária da UFMG  
2012

N812v Nonaka, Carolina Kymie Vasques, 1982-  
Validação de uma PCR em tempo real para o diagnóstico da doença de Aujeszky /  
Carolina Kymie Vasques Nonaka. – 2012.  
52 p. : il.  
Orientador: Marcos Bryan Heinemann  
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária  
Inclui bibliografia

1. Suíno – Doenças – Diagnóstico – Teses. 2. Aujeszky, Doença de – Teses. 3. Reação  
em cadeia de polimerase – Teses. I. Heinemann, Marcos Bryan. II. Universidade Federal  
de Minas Gerais. Escola de Veterinária. III. Título.

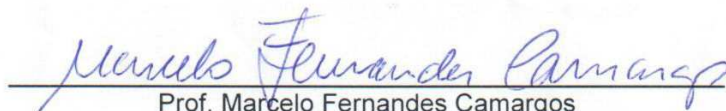
CDD – 636.408 96

Dissertação defendida e aprovada em 05 de março de 2012, pela Comissão Examinadora constituída por:



---

Prof. Marcos Bryan Heinemann  
Presidente



---

Prof. Marcelo Fernandes Camargos



---

Prof. Jenner Karlisson Pimenta dos Reis

## **AGRADECIMENTOS**

Em primeiro lugar, agradeço a Deus, sem a bênção Dele, esse grande sonho jamais seria concretizado.

Ao Prof. Marcos, pelos conselhos, apoio e orientação durante esses dois anos.

Ao amigo Antônio, ou Juninho, pelos ensinamentos e por me guiar em todas as etapas.

Ao LANAGRO-MG e à Escola de Veterinária, pela oportunidade de aprendizado.

Ao CNPQ e a FAPEMIG pelo apoio financeiro.

Aos amigos que fiz ao longo dessa caminhada, em especial, ao Laboratório de Biologia Molecular, ao Laboratório de Resíduos e Medicamentos Veterinários, ao Laboratório de Microbiologia e ao Laboratório de Virologia do LANAGRO-MG, pelos bons momentos eternizados pelo carinho.

À minha família, pelo apoio e por acreditar no meu sonho, mesmo sem entender as minhas escolhas.

Ao meu marido, pela paciência, por sempre estar ao meu lado e não desistir, mesmo quando ainda éramos namorados.

“A persistência é o caminho do êxito”.

(Chales Darwin)

## LISTA DE SIGLAS

**DA** – doença de Aujeszky

**ELISA** – Enzyme-Linked Immunoabsorbent Assay

**GRSC** - granjas de reprodutores suídeos certificadas

**LANAGRO** – Laboratório Nacional Agropecuário

**LDDV** – Laboratório de Diagnóstico de Doenças Virais

**MAPA** – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

**OIE** – Office International Epizooties

**PCR** - Reação em Cadeia da Polimerase

**PNSS** - Programa Nacional de Sanidade Suídea

**SNT** – Teste de soro-neutralização

**SuHV-1** – Suid herpesvirus 1

**VDA** – vírus da doença de Aujeszky

---

## SUMÁRIO

---

<b>RESUMO.....</b>	<b>8</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>8</b>
<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>9</b>
<b>2. LITERATURA CONSULTADA.....</b>	<b>10</b>
2.1. DOENÇA DE AUJESZKY.....	10
2.1.1. Histórico.....	10
2.1.2. Sanidade Animal.....	11
2.1.3. Distribuição da Doença de Aujezsky.....	12
2.1.4. Etiologia.....	14
2.1.5. Genoma.....	14
2.1.6. Ciclo de Replicação Viral.....	15
2.1.7. Sinais Clínicos.....	16
2.1.8. Epidemiologia.....	17
2.1.9. Erradicação da Doença de Aujezsky nos rebanhos suínos.....	17
2.1.10. Diagnóstico.....	18
2.1.11. Vacina.....	19
2.1.12. Diagnóstico Sorológico.....	20
2.1.13. Diagnóstico Molecular.....	20
2.2. AVALIAÇÃO DE DESEMPENHO DOS TESTES DIAGNÓSTICOS.....	23
2.2.1. Verificação de Desempenho.....	24
2.2.2. Validação.....	25
2.2.3. Validação de métodos diretos e indiretos.....	25
2.2.4. Desenvolvimento de um ensaio experimental.....	25
2.2.5. Especificidade e Seletividade.....	26
2.2.6. Sensibilidade.....	26
2.2.7. Repetitividade.....	26
2.2.8. Reprodutibilidade.....	27
2.2.9. Robustez.....	27
<b>3. METODOLOGIA.....</b>	<b>27</b>
3.1. LOCAL.....	27
3.2. AMOSTRAS.....	27
3.3. EXTRAÇÃO DAS AMOSTRAS.....	28
3.4. DOSAGEM DE DNA.....	29
3.5. DESENHO DOS INICIADORES.....	29
3.6. PIPETAS.....	30
3.7. TERMOCICLADORES.....	30
3.8. PROTOCOLO DE TEMPERATURA.....	30
3.9. CRITÉRIOS.....	30
3.10. PADRONIZAÇÃO.....	30
3.11. CONTROLES.....	31
3.12. EFICIÊNCIA DA REAÇÃO.....	31
3.13. ESPECIFICIDADE ANALÍTICA.....	31
3.14. SENSIBILIDADE DIAGNÓSTICA.....	31
3.15. LIMITE DE DETECÇÃO (LD).....	32
3.16. REPETITIVIDADE E REPRODUTIBILIDADE.....	32
3.17. ROBUSTEZ.....	32
3.18. INTERLABORATORIAL.....	32
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>33</b>
<b>5. CONCLUSÃO.....</b>	<b>46</b>
<b>6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>46</b>

---

## LISTA DE FIGURAS

---

Figura 1 - Mapa da distribuição da DA no período de jan-dez de 2010 (WAHID, 2012).....	13
Figura 2 - Mapa da distribuição da DA no período de jun-dez de 2011 (WAHID, 2012).....	14
Figura 3 – Demonstração da influência de diferentes concentrações de DMSO (respectivas concentrações: 0,6% v/v, 0,8% v/v, 1,0% v/v e 1,2% v/v) na temperatura de dissociação da PCR em tempo real para detecção do SuHV-1 utilizando como química o agente intercalante. Para esse teste foram usados os iniciadores VDA-TR-gD-123-F e VDA-TR-gD-123-R. ....	35
Figura 4 - Curva de dissociação da PCR em tempo real para detecção do SuHV-1 com a química do agente intercalante SybrGreen, usando os iniciadores gE-116 F e gE-116 R (a seta está apontada para o pico inespecífico). ....	36
Figura 5 - Curva do LD da PCR em tempo real para detecção do SuHV-1 utilizando os oligonucleotídeos gB-TR-Sense, gB-TR-Antisense e sonda de hibridização VDAgBTaqS, nas seguintes concentrações: $10^{3,5}$ TCID <sub>50</sub> / 50µL, $10^{2,5}$ TCID <sub>50</sub> / 50µL, $10^{1,5}$ TCID <sub>50</sub> / 50µL, $10^{0,5}$ TCID <sub>50</sub> / 50µL, $10^{-0,5}$ TCID <sub>50</sub> / 50µL, $10^{-1,5}$ TCID <sub>50</sub> / 50µL.....	40
Figura 6 – Curva do LD da PCR em tempo real para detecção do SuHV-1 utilizando usando o agente intercalante SybrGreen com os iniciadores VDA-TR-gD-123 F e VDA-TR-gD-123 R, nas seguintes concentrações: $10^{3,5}$ TCID <sub>50</sub> / 50µL, $10^{2,5}$ TCID <sub>50</sub> / 50µL, $10^{1,5}$ TCID <sub>50</sub> / 50µL, $10^{0,5}$ TCID <sub>50</sub> / 50µL, $10^{-0,5}$ TCID <sub>50</sub> / 50µL, $10^{-1,5}$ TCID <sub>50</sub> / 50µL, $10^{-2,5}$ TCID <sub>50</sub> / 50µL.....	40
Figura 7 - Curva de dissociação da PCR em tempo real para detecção do SuHV-1 utilizando o agente intercalante SybrGreen e os iniciadores VDA-TR-gD-123 F e VDA-TR-gD-123 R. ....	41
Figura 8 - Curva de dissociação da PCR em tempo real para detecção do SuHV-1 usando a tecnologia Plexor e os iniciadores VDA-Abort-gD F e VDA-Abort-gD R.....	42

---

## LISTA DE TABELAS

---

Tabela 1 – Relação dos iniciadores usados na PCR em tempo real para amplificar os alvos gB, gC, gD e gE do SuHV-1 através do agente intercalante SybrGreen.....	29
Tabela 2 – Relação dos iniciadores e sondas de hibridização usados na PCR em tempo real para amplificar os alvos gB e gE do SuHV-1 .....	29
Tabela 3 – Relação dos iniciadores usados na PCR em tempo real para amplificar os alvos gD e gE do SuHV-1 através da tecnologia Plexor .....	29
Tabela 4 - Iniciadores usados como controles nas reações de PCR em tempo real .....	31
Tabela 5 – Eficiência da PCR em tempo real para a detecção do SuHV-1 alcançadas com as diferentes químicas testadas.....	38
Tabela 6 - Dados estatísticos gerados a partir dos Cts das amostras com 100 ng de DNA/µL das reações de PCR em tempo real para diagnóstico da DA, utilizando os oligonucleotídeos gB-TR-Sense, gB-TR-Antisense e sonda de hibridização VDAgBTaqS .....	44
Tabela 7 - Dados estatísticos gerados a partir dos Cts das amostras com 200 ng de DNA/ µL das reações de PCR em tempo real para diagnóstico da DA, utilizando os oligonucleotídeos gB-TR-Sense, gB-TR-Antisense e sonda de hibridização VDAgBTaqS .....	45

---

## LISTA DE QUADROS

---

Quadro 1 - Protocolos de temperaturas utilizadas nos ensaios .....	30
--	----

## RESUMO

A doença de aujeszky (DA) é uma doença infecto-contagiosa de etiologia viral que se constitui em um importante obstáculo à exploração e ao comércio internacional de suínos. O SuHV-1 pertence a subfamília *Alphaherpesvirinae* e possui dentre outras características a capacidade de estabelecer infecções latentes nos neurônios sensoriais. Considerada como doença de notificação obrigatória pela OIE, está presente na lista de doenças de importância econômica e epidemiológica. Os sistemas de produção se tornaram mais intensivos e confinados, e conseqüentemente os riscos de disseminação de doenças também aumentaram. A adoção de estratégias e programas oficiais de controle e erradicação da DA, tendo em vista prevenir a disseminação da enfermidade, se faz necessário para evitar prejuízos extensos à exploração de suínos no Brasil. O presente trabalho teve como objetivo validar uma PCR em tempo real para o diagnóstico da DA e verificar o desempenho dos diferentes sistemas: SybrGreen I, Sonda de hibridização e Plexor. Para a verificação de desempenhos os seguintes critérios foram usados: Especificidade e Seletividade, Sensibilidade, Limite de detecção, Repetitividade e Reprodutibilidade e Robustez. O melhor desempenho foi alcançado utilizando os iniciadores e sonda desenhados para o alvo gB, este fato influenciou na tomada de decisão na escolha da metodologia a ser validada e disponibilizada para o Laboratório de Biologia Molecular do LANAGRO-MG, como ferramenta para o diagnóstico da DA no Brasil.

**Palavras-chave:** doença de aujeszky, suínos, PCR, desempenho, SybrGreen I, sonda de hibridização e Plexor.

## ABSTRACT

Aujeszky's disease (AD) is an contagious infectious disease of viral etiology that constitutes a major obstacle to the exploration and international trade of swine. The Suid Herpesvirus 1 (SuHV-1) belongs to the subfamily *Alphaherpesvirinae* and among other features has the ability to establish latent infections in sensory neurons. Considered as a notifiable disease by the OIE, is present in the list of diseases of importance economic and epidemiology in swine. The production systems become more intensive and confined, and consequently the risk of spreading disease also increased. The adoption of strategies and public programs for control and eradication of AD, in order to prevent the spread of the disease, it is necessary to prevent extensive damage to the pig farm in Brazil. The aim of this work was to validate a real time PCR for the diagnosis of AD and to verify the performance of different systems: SybrGreen I, hybridization probe and Plexor. To check the performance of the following criteria were used: specificity and selectivity, sensitivity, limit of detection, repeatability and reproducibility and robustness. The best performance was achieved using the primers and probes designed to target gB, this fact influenced the decision-making in the choice of methodology to be validated and available in the Laboratory of Molecular Biology of the LANAGRO-MG, as a tool for the AD diagnostic in Brazil.

**Keywords:** aujeszky disease, swine, PCR, performance, SybrGreen I, hybridization probe and Plexor.



## 1. INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas, a suinocultura brasileira apresentou uma intensa tecnificação de suas práticas de manejo, com o incremento da produção confinada e da movimentação de animais. Essa evolução tem favorecido a obtenção de altos índices de produtividade, tanto que o Brasil se firmou na condição de quarto maior fornecedor mundial de carne suína. O Brasil produziu 3,4 milhões de toneladas de carne suína em 2011 e 3,2 milhões de toneladas em 2010. As receitas totalizaram 1,43 bilhão de dólares em 2011, acima dos 1,34 bilhão de dólares somados em 2010.

Entretanto, essas práticas de manejo adotadas para aumentar a produção elevam o risco de ocorrência e disseminação de enfermidades no rebanho suídeo nacional. Por mais rigorosas que sejam as medidas sanitárias de proteção adotadas por um país ou uma região considerada como zona livre de uma doença, nunca se tem a segurança absoluta para que se consiga impedir a introdução ou reintrodução de um agente infeccioso.

A doença de Aujeszky (DA), também conhecida como Pseudorraiva (PRV), é uma doença viral altamente contagiosa e de grande importância sanitária e econômica na suinocultura. A espécie suína é considerada o principal reservatório do vírus da DA e seu mais importante disseminador. De acordo com o Comitê Internacional de Taxonomia dos Vírus, a doença é causada pelo *Suid herpesvirus 1* (SuHV-1).

A DA é caracterizada por alta mortalidade na maternidade, abortos e porcentagem variável de animais com sinais nervosos e respiratórios na creche, recria, terminação e gestação. A enfermidade afeta o Sistema Nervoso Central (SNC) em animais jovens e o sistema respiratório em adultos. O suíno é o único reservatório natural deste agente e a única espécie onde o vírus estabelece uma infecção latente. A vacinação contra a DA minimiza a apresentação clínica da doença, porém não evita a infecção, nem o estabelecimento da condição de latência.

No Brasil a comercialização e distribuição de animais destinados à reprodução somente é permitida por granjas de reprodutores suídeos certificadas (GRSC), que são livres para várias doenças, incluindo a DA. Caso as granjas GRSC sejam infectadas, o potencial que elas representam na disseminação do SuHV-1, com a comercialização de suínos de reposição é extremamente relevante.

A adoção de estratégias e programas oficiais de controle e erradicação da DA, tendo em vista prevenir a disseminação da enfermidade, se faz necessário para evitar prejuízos extensos à exploração de suínos no Brasil. Além disso, o contato direto entre animais é a principal via de disseminação do VDA, por isso é de extrema importância que no Brasil existam programas de monitoramento dos rebanhos. Essas condutas trarão benefícios para a cadeia produtiva de carne suína, pois, além de uma melhor produtividade, o comércio de carne e derivados com países importadores será mais competitivo.

Os testes atualmente utilizados para detecção do SuHV-1 baseiam-se no isolamento do vírus e métodos de detecção de anticorpos. Entretanto, estes métodos necessitam de um longo período, uma a duas semanas após a infecção natural ou vacinação, para obter um diagnóstico confirmatório.

A introdução da técnica de PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) para diagnósticos e detecção de patógenos tem sido uma valiosa alternativa para os métodos tradicionais. O uso da PCR em tempo real permite ainda o processamento das informações em um único passo, diminuindo o tempo do processo. Metodologias baseadas na PCR convencional e PCR em tempo real melhoraram a sensibilidade e a objetividade da interpretação dos resultados, além de serem ferramentas promissoras para um rápido diagnóstico etiológico, oferecendo várias vantagens quando comparados com testes de rotina de laboratório. Além disso, essa metodologia foi sugerida no plano de erradicação da doença de Aujeszky no Brasil elaborado pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento e

recomendada pela Organização Mundial de Saúde Animal.

Uma consideração relevante na hora de desenvolver um teste de PCR em tempo real é a escolha do sistema de detecção mais apropriado. Atualmente, existem várias químicas disponíveis no mercado: SybrGreen, TaqMan, Molecular Beacons, Plexor, Scorpions, LUX Primes. Cada química oferece vantagens e desvantagens, dependendo do objetivo do teste.

O desenvolvimento de um método analítico envolve um processo de avaliação que estime sua eficiência na rotina do laboratório. Esse processo é denominado de validação. As normas internacionais, nacionais e sistemas de qualidade destacam a importância da validação de métodos analíticos e a documentação do trabalho de validação, para obtenção de resultados confiáveis e adequados ao uso pretendido.

Em consideração ao exposto acima, o presente trabalho teve como objetivo validar uma PCR em tempo real para o diagnóstico da doença de Aujeszky e verificar o desempenho de três químicas disponíveis no mercado (Agente intercalante, Sonda de hibridização e Plexor) através da comparação desses sistemas.

## **2. LITERATURA CONSULTADA**

### **2.1. DOENÇA DE AUJESZKY**

#### **2.1.1. HISTÓRICO**

A DA foi primeiramente descrita em bovinos nos Estados Unidos, em 1813. Por afetar o sistema nervoso a doença era confundida com a raiva. Foi primeiramente reconhecida como doença de bovinos e cães, na Hungria, em 1902. Aladar Aujeszky demonstrou por meio da infecção experimental em coelhos, não se tratar de raiva e, a partir de então a doença passou a ser denominada como pseudorraiva. Já nessa época existiam evidências que os suínos eram os hospedeiros naturais do vírus. Por muitos anos na Europa, a DA era

considerada uma importante doença causadora da morte de suínos de todas as idades e de abortamentos (Thawley *et al.*, 1991; Kohler e Kohler, 2003). Em 1909, o agente foi identificado pela primeira vez em suíno por Weiss e depois em ovelhas em 1910 por Schmiedhoffer (Pejsak e Truscynski, 2006). Um estudo que descreveu experimentalmente a transmissão do agente para os suínos foi relatado em 1914. Em 1931, o pesquisador americano Shope isolou o vírus de uma vaca e foi capaz de causar doença paralítica em suínos inoculados por via subcutânea com tecido cerebral. Ele demonstrou que o vírus estava presente nas secreções nasais por vários dias (Anderson *et al.*, 2008). Em 1934, Sabin e Wright o identificaram como um herpesvírus, posteriormente recebeu a denominação Herpesvirus suino 1 (SuHV-1) (Kluge *et al.*, 1999).

Entre os anos de 1960 e 1970, os Estados Unidos consideravam essa doença causadora apenas das mortes de leitões e ocasionalmente de bovino, ovelhas, cães e gatos (Thawley *et al.*, 1991). Em 1961 e 1962, proprietários de rebanhos começaram a relatar surtos de SuHV-1 em Illinois e outros Estados do Centro-Oeste Americano parecidos com os registrados na Europa (Anderson *et al.*, 2008).

Os primeiros casos da doença relatados na Grã-Bretanha foram em 1979 e os últimos em 1989. O país foi declarado oficialmente livre da doença em 1991. A doença não existia na Europa Oriental antes da década de 1960, mas em 1989 teve uma distribuição mundial afetando 43 países. O aumento da incidência dos casos da DA na Suécia, no período de 1970-1980, levou o governo a dar início, em 1989, ao programa de erradicação (Anderson *et al.*, 2008).

A Comunidade Européia, segundo a Diretiva 64/432/CEE de 1964, relatava problemas de fiscalização sanitária em matéria de comércio intracomunitário de animais das espécies bovina e suína. De acordo com a 93/24/CEE, foi iniciado em 1992, um programa de erradicação da DA em todos os Estados membros da Comunidade. O programa contou com uma política de

vacinação, um abate sistêmico e imediato e diagnóstico por meio de ensaios imunoenzimáticos (ELISA) para detecção de anticorpos para glicoproteínas do vírus da DA no soro.

Entre 1980 e 1990, foram relatados alguns casos da infecção pelo SuHV-1 em suínos e javalis nas Américas, Europa e na África. Na Europa, a detecção de javalis selvagens soropositivos na Alemanha, Itália, ex-Iugoslávia e Holanda indicou que o SuHV-1 persistia em países onde programas de erradicação em animais domésticos já haviam sido estabelecidos. Nos últimos anos, o aumento dos inquéritos sorológicos e monitoramento de javalis selvagens indicaram o declínio da ocorrência de infecção pelo SuHV-1 nos seguintes países: Croácia, República Tcheca, França, Eslovênia, Polônia, Rússia, Suíça e Espanha (Muller *et al.*, 2010). Considerando o sucesso de programas de erradicação da DA e o *status* de oficialmente livre da doença obtidos por vários países, torna-se relevante o conhecimento das infecções do SuHV-1 em animais selvagens. Vale ressaltar que a Organização Mundial de Sanidade Animal (OIE) exige que medidas sejam implementadas para evitar a transmissão do SuHV-1 para javalis e suínos domésticos.

Segundo Carini e Maciel (1912), a DA foi diagnosticada pela primeira vez no Brasil em 1912. De acordo com Vidor (1988), a primeira notificação no Brasil foi em 1932. Desde 1934, através do Decreto nº 24.548, a DA é uma enfermidade de notificação obrigatória no Brasil, e passível de medidas de defesa sanitária animal. Em 1939, Carneiro e Leme, diagnosticaram a DA em ovinos, caprinos e bovinos (MAPA, 2007). No Estado do Rio Grande do Sul (RS), o SuHV-1 foi detectado pela primeira vez em um bovino no ano de 1954 (Silva *et al.*, 2005). Até 1978, poucos focos foram identificados em Minas Gerais, Rio de Janeiro, Rio Grande do Sul e São Paulo (Bauer, 1955; Hipólito *et al.*, 1960; Silva *et al.*, 1960; Silva *et al.*, 1961). Eles se multiplicaram na década de 1980, quando a doença se tornou relevante, com surtos nos estados de São Paulo, Paraná, Minas

Gerais e Santa Catarina, que são exportadores de material genético (Kotait *et al.*, 1986; Brentano, 1992).

No Estado de Goiás foram diagnosticados três focos da DA, um em 1892, outro em 1987 e outro em 1988 (Souza *et al.*, 2002). Em 2001 foi estimado um prejuízo para o setor suinícola de Santa Catarina de R\$ 931.224,00 ao ano devido à DA, desconsiderando-se o impacto negativo sobre o comércio de reprodutores e o mercado exportador (Zanella *et al.*, 2001). Por essa razão, a Embrapa Suínos e Aves, em parceria com produtores e outras instituições ligadas à suinocultura, iniciou, em 2001, um programa de erradicação da DA no Estado (Morés e Zanella, 2005). Dois surtos ainda ocorreram em plantéis de suínos domésticos em granjas localizadas no norte do Estado do RS, no ano de 2003 (Silva *et al.*, 2005).

## 2.1.2.SANIDADE ANIMAL

A saúde animal, numa visão ampliada, envolve questões relacionadas a enfermidades dos animais, saúde pública, controle dos riscos em toda a cadeia produtiva, assegurando a oferta de alimentos seguros e bem estar animal. Para assegurar a saúde animal, é necessária a existência de serviços veterinários bem estruturados, capacitados e aptos para detecção e adoção precoce das medidas de controle e erradicação das doenças. Em sintonia com a OIE, que reconhece os serviços veterinários como um bem público mundial, o serviço veterinário brasileiro, responsável pela condução da política de saúde animal, compartilha com o setor privado as responsabilidades para aplicação das medidas que objetivam a melhoria da saúde animal (MAPA, 2009).

Pela importância econômica da suinocultura e necessidade de controlar a disseminação de doenças a níveis desejáveis de produtividade, foi estabelecida a certificação de granjas de reprodutores suídeos certificadas (GRSC) pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento conforme a Instrução Normativa nº 19 de 15 de fevereiro de 2002.

A comercialização e distribuição, no território nacional, de suídeos destinados à reprodução, assim como a sua participação em exposições, feiras e leilões, são permitidas somente àqueles provenientes dessas granjas. Para receber a certificação, granja deve atender as condições estabelecidas na legislação, que inclui fatores relacionados à biossegurança e à sanidade dos rebanhos e a realização de exames para: Peste Suína Clássica, Aujeszky, Brucelose, Leptospirose e Sarna realizado por laboratório credenciado e tuberculose realizados na granja pelo veterinário responsável (Brasil, 2002). É importante ressaltar o potencial de disseminação do SuHV-1 a partir de granjas que comercializam ilegalmente suínos de reposição (Maes *et al.*, 1997). Esta é a principal razão para praticar a reposição do plantel apenas com suínos de granjas GRSC.

Em 2004, foi criado o Programa Nacional de Sanidade Suídea (PNSS) que se aplica ao controle sanitário oficial a ser realizado nos estabelecimentos de criação de suídeos que desenvolvam atividades relacionadas à produção, reprodução, comercialização de suídeos e de material de multiplicação de origem suídea, bem como impedir a introdução de doenças exóticas e controlar ou erradicar aquelas já existentes no Brasil.

As atividades para o controle e erradicação da DA são coordenadas pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. O Instituto Mineiro Agropecuário (IMA) é o órgão responsável por realizar o cadastramento das granjas comerciais e o controle das criações de subsistência e dos transportadores de suínos no Estado de Minas Gerais.

No código zoosanitário da OIE, a DA é considerada doença de caráter notificável e estabelece categoria de países/zonas de acordo com a situação: Livres e Infectadas (dentro destas zonas são admitidos Estabelecimentos Livres). A DA também impõe limitações ao comércio de animais vivos e ao material genético (sêmen e embriões), porém, não exclui o intercâmbio

de carnes (carcaças, cortes, produtos industrializados) (OIE, 2010).

Segundo o PNSS, Unidades da Federação certificadas pela Instância Central e Superior como livres ou provisoriamente livres de DA devem implementar um monitoramento soroepidemiológico, de periodicidade anual, abrangendo todos os estabelecimentos de criação de suídeos que representem risco, bem como investigações periódicas realizadas a partir de amostras colhidas pelo serviço de inspeção em abatedouros de suídeos, de forma a contribuir para a manutenção dessa condição sanitária (MAPA, 2009).

De acordo com o Fundo de Desenvolvimento Agropecuário do Estado do Paraná (FUNDEPEC), a partir de 1984, foi implantado um Programa de Monitoramento Sorológico e Erradicação da doença em granjas de reprodutores suínos, com controle de comercialização e certificação de estabelecimentos livres da doença. O Estado de São Paulo, no ano de 2006, aderiu ao Programa por deliberação da Secretaria de Agricultura e Abastecimento, por meio da Coordenadoria de Defesa Agropecuária (CDA). Já o Estado de Minas Gerais não possui um Plano Estadual, uma vez que a adesão dos estados ao programa é voluntária. Este fato não o isenta da aplicação do Plano de Contingência para a DA estabelecida pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento através da Instrução Normativa nº 8 de 3 de abril de 2007, que descreve as normas para o controle e a erradicação da DA em suídeos domésticos em todo território nacional.

### **2.1.3. DISTRIBUIÇÃO DA DOENÇA DE AUJEZSKY**

Casos de infecção pelo SuHV-1 foram relatados em partes da Europa, Sudeste Asiático, América Central e América do Sul (OIE, 2012). Já foram reportados casos da doença em Cuba, Samoa e Ruanda (Allepuz, 2008; Center for Food Security and Public Health, 2006). O Canadá, a Nova Zelândia e os Estados Unidos são livres da DA desde 2004 (Pejsak e Trusczyński,

2006). Na Europa, a DA nunca foi registrada na Noruega, Finlândia e Malta. Na União Européia, até abril de 2008, a Finlândia, Áustria, Chipre, República Tcheca, Alemanha, Dinamarca, Luxemburgo, Eslováquia, Inglaterra, Escócia, País de Gales e Suécia eram consideradas livres da DA e nesses países a vacinação é proibida. Existe um programa de erradicação aprovado na Bélgica, nos Países Baixos, em províncias da Itália e Espanha (Allepez, 2008).

O SuHV-1 já foi isolado nas regiões Sudeste e Sul do Brasil (Piatti *et al.*, 2001). No Estado do Rio Grande do Sul (RS), o SuHV-1 foi detectado pela primeira vez em um bovino no ano de 1954 (Bauer, 1955). Estudos sorológicos realizados posteriormente não detectaram a presença de anticorpos para a enfermidade, tanto em granjas comerciais de suínos domésticos (Oliveira *et al.* 1987, Trevisol *et al.* 1995, Roehe *et al.* 1996) quanto de javalis (Braga *et al.* 2002). No entanto, ocorreram dois surtos em plantéis de suínos domésticos em granjas localizadas no norte do RS, no ano de 2003 (Groff *et al.* 2005).

Relatou-se a ocorrência de 66 focos da DA no Estado de São Paulo, no período de 1982 a 1986 (Kotait *et al.*, 1986). Também houve registro de isolamento de SuHV-1 a partir de órgãos de suínos infectados no Estado do Paraná (Schaefer *et al.*, 2006). Em 2006, foi realizado um inquérito sorológico nas criações de javalis no estado de São Paulo e constatou-se a soroprevalência do SuHV-1 em 30,7%, o que mostra a importância da inclusão dos javalis no programa de controle e erradicação da DA (Cunha *et al.*, 2006).

Em 2010, de acordo com os dados fornecidos pela WAHID OIE e ilustrados na Figura 1, o Brasil registrou três casos no Estado do Mato Grosso do Sul e cinco casos no Estado de Rondônia. Já em 2011, oito casos foram registrados no Estado do Paraná e quatro no Estado de São Paulo (OIE, 2012). O mapa dos registros dos casos da DA em 2011, fornecido pela WAHID OIE pode ser observado na Figura 2.

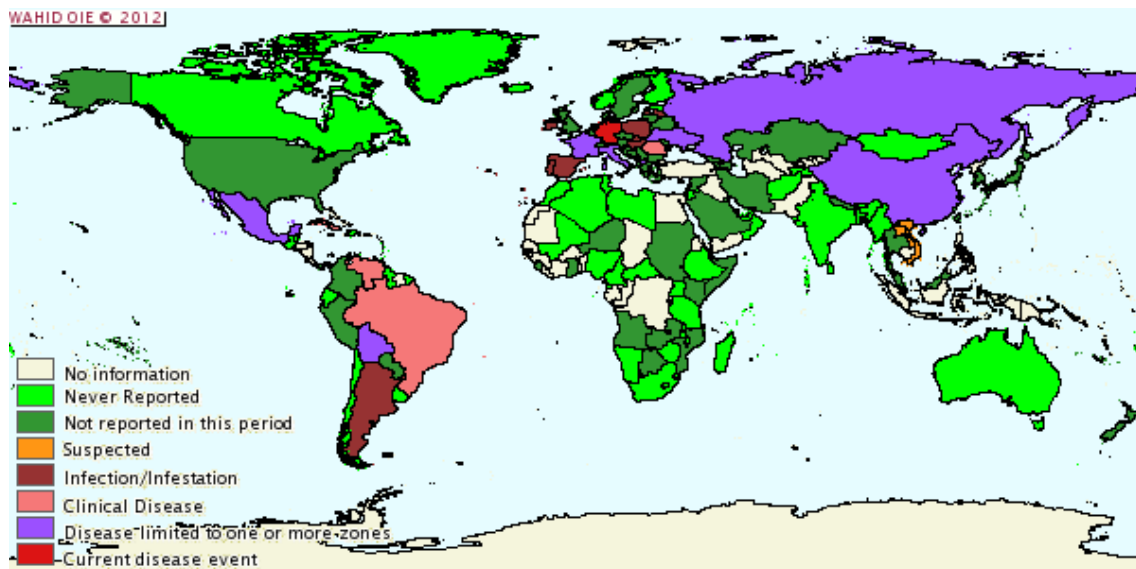


Figura 1 - Mapa da distribuição da DA no período de jan-dez de 2010 (WAHID, 2012)

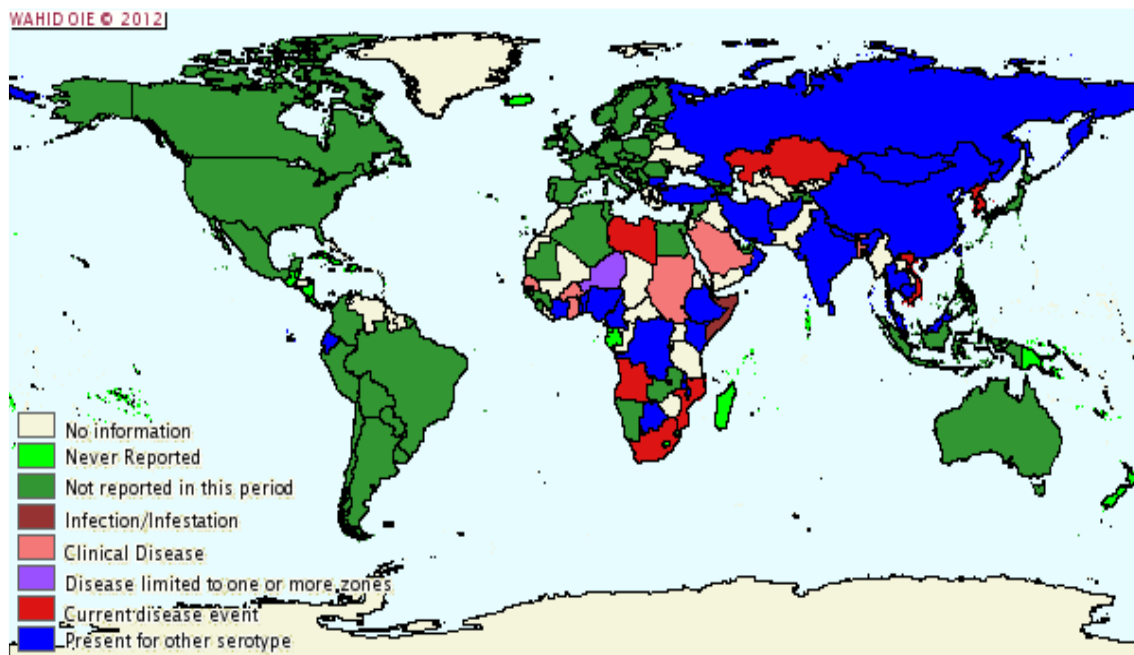


Figura 2 - Mapa da distribuição da DA no período de jun-dez de 2011 (WAHID, 2012)

#### 2.1.4. ETIOLOGIA

De acordo com o Comitê Internacional de Taxonomia dos Vírus, a maioria dos herpesvírus podem ser subdivididos em três subfamílias principais, baseados em suas características biológicas, genoma e organização:

*Alphaherpesvirinae*, *Betaherpesvirinae* e *Gammaherpesvirinae*. Um herpesvírus descoberto recentemente, *ictalurid herpesvirus 1*, representa o único membro fundador da quarta subfamília. Além disso, existem dezenas de herpesvírus aguardando classificação (Pomeranz *et al.*, 2005).

O SuHV-1 pertence a subfamília *Alphaherpesvirinae* e possui dentre outras características a capacidade de estabelecer infecções latentes nos neurônios sensoriais, em um período de tempo relativamente curto de replicação e lise das células. O vírus pode ser propagado em uma variedade de linhagens celulares, mais comumente nas de origem renal como PK15, Vero e MDBK derivadas de suíno, primatas e bovino. O vírus também se replica no fibroblasto do embrião do frango (Anderson *et al.*, 2008).

A partícula viral infecciosa do SuHV-1 é constituída por um DNA linear de fita dupla (aproximadamente 150 kbp), com tamanho entre 200 a 250 nm; estrutura formada por capsídeo icosaédrico, tegumento e envelope. O DNA está dentro do capsídeo que possui a função de proteção (nucleocapsídeo). O capsídeo é incorporado a uma matriz protéica conhecida como tegumento que é envolvida pelo envelope. O envelope é formado por uma membrana lipídica contendo várias glicoproteínas (Pomeranz, *et al.*, 2005).

#### 2.1.5. GENOMA

Segundo Klupp *et al.* (2004), o genoma do SuHV-1 possui 143.461 nucleotídeos (143,461 kpb), 72 ORF (Open Reading Frame) homólogas com os Alphaherpesvírus relacionados. A arquitetura do vírus é composta pelo genoma, um capsídeo icosaédrico de 162 capsômeros, um tegumento proteico e um envelope de bicamada lipídica, derivado das membranas celulares, contendo as glicoproteínas (Mettenleiter, 2000). Com base no arranjo das sequências repetidas e regiões únicas, o genoma dos herpesvirus podem ser divididos em seis classes

designadas pelas letras A, B, C, D, E e F. O genoma do SuHV-1 pertence à classe D (Pomeranz *et al.*, 2005).

Aproximadamente metade dos genes dos *Alphaherpesvirinae* são considerados “não essenciais”, isto é, são dispensáveis para a replicação viral em culturas de células (Mettenleiter, 2000; Nauwynck *et al.*, 2007).

O DNA viral possui uma alta taxa de nucleotídeos guanina (G) e de citosina (C) em torno de 73%. A sequência e a disposição dos genes no genoma do SuHV-1 são conhecidas e já está estabelecido um mapa da provável organização da transcrição (Mettenleiter, 2000).

O capsídeo contém e protege o genoma viral e quando fora da célula está sempre envolvido pelo tegumento e pelo envelope viral (Pomeranz *et al.*, 2005).

A camada de tegumento é uma estrutura eletrodensa amorfa que preenche o espaço entre o capsídeo e o envelope de partículas maduras de herpesvírus. As proteínas do tegumento estão relacionadas ao desligamento (*shut off*) célula pelo vírus e na morfogênese (Mettenleiter, 2000).

O envelope viral é uma membrana de bicamada lipídica derivada da membrana celular. Esse componente estrutura circunda o nucleocapsídeo icosaédrico e contém glicoproteínas com a função de adesão e penetração na superfície celular além da difusão célula-célula (Anderson *et al.*, 2008).

As glicoproteínas recém-sintetizadas viajam do retículo endoplasmático através do complexo de golgi para a membrana plasmática. No entanto, várias glicoproteínas do envelope são internalizadas espontaneamente ou em resposta à ligação antígeno-anticorpo. Nos monócitos infectados com o SuHV-1, a internalização das proteínas de superfície pode modular a resposta imune e protegê-lo dos anticorpos (Pomeranz *et al.*, 2005).

O genoma do SuHV-1 codifica 16 proteínas de membrana, sendo 11 modificadas por N-

glicosilação (adição de carboidratos à asparagina) e denominadas de glicoproteínas. Essas glicoproteínas gII(gB), gIII(gC), gp50 (gD), gI (gE), gX (gG), gH, gp63 (gI), gK, gL, gM e gN são similares as proteínas do vírus Herpes Simples tipo 1 (HSV-1) que infecta os humanos. Com exceção da gG, as demais glicoproteínas são constituintes do envelope viral. Destas, a gB, gD, gH e gL são essenciais para a replicação do vírus. Outras, como a gE, gI e US9 (proteína do tegumento) e a proteína não-estrutural timina kinase (TK) estão correlacionadas a virulência. As proteínas gE, gI e US9 são necessárias para a movimentação dentro do sistema nervoso. A TK é necessária para a replicação em células não mitóticas, como os neurônios (Mettenleiter, 2000; Anderson *et al.*, 2008).

Durante a entrada, as glicoproteínas gC, gB, gD, gH e gL são responsáveis pela fixação do vírus na célula hospedeira e pela fusão do envelope viral com a membrana plasmática. Como são constituintes da superfície do vírus e da célula hospedeira, as glicoproteínas representam alvos para o sistema imunológico do hospedeiro (Mettenleiter, 2000).

#### 2.1.6. CICLO DE REPLICAÇÃO VIRAL

Estudos sobre o ciclo de replicação dos herpesvírus em neurônios mostraram que o vírus penetra na célula axonal pela fusão do envelope viral com a membrana plasmática celular neural. O capsídeo, então é transportado para o corpo da célula nervosa. O transporte ao longo da cadeia de neurônios é necessário para a propagação do vírus no Sistema Nervoso Central. A invasão pelo SuHV-1 através das vias olfatórias e vias nervosas periféricas (gânglio trigêmeo) é dependente da presença da glicoproteína gI e gE, presentes no envelope (Spiridon *et al.*, 1995).

Uma cascata de eventos, mediados pelas glicoproteínas virais, devem ocorrer para a entrada do herpesvírus na célula hospedeira. Primeiro, o SuHV-1 liga-se a célula por interação de gC com proteoglicanas de heparan sulfato na matriz

extracelular. Então receptores gD ligam-se à célula, estabilizando a interação vírus-célula. Finamente, as gB, gH e gL mediam a fusão do envelope viral com a membrana plasmática, permitindo a penetração do capsídeo e do tegumento no citoplasma da célula hospedeira. Contrariamente a etapa de adsorção, a fusão da membrana é um processo dependente de energia e temperatura. Após a fusão, as proteínas do tegumento rapidamente se dissociam, processo que ocorre por fosforilação. Após o capsídeo alcançar o poro nuclear, o DNA genômico do SuHV-1 é liberado no núcleo da célula hospedeira (Pomeranz *et al.*, 2005).

### 2.1.7. SINAIS CLÍNICOS

Os sinais clínicos da infecção pelo SuHV-1 variam de acordo com fatores epidemiológicos como endemicidade e suscetibilidade dos indivíduos. A ocorrência do SuHV-1 em áreas endêmicas é associada a manifestações reprodutivas. A introdução do vírus em rebanhos livres resulta em sinais clínicos característicos, que variam de acordo com a faixa etária. Em animais jovens predominam sinais neurológicos com a taxa de mortalidade aproximando-se dos 100%. Animais adultos apresentam febre, taxas variáveis de aborto, reabsorção fetal, dificuldade respiratória e eventualmente vômitos. A mortalidade nessa faixa etária é geralmente baixa (Kluge *et al.* 1999).

A DA é caracterizada por alta mortalidade na maternidade, abortos e porcentagem variável de animais com sinais nervosos e respiratórios na creche, recria, terminação e gestação. Além da faixa etária, o aparecimento dos sinais clínicos depende do grau de exposição ao agente etiológico; da dose infectante; da estirpe e do nível de imunidade dos animais (MAPA, 2009).

Em suínos com menos de três semanas de idade, a doença pode ser caracterizada por morte súbita com pouco sinais clínicos. Frequentemente a morte é precedida por febre, apatia, falta de apetite, vômitos, fraqueza, falta de coordenação e convulsões. Quando ocorre vômitos e

diarréia, a DA se assemelha a gastroenterite suína transmissível. Em suínos com menos de duas semanas de idade perdas com morte ocorrem com frequência de até 100%. Leitões morrem no período de dois dias após o nascimento, ocasionalmente, depois de mostrar violenta agitação e tremores. Leitões infectados imediatamente após o nascimento podem mostrar sinais clínicos dentro dos primeiros dois dias de vida e geralmente morrem antes de completar 5 dias de idade. Após três semanas de idade, os suínos desenvolvem um grau de resistência à doença, e perdas com morte podem diminuir 50% e chegar a menos de 5% em suínos com cinco meses de idade. É importante ressaltar que as mortes variam de acordo com diferentes cepas do vírus (Thawley *et al.*, 1991).

A doença em suínos adultos muitas vezes não é grave, mas em algumas estirpes do vírus, as mortes podem ocorrer. A doença em adultos é caracterizada por febre e sinais respiratórios que podem incluir descargas nasal, espirros, fricção do nariz e tosse. DA é frequentemente encontrada em conjunto com outras doenças respiratórias, como *Pasteurella multocida*, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Haemophilus parasuis* e *Streptococcus suis*. Sinais nervosos como tremores, incoordenação e, ocasionalmente, prurido e cegueira podem ocorrer. Vômitos e diarréia ou prisão de ventre também podem ser observados (Thawley *et al.*, 1991, Vannier, 1991).

Em leitões não imunes, a enfermidade caracteriza-se por sinais de comprometimento neurológico e respiratório. Assim, as perdas relacionadas à DA são decorrentes das altas taxas de mortalidade e morbidade de leitões, queda da produtividade de reprodutores e redução do desenvolvimento dos animais em crescimento e terminação. Após a infecção primária, o vírus migra para gânglios nervosos, via terminações nervosas periféricas, podendo estabelecer infecção latente ou invadir o Sistema Nervoso Central (SNC). O estabelecimento de latência torna o animal uma fonte de infecção viral durante toda a vida. O vírus pode reativar da latência e ser excretado quando o animal



sofre alguma imunodepressão, por exemplo, por estresse. Em função das infecções latentes, o vírus pode periodicamente ser reexcretado pelos animais infectados, podendo disseminar o vírus no rebanho (Sobestiansky *et al.*, 1999).

### **2.1.8.EPIDEMIOLOGIA**

A introdução de animais portadores do SuHV-1 em um rebanho é a principal forma de disseminação da doença (Duinof e Vesser, 2004).

Devido à capacidade do SuHV-1 de estabelecer infecção latente nos suínos, sem o aparecimento de sinais clínicos, o suíno aparentemente não infectado é um disseminador potencial do vírus (Maes *et al.*, 1997). Bovídeos, ovinos, caprinos, canídeos, gatos, equídeos, coelhos, ratos e camundongos podem ser hospedeiros terminais. Nessas espécies a doença é terminal, com período de incubação curto (três dias) e morte entre 48 a 72 horas após manifestação dos sintomas nervosos (prurido com tendência à automutilação) (MAPA, 2009).

Em suínos infectados, o período de excreção do SuHV-1 é variável, mas pode durar de 10 a 21 dias após a infecção, mas muitos deles desenvolvem latência e nesses, a excreção do vírus pode não ocorrer, mas ser reativada em condições de imunossupressão (estresse, transporte, parto, confinamento, infecções parasitárias, outras doenças e administração de corticosteroides) (Mores *et al.*, 2007; Ciacci-Zanella *et al.*, 2008).

Em relação à imunidade, a recuperação do suíno à pseudorraiva confere alguma resistência por pelo menos 12 meses. Reexposição pode resultar em reinfeção, mas é geralmente assintomática. A imunidade passiva passada de uma porca imune à sua prole protege o leitão de cinco a 10 semanas, após esse período eles tornam-se gradualmente sensíveis (Thawley *et al.*, 1991).

A transmissão do SuHV-1 ocorre principalmente pelo contato direto entre animais infectados e suscetíveis por via orofaríngea e indiretamente pela ingestão de alimentos e água contaminados, por fômites ou carcaças contaminadas. O vírus ainda pode ser transmitido via transplacentária e pelo sêmen durante a monta natural ou inseminação artificial (Braga *et al.*, 2005). Dentre os múltiplos mecanismos pelos quais o SuHV-1 pode ser transmitido de um rebanho para outro, o movimento de suínos que estão eliminando o vírus é o mais frequente. A transmissão primária do SuHV-1 entre suínos ocorre por contato nariz-nariz. O contato estabelecido entre suínos alojados nas mesmas baias ou baias vizinhas tem maior risco de transmissão do vírus, o que justifica a realização da sorologia (Mores *et al.*, 2007).

O SuHV-1 é mais estável em locais frescos e ambiente úmido com pH  $7,0 \pm 1,0$ . Ele perde rapidamente a infectividade após secagem ou exposição à luz ultravioleta (Anderson *et al.*, 2008).

Esta habilidade dos herpesvírus em estabelecer e reativar a latência em gânglios sensoriais de sistema nervoso (trigêmeo) e no tecido linfóide das tonsilas de suídeos, constitui-se no ponto-chave da epidemiologia dessas infecções. A condição de latência do agente torna o suíno uma fonte de disseminação viral durante toda a vida (Van Oirschot *et al.*, 1990; Anderson *et al.*, 2008).

### **2.1.9.ERRADICAÇÃO DA DOENÇA DE AUJESZKY NOS REBANHOS SUÍNOS**

Não existe tratamento específico contra a DA. De acordo com o PNSS, para prevenção e controle da doença são necessárias: aplicação de medidas estabelecidas no Plano de Contingência em focos de DA, vigilância soropidemiológica ativa para identificação de estabelecimentos de criação livres de DA, erradicação da infecção por despovoamento completo e imediato nas regiões onde a vacinação é proibida e vacinação. De acordo com as normas para erradicação da DA do território

nacional, estabelecidas pelo MAPA, na metodologia por despovoamento imediato, o estabelecimento de criação deve ser saneado imediatamente, com abate sanitário de todo o rebanho suídeo existente, independente da idade e do estado fisiológico das fêmeas do plantel. Na erradicação por despovoamento gradual, o rebanho deve sofrer abate sanitário dentro de um período máximo de 90 (noventa) dias, a contar do diagnóstico inicial. Na erradicação por sorologia, o estabelecimento de criação afetado será submetido a testes sorológicos periódicos, capazes de diferenciar se os títulos de anticorpos são decorrentes da infecção pelo SuHV-1 ou do processo de vacinação, de forma sistemática, com eliminação gradual do plantel positivo. Estabelecimentos de criação submetidos a qualquer uma dessas estratégias de erradicação devem ter sua condição de livres de DA confirmada através da realização de duas sorologias por amostragem consecutivas, em intervalos de seis meses, realizadas de forma independente para o plantel e animais de engorda (MAPA, 2009).

Nos animais soropositivos desta espécie, o SuHV-1 pode estabelecer latência por períodos longos nos gânglios nervosos. Esta é a principal razão porque os rebanhos positivos convivem com a infecção, mesmo fazendo uso da vacinação, sem manifestar a doença (Morés *et al.*, 2007). Suídeos vacinados podem apresentar soroconversão para o vírus de campo, mas a reativação do SuHV-1 raramente ocorre ou, se ocorre, não provoca extensiva difusão (Stegeman *et al.*, 1994).

A erradicação do SuHV-1 dos rebanhos pode ser feita por despovoamento, seguido de vazio sanitário e repopulação com suínos livres ou pelo uso de vacinas marcadas deletadas para alguma glicoproteína. A erradicação do SuHV-1 dos rebanhos por despovoamento, seguido de vazio sanitário, tem um custo elevado e deve ser adotado em regiões com baixa prevalência da doença (Ciacci-Zanella *et al.*, 2008). Já as vacinas deletadas mostram-se eficientes na redução ou mesmo no bloqueio da transmissão do SuHV-1 e estão disponíveis

para programas de erradicação, baseados na diferenciação entre animais vacinados e infectados (Duinof e Vesseur, 2004). Embora a imunidade induzida pela vacinação não impeça a excreção viral após a infecção, a utilização de vacinas contra a enfermidade tem como objetivo não só proteger os suínos contra as manifestações clínicas da doença, mas também prevenir o estabelecimento da infecção, ou se esta ocorrer, reduzir a eliminação viral. No controle dos herpesvírus, o uso de vacinas vivas atenuadas pode acarretar a transmissão horizontal o vírus, contribuindo, desta forma, para a propagação e manutenção do agente em populações animais (De Leeuw *et al.*, 1980; Kimman, 1994).

#### 2.1.10. DIAGNÓSTICO

O diagnóstico de doenças infecciosas é realizado por detecção direta ou indireta do agente. Nos métodos de detecção direta, as partículas do agente e/ou seus componentes, tais como, ácidos nucleicos, enzimas e proteínas estruturais, podem ser detectados. Nos métodos indiretos, anticorpos induzidos pela presença do agente podem ser identificados (OIE, 2008).

O diagnóstico da DA é realizado pela detecção direta do agente (isolamento e identificação do vírus ou por reação em cadeia da polimerase), bem como por detecção de uma resposta sorológica no animal vivo. Para um isolamento pós-morte, o SuHV-1 pode ser encontrado em amostras de cérebro e tonsilas e também no pulmão, baço, fígado, rim, linfonodo e mucosa faríngea. Para identificação do agente é necessário o isolamento do vírus a partir da inoculação de um tecido, por exemplo, do cérebro e tonsilas ou material colhido da região orofaríngea, em uma linhagem de células suscetíveis, tais como PK-15, SK6. A especificidade do efeito citopático é verificada por imunoperoxidase ou imunofluorescência, ou neutralização com anti-soro específico. O DNA viral também pode ser identificado utilizando técnicas de biologia molecular como a PCR convencional ou a PCR em tempo real. Já nos testes sorológicos, os anticorpos são

demonstrados por neutralização do vírus, aglutinação em látex ou ensaios imunoenzimáticos (ELISA). Uma série de kits de ELISA estão disponíveis comercialmente em todo o mundo. Um soro padrão internacional da OIE define o limite inferior de sensibilidade para testes de rotina pelos laboratórios que realizam o diagnóstico sorológico da doença de Aujeszky. Desde 1990, tornou-se possível distinguir entre os anticorpos resultantes de infecções naturais e os da vacinação, a partir do uso de vacinas deletadas, usando a metodologia de ELISA (Pejsak e Trusczynski, 2006; OIE, 2008).

No Brasil, segundo o PNSS, o diagnóstico da DA em suídeos pode ser realizado a partir de provas sorológicas (ELISA triagem ou ELISA diferencial para glicoproteína viral gE, naqueles estabelecimentos onde a vacinação é praticada) e o teste de neutralização viral, realizados exclusivamente em laboratório oficial ou credenciado (MAPA, 2009). Além disso, de acordo com a Portaria 22 de 22 de maio de 2007, amostras de cérebro, baço, pulmão e fetos abortados podem ser submetidos à tentativa de isolamento viral ou provas moleculares (PCR). A técnica de isolamento viral está sendo substituída pela PCR porque demanda um maior tempo de diagnóstico, exige a presença do organismo replicante e pelo fato das culturas e manutenção com instalações possuírem custo elevado (OIE, 2008).

#### **2.1.11. VACINA**

A vacinação dos suídeos é um importante instrumento para o controle da manifestação clínica da DA nos focos submetidos a qualquer uma das estratégias de erradicação da enfermidade, bem como naqueles estabelecimentos de criação considerados sob risco de adquirir a infecção (MAPA, 2009).

A vacinação de suínos contra a DA é uma prática comum na maioria dos países com ocorrência endêmica da doença. Embora a imunidade induzida pela vacinação de suínos não impeça a excreção viral após infecção, a utilização de vacinas contra esta

enfermidade tem como objetivo não só proteger os suínos contra as manifestações clínicas da doença, mas também prevenir o estabelecimento da infecção ou, se esta ocorrer, reduzir a eliminação viral (Cunha, 2006). Além disso, induz a uma menor invasão dos tecidos, impedindo a transmissão transplacentária. Tudo isso contribui para a redução da incidência da DA em estabelecimentos de criação que praticam a vacinação (MAPA, 2009).

Embora a imunidade induzida pela vacinação de suínos não impeça a excreção viral após infecção, a utilização de vacinas contra esta enfermidade tem como objetivo não só proteger os suínos contra as manifestações clínicas da doença, mas também prevenir a disseminação do vírus, se esta ocorrer, reduzir a eliminação viral. De um modo geral, as vacinas atenuadas são mais eficazes que as inativadas. No entanto, para o controle dos herpesvírus, o uso de vacinas atenuadas pode acarretar a transmissão horizontal do vírus, contribuindo, desta forma, para a propagação e manutenção do agente em populações animais. O menor poder imunogênico das vacinas inativadas pode ser contornado com o uso de substâncias adicionadas à formulação (Cunha *et al.*, 1998). Porém, as vacinas inativadas podem induzir reações adversas devido ao adjuvante empregado, sendo que em alguns países tem sido proibido o uso de óleo mineral como adjuvante (Kimman, 1994). Reações locais também estão associadas ao uso de vacinas contendo óleo mineral (OIE, 2008).

O uso de vacinas no Brasil é regulado por órgão oficial e somente é permitido durante a emergência sanitária deflagrada pela ocorrência de um foco. A vacinação é permitida no Brasil somente em casos de focos confirmados, sendo permitido o uso de vacinas atenuadas e inativadas, desde que não produzam anticorpos para gE. O plano também preconiza a proibição do trânsito de animais vacinados, a menos que seja para o abate imediato em abatedouro reconhecido pelo Sistema Brasileiro de Inspeção de Produtos de Origem Animal (Brasil, 2007).

### 2.1.12. DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO

O teste de soroneutralização (SNT) e o ELISA (*Enzyme-linked immuno sorbent assay*) podem ser usados para o diagnóstico da DA. Quando comparados, o ELISA oferece mais vantagens para o uso rotineiro do que o SNT, por ser mais eficiente e mais rápido (Durham *et al.*, 1985).

O SNT consiste em um período de incubação da suspensão vírus com soro em culturas celulares (Van Oirschot *et al.*, 1986). O período de incubação do SNT é de 24 horas. Já o SNT rápida consiste num período de incubação de uma hora. Algumas desvantagens desse teste são o uso de cultivo celular que demanda infraestrutura e pessoal especializado, tempo gasto com o processamento e existência de amostras tóxicas que impossibilitam a interpretação dos resultados (Wittmann, 1989). No ELISA, uma enzima reage com um substrato incolor para gerar um produto colorido que é covalentemente ligada a um anticorpo específico, reconhecendo um antígeno alvo. Se o antígeno estiver presente, o complexo anticorpo-enzima irá ligar-se a ele e a enzima catalisará a reação. A presença de cor indica a presença do antígeno. O uso de anticorpos monoclonais resulta em maior especificidade (Goldsby *et al.*, 2000).

Existe ainda um ELISA diferencial para anticorpos para a glicoproteína (gE ou gD, por exemplo) do SuHV-1 que pode ser usado como diagnóstico sorológico. Através desse exame sorológico diferencial é possível distinguir os soros de suínos vacinados dos não vacinados (Ciacci-Zanella *et al.*, 2008). Porém, este teste só é possível de ser realizado se os animais forem vacinados com vacinas deletadas, ou seja, vacinas produzidas sem determinadas proteínas do vírus. O Plano Nacional de Contingência da DA descreve como obrigatória a utilização de vacinas deletadas para gE.

Quando testados, o ELISA diferencial demonstrou ser menos sensível que o ELISA convencional e apresentou a mesma

especificidade. Em relação aos títulos de anticorpos, os resultados obtidos do ELISA diferencial foram menores que o ELISA convencional, compatíveis aos medidos pelo teste de neutralização 24 horas e maior do que os medidos pelo teste de neutralização uma hora (Oirschot, 1991).

O ensaio de imunoperoxidase em monocamada de células (IPMA) também pode ser usado na detecção de anticorpos para gE do SuHV-1 através da competição de células infectadas com o antígeno e do anticorpo monoclonal (Van Oirschot *et al.*, 1990).

Existe o teste de aglutinação em látex (LA) que também pode ser usado como diagnóstico da DA (Kit *et al.*, 1990). Nesse teste, as partículas de látex são recobertas com antígenos para a detecção de anticorpos.

Apesar da especificidade dos testes baseados na detecção de anticorpos, existe a desvantagem de depender da soroconversão do animal. A utilização desses testes durante a fase aguda da doença pode levar a resultados falso-negativos, pois são necessários pelo menos 10 dias, em média, para a detecção dos anticorpos. Outra desvantagem é que animais mais jovens podem morrer antes da soroconversão, inviabilizando o diagnóstico sorológico (Kinker *et al.*, 1997).

### 2.1.13. DIAGNÓSTICO MOLECULAR

A introdução da técnica de PCR para a detecção de patógenos tem sido estabelecida em diagnósticos laboratoriais como uma valiosa alternativa para os métodos tradicionais. Rapidez, bom limite de detecção e seletividade são as maiores vantagens deste método. Essa técnica consiste na extração do DNA do patógeno e amplificação pela ação da enzima DNA polimerase, na presença de iniciadores e moldes de DNA específicos para o patógeno (Nunes, 2005). A reação em cadeia da polimerase (PCR) tem melhorado significativamente o diagnóstico molecular nos últimos anos, seguindo de uma rápida replicação *in vitro* e a subsequente

identificação de sequências específicas de ácido nucléico. Em relação ao custo, uma reação completa de PCR (extração + PCR) muitas vezes é mais viável economicamente do que uma reação sorológica, devido ao alto preço de alguns anticorpos comerciais.

Resumidamente, a PCR permite a síntese específica e exponencial de uma região predeterminada do DNA alvo a partir de dois fragmentos de DNA (*primers* ou oligonucleotídeos). Esses *primers*, sequências de nucleotídeos, formam os terminos da molécula de ácido nucléico a ser amplificado, uma vez que os primers são projetados para serem complementares as moléculas de DNA alvo (Pelt-Verkuil *et al.*, 2008).

A amplificação é um processo cíclico, onde o DNA alvo é inicialmente desnaturado para separar a dupla fita do DNA. Normalmente, a desnaturação é alcançada a uma temperatura de 94°C por 5 minutos. A hibridização dos *primers* em cada fita do DNA alvo ocorre através da redução da temperatura (temperatura de anelamento -  $T_m$ ) que normalmente varia de 40°C a 65°C, dependendo da sequência de oligonucleotídeos utilizadas. Após a etapa de hibridização, a temperatura é aumentada para aproximadamente 72°C, ideal para a enzima DNA polimerase termoestável sintetizar as moléculas de DNA alvo (*amplicon*). O ciclo é repetido várias vezes e cada *amplicon* formado serve de molde para a síntese de um novo *amplicon* (amplificação exponencial) (Pelt-Verkuil *et al.*, 2008). A visualização das bandas de DNA recém-sintetizadas é possível através da eletroforese em gel.

Vários fatores podem determinar o sucesso ou fracasso de um protocolo de PCR. Dentre eles: a natureza dos tubos de reação (devem possuir paredes finas, capacidade de conduzir calor e evitar a evaporação dos reagentes); o uso termocicladores com tampas aquecidas (garantem mais eficiência nas rampas e evita evaporação dos reagentes presentes nos tubos); a qualidade e concentração dos reagentes e DNA alvo (podem afetar a sensibilidade e especificidade da reação); o desenho dos

*primers* e sondas (diretamente relacionado com especificidade da reação); o uso de controles adequados (positivos conhecidos, negativos e brancos) e registro de todo o procedimento (Pelt-Verkuil *et al.*, 2008).

A detecção do SuHV-1, no estado latente ou replicativo, pela PCR, é uma ferramenta importante no controle da doença de Aujeszky (Yoon *et al.*, 2009).

No Brasil, foram identificados os genótipos I e II do SuHV-1 por meio do RFLP (*Restriction Fragment length Polymorfism*) (Piatti *et al.*, 2001). Esse método permite a identificação de genótipos através da análise de polimorfismos de fragmentos de restrição do DNA, o que é importante para estudos epidemiológicos (Kluge *et al.*, 1999). Quando comparada aos métodos de sequenciamento possuem menor custo, além de ser uma metodologia menos elaborada.

Já a *nested-PCR* pode ser usada para melhorar a especificidade e a eficiência da reação, o segmento é amplificado primeiro de forma abrangente, copiando até mesmo sequências localizadas fora dela, e depois, utilizando este produto, a amplificação da real sequência (Yoon *et al.*, 2005). Um estudo realizado por Fonseca Jr *et al.* 2010, demonstrou que a *nested-PCR* pode ser usada como método de detecção do SuHV-1.

Metodologias baseadas na PCR em tempo real melhoraram a sensibilidade analítica e a objetividade da interpretação dos resultados (Krenke *et al.*, 2005). Além disso, os resultados são obtidos dentro de algumas horas. Com o advento da PCR em tempo real, é possível acompanhar a amplificação durante os ciclos da PCR a partir da detecção de um sinal de fluorescência. Essa amplificação pode ser definida por quatro fases: *baseline*, exponencial, linear e plateau. Na *baseline* a amplificação está abaixo do nível de detecção do instrumento. Na fase exponencial a reação está ocorrendo com taxa máxima de eficiência. A duração dessa fase depende da qualidade e concentração dos reagentes. Nessa fase ocorre o consumo da maior parte dos

reagentes presentes na reação. Em uma reação ideal, onde ocorre 100% de eficiência, duas moléculas completas são sintetizadas a partir de cada fita molde em cada ciclo. Na fase linear, a eficiência da amplificação começa a cair, pois os produtos da reação já não estão disponíveis ou já foram consumidos durante a fase exponencial. A fase plateau é alcançada rapidamente ao final da reação, onde ocorrem os últimos ciclos da PCR (Dorak, 2006).

O aumento da fluorescência é diretamente proporcional ao aumento de produto amplificado durante os ciclos. Moléculas fluorescentes (corantes) absorvem a luz como fótons dentro de uma faixa estreita de comprimento de onda. Durante a excitação o corante absorve o máximo da luz, a molécula é empurrada para um estado de energia mais alto. Este estado de energia é transitório e de curta duração. A molécula que recebe a excitação rapidamente volta para o estado de baixa energia. Quando isso ocorre um fóton é liberado e emitido em um comprimento de onda. Para cada corante existe uma estreita faixa de comprimento de onda ótima de excitação e emissão de energia (Dorak, 2006).

A rápida detecção de agentes infecciosos são essenciais para auxiliar nos programas de controle e erradicação das doenças. A PCR em tempo real difere do padrão de PCR porque os produtos gerados são coletados (captação de sinal fluorescente) durante os ciclos de amplificação usando sondas de hibridização que realçam a especificidade do teste (Dorak, 2006). É uma metodologia que apresenta como vantagem um menor risco de contaminação cruzada, em relação à nested-PCR. Em comparação à PCR convencional, oferece uma faixa dinâmica de detecção muito mais ampla. São mais sensíveis porque seu formato é otimizado para obtenção de sua eficiência máxima, e mais específicos pela necessidade, na maioria dos formatos, do anelamento específico de pelo menos três oligonucleotídeos: dois iniciadores e uma sonda. A PCR pode ser usada para identificação do SuHV-1 em secreções ou

amostras de tecidos (Pejsak e Truscynski, 2006).

#### 2.1.13.1. SYBRGREEN

O *SybrGreen* é um agente intercalante do DNA, um sistema simples usado para detecção de RNA ou DNA na metodologia de PCR em tempo real. Esse fluoróforo possui uma excitação e emissão máxima de 494 nm e 521 nm, respectivamente (Siraj, 2002). Envolve a incorporação do corante livre a uma molécula de DNA recém-sintetizado. A detecção é monitorada através da intensidade da fluorescência ao longo dos ciclos. Durante os primeiros ciclos da PCR, o sinal de fluorescência emitido pelo *SybrGreen* é fraco para ser detectado. Durante a fase exponencial, o sinal de fluorescência aumenta proporcional à quantidade de DNA sintetizado pela PCR. Ao final da reação, na fase platô, o sinal para de aumentar, indicando que a PCR está atingindo a saturação (Dorak, 2006). A diferenciação dos produtos da PCR é possível através da análise da curva de dissociação (Gudnason *et al.*, 2007). Os dados obtidos pelo sinal de fluorescência durante a reação correspondem a uma curva de dissociação por amostra, representada pelo *amplicon* gerado. A curva de dissociação representa a dissociação da dupla fita de DNA com o aumento da temperatura. A visualização e análise dos dados são interpretadas em um software específico.

Dentre as vantagens estão: baixo custo, facilidade para desenvolver o ensaio e apenas um par de *primers* é necessário. A principal desvantagem é a inespecificidade da reação, uma vez que o corante se liga a qualquer molécula fita dupla (DNA alvo ou não e dímeros de *primers*) gerando um sinal de fluorescência. Sendo assim, é necessário um cuidado especial na escolha e qualidade dos *primers* (Dorak, 2006).

#### 2.1.13.2. SONDA DE HIBRIDIZAÇÃO

Inicialmente, foram utilizados corantes intercalantes do DNA para medir os produtos da PCR em tempo real. A desvantagem desses corantes é que podem

além de detectar o acúmulo de produtos específicos, podem também detectar produtos não específicos da PCR. Os sistemas em tempo real para PCR foram aperfeiçoados pela introdução de sondas marcadas com fluorescência que utilizam atividade nuclease 5' da Taq DNA polimerase. A disponibilidade destas sondas fluorescentes permitiu o desenvolvimento de um método em tempo real para detecção somente de produtos de amplificação específicos.

As sondas hidrolisadas são as químicas amplamente usadas nas reações de PCR (Livak *et al.*, 1995). Um emissor de fluorescência ou *reporter* (ex: o fluoróforo FAM) é posicionado na extremidade 5' da sonda e um *quencher* (silenciador) (ex: o TAMRA) é colocado na extremidade 3'. Enquanto a sonda está intacta, a proximidade do *quencher* reduz muito a fluorescência emitida pelo corante *reporter* pela transferência de energia por ressonância de fluorescência através do espaço (a distância entre elas pode variar de 100 Å ou mais dependendo do fluoróforo ou do *quencher* escolhido). A sonda é desenhada para anelar junto a um dos *primers* e quando a Taq DNA polimerase estende a fita, cliva a extremidade 5', separando o *reporter* e *quencher* e assim liberando a fluorescência do *reporter* (Lukhtanov *et al.*, 2001). A quantidade de fluorescência detectada pela PCR em tempo real é diretamente proporcional a quantidade de produto amplificado pela reação.

Para aumentar a eficiência da reação, ou seja, facilitar a hibridização da sonda com os *primers* é requerido um passo de desnaturação (geralmente de 95°C) e que a combinação anelamento/extensão ocorra a uma temperatura de 7°C a 10 °C abaixo da T<sub>m</sub> da sonda. Quando comparada com químicas não específicas, como o *SybrGreen*, a sonda usada junto aos *primers* aumentam a especificidade do ensaio de PCR, uma vez que inclui um terceiro oligonucleotídeo na reação (Dorak, 2006).

As vantagens do sistema são:

- É necessário a hibridização específica entre a sonda e o alvo para gerar sinal fluorescente.
- As sondas podem ser marcadas com corantes (*reporter*) distintos e distinguíveis, os quais permitem a amplificação de duas sequências distintas em um mesmo tubo de reação.
- O pós-processamento da PCR é eliminado, o que reduz a mão-de-obra do ensaio e os custos de materiais.

A desvantagem do sistema é a necessidade de síntese de diferentes sondas para sequências distintas.

### 2.1.13.3. PLEXOR

A tecnologia Plexor<sup>®</sup> mede diretamente a acumulação de *amplicons*. A isoguanina (iso-dG) e a extremidade 5'-metiliscitosina (iso-dC) formam um único par de bases na dupla fita de DNA. Assim, um primer é sintetizado com a base iso-dC e uma marca fluorescente na extremidade 5'. Já o segundo primer não é marcado. No mix de reação estão presentes deoxynucleotídeos e iso-dGTP modificado com o *quencher* dabcyI. Durante os ciclos da PCR, uma molécula *quencher* dabcyI-iso-dGTP é incorporada na posição complementar a iso-dC do *primer*, resultando na diminuição estática do sinal de fluorescência pelo dabcyI, proporcional à quantidade de DNA inicial. A interação entre as duas bases: iso-dC e iso-dG, variante química da citosina e da guanina, respectivamente, elimina os erros de pareamento de bases que possam ocorrer (Frankman *et al.*, 2005).

No sistema Plexor<sup>®</sup> de PCR em tempo real, a quantidade de fluorescência dos *primers* no início da reação é alta e após a amplificação o sinal diminui. A análise dos resultados é feita através da curva de dissociação (Hooper, 2005).

## 2.2. AVALIAÇÃO DE DESEMPENHO DOS TESTES DIAGNÓSTICOS

A validação metodológica é um requisito dos órgãos de acreditação, e deve ser

subsidiada e melhorada através de processos de verificação do desempenho do método. Os ensaios para validação de testes diagnósticos são portanto etapas importantes para consolidação de técnicas diagnósticas adequadas.

No Brasil, há duas agências credenciadoras para verificar a competência de laboratórios de ensaios: a ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) e o INMETRO (Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial).

O processo de avaliação do desempenho de um teste diagnóstico depende diretamente de critérios diagnósticos previamente estabelecidos, ou seja do conhecimento prévio da presença ou ausência da doença (Almeida Filho e Rouquayrol, 1992). Uma das propriedades fundamentais dos testes diagnósticos é a sua validade que pode ser mensurada mediante a sua sensibilidade e especificidade (Feinstein, 1977). Assim, a validade de um teste diagnóstico é medida pela sua habilidade em categorizar corretamente os indivíduos realmente doentes como positivos e os indivíduos sadios como negativos (Hennekens e Buring, 1987).

### 2.2.1. VERIFICAÇÃO DE DESEMPENHO

Os objetivos principais da verificação de desempenho são (ANVISA, 2007):

- Monitorar o desempenho do método sob condições utilizadas (para efetiva verificação de desempenho, as amostras devem ser concomitantemente analisadas com controles de qualidade apropriados);
- Levar em conta os efeitos das variações inevitáveis causadas, por exemplo, pela composição das amostras, desempenho do equipamento, qualidade dos reagentes, variações ligadas ao analista e condições ambientais do laboratório;

As características de desempenho investigadas no processo de validação, a

fim de demonstrar o desempenho do método são:

- Especificidade e Seletividade
- Sensibilidade
- Limite de detecção
- Repetitividade e Reprodutibilidade
- Robustez

A eficiência de amplificação da PCR pode ser usada para determinar o desempenho de um ensaio de PCR em tempo real. A eficiência de amplificação da PCR é a taxa na qual um *amplicon* de PCR é gerado, geralmente expressa como porcentagem. Se um *amplicon* de PCR dobrar em quantidade, durante a fase geométrica da amplificação, irá apresentar 100% de eficiência. A estimativa precisa da eficiência da PCR depende de uma série de fatores, tais como, os reagentes, montagens do experimento, qualidade da amostra e análise. A baixa eficiência de amplificação da PCR pode resultar em baixa precisão das amostras em replicatas.

O *slope* de uma curva padrão é comumente usado para estimar a eficiência de amplificação de uma PCR em tempo real. Uma curva padrão de PCR em tempo real é graficamente representada como um gráfico de regressão linear semi-log do valor Ct em comparação ao log da quantidade inicial de ácido nucleico. Um *slope* da curva padrão de -3,32 indica uma PCR com 100% de eficiência. Os *slopes* mais negativos que -3,32 indicam reações com menos de 100% de eficiência. Os *slopes* mais positivos que -3,32 podem indicar má qualidade da amostra ou problemas de pipetagem e homogeneidade da amostra.

As replicatas ajudam na identificação dos problemas de precisão. As replicas devem apresentar um baixo desvio padrão. O ideal é um desvio padrão Ct > 0,5. Alguns experimentos podem tolerar pequenas variações das réplicas sem interferir no resultado. Para avaliar a curva padrão o valor do R<sup>2</sup> deve ser próximo de 1. Valores de R<sup>2</sup> < 0,99 podem indicar problemas de



precisão e interferir na eficiência do ensaio (Dorak, 2006).

### **2.2.2.VALIDAÇÃO**

De acordo com a OIE, “Validação é um processo que determina a adequação de um ensaio, que foi desenvolvido corretamente, otimizado e padronizado para uma finalidade”. Inclui estimativas da análise diagnóstica e as características de desempenho de um teste (OIE, 2010).

A validação completa, envolve todas as características de desempenho e um estudo interlaboratorial que é utilizado para verificar como a metodologia se comporta com uma determinada matriz em vários laboratórios, estabelecendo a reprodutibilidade da metodologia e a incerteza expandida associada a metodologia como um todo. Só assim a metodologia pode ser aceita como uma metodologia oficial para uma determinada aplicação (Perez, 2010).

É fundamental que os laboratórios disponham de meios e critérios objetivos para demonstrar, por meio da validação, que os métodos de ensaio que executam conduzem a resultados confiáveis e adequados à qualidade pretendida. Se um método existente for modificado para atender aos requisitos específicos, ou um método totalmente novo for desenvolvido, o laboratório deve se assegurar de que as características de desempenho do método atendem aos requisitos para as operações analíticas pretendidas (INMETRO, 2011).

Um ensaio validado é avaliado continuamente para assegurar a adequação através dos resultados dos controles internos na execução de cada ensaio. Ensaio aplicado aos indivíduos ou populações possuem muitas finalidades, tais como: documentar se um país ou região encontra-se livre de uma doença, evitando a propagação da doença através do comércio; erradicação de uma infecção em uma região ou país, confirmando os casos clínicos e estimando a prevalência da infecção facilitando a análise de riscos; identificando animais infectados para implementação de medidas de controle e classificação dos

animais para a saúde do rebanho ou conferir o status de imune após vacinação (OIE, 2010).

### **2.2.3.VALIDAÇÃO DE MÉTODOS DIRETOS E INDIRETOS**

O diagnóstico de doenças infecciosas é realizado pela detecção direta ou indireta de agentes infecciosos. Através de métodos diretos, onde partículas de agentes infecciosos ou seus componentes (ácidos nucleicos, proteínas, enzimas, etc) são detectados. Já os métodos indiretos detectam a presença de anticorpos induzidos pela exposição ao agente infeccioso (OIE, 2010). Algumas vantagens dos métodos diretos em relação aos métodos indiretos são que eles não exigem a presença de organismos replicantes, infraestrutura a um custo acessível, não demora semanas para liberar o diagnóstico e possuem maior sensibilidade e especificidade analítica.

### **2.2.4.DESENVOLVIMENTO DE UM ENSAIO EXPERIMENTAL**

A OIE recomenda a escolha de pelo menos três amostras de referência bem definidas para serem usadas no ensaio. Estas amostras devem representar animais infectados e não infectados. Porém, a obtenção de amostras de referência nem sempre é possível, uma alternativa é o enriquecimento da matriz com o agente (OIE, 2010).

Para a realização de um ensaio, é desejável que sejam preparadas alíquotas para o uso em cada etapa do experimento durante todo o processo de validação. Mudar de amostra durante o processo de validação introduz uma variável que pode prejudicar a interpretação do experimento (OIE, 2010).

Todos os dados relevantes no estudo de validação de um método, como planejamento, experimentos e resultados obtidos, devem ser documentados e registrados de forma a possibilitar a rastreabilidade de todo o processo (Perez, 2010).

É importante ressaltar que a validação não é gratuita, pelo contrário, custa caro, porém deve ser considerada um investimento e não uma despesa. Como exige custo, faz-se validação por algum interesse, seja por exigência de clientes ou de fiscalização, para reduzir custos de reanálise (Perez, 2010).

### **2.2.5.ESPECIFICIDADE E SELETIVIDADE**

A especificidade e a seletividade estão relacionadas ao evento da detecção. Um método que produz resposta para apenas um analito é chamado específico. Um método que produz respostas para vários analitos, mas que pode distinguir a resposta de um analito da de outros, é chamado seletivo (INMETRO, 2010).

Para exames quantitativos, é a habilidade de um método analítico de determinar somente o analito que ele se propõe examinar. Para exames qualitativos ou semiquantitativos, é a habilidade do método analítico em obter resultados negativos em concordância com os resultados negativos obtidos pelo método de referência (ANVISA, 2001).

A especificidade do diagnóstico se refere a parte de amostras conhecidas de animais não infectados que no ensaio deverão ser negativas. E a especificidade analítica deve distinguir o analito alvo de outros componentes em pelo menos três formas distintas (OIE, 2010):

- Seletividade – método com precisão, identificar o analito alvo na presença de interferentes.
- Exclusão – capacidade de um teste detectar uma sequência que é exclusiva de um organismo alvo, excluindo todos os outros organismos conhecidos que podem gerar reação cruzada.
- Inclusão – capacidade de um teste detectar várias cepas ou sorovares de uma espécie. Caracteriza um escopo para um ensaio de triagem.

### **2.2.6.SENSIBILIDADE**

Já a sensibilidade analítica ou limiar de detecção é definida como a menor quantidade ou grau que se pode detectar em uma reação (ANVISA, 2001), ou seja, é a menor concentração do analito que pode ser determinada com um nível aceitável de exatidão e precisão. Esse limite após ter sido determinado deve ser testado para verificar se a exatidão e a precisão obtidas são satisfatórias (ANVISA, 2001).

Para ensaios de detecção direta, o limite de detecção pode ser expresso como o número de cópias do genoma, unidades formadoras de colônias, dose infecciosa, unidade formadora por placa, títulos, etc. Para ensaios de detecção indireta é a menor quantidade de anticorpos detectados (OIE, 2010).

A sensibilidade de um teste é definida pela capacidade de determinada abordagem detectar indivíduos verdadeiramente doentes, ou seja, a parte das amostras de animais infectados que no ensaio deverão ser positivas (Hennekens e Buring, 1987; OIE, 2010).

### **2.2.7.REPETITIVIDADE**

De acordo com a NBR 14501, repetitividade é a capacidade de um sistema ou instrumento de fornecer indicações rigorosamente semelhantes para aplicações repetidas do mesmo analito sob as mesmas condições de medição.

Segundo a DOQ-CGCRE-008/2007, é o grau de concordância entre os resultados de medições sucessivas de um mesmo mensurando, efetuadas sob as mesmas condições de medição, chamadas de condições de repetitividade, a seguir:

- Mesmo procedimento de medição;
- Mesmo observador;
- Mesmo instrumento usado sob mesmas condições;
- Mesmo local,
- Repetições em curto espaço de tempo.

### 2.2.8. REPRODUTIBILIDADE

É definida pela NBR 14501 como a mais próxima concordância entre os resultados do mesmo analito, onde as medições são feitas, sob condições diferentes, como por exemplo: observador, equipamento, condições de uso e de tempo.

Segundo a OIE, reprodutibilidade é a habilidade do método obter resultados consistentes, estimados com precisão, quando alíquotas de uma mesma amostra são testadas em diferentes laboratórios. Os ensaios devem ser realizados com no mínimo 20 amostras. As medições de precisão dos ensaios podem ser usadas para a reprodutibilidade e repetibilidade (OIE, 2010).

Embora a reprodutibilidade não seja um componente de validação de método executado por um único laboratório, é considerada importante quando um laboratório busca a verificação do desempenho dos seus métodos em relação aos dados de validação obtidos por meio de comparação interlaboratorial (OIE, 2010).

A precisão intermediária, também denominada de reprodutibilidade interna, refere-se à precisão avaliada sobre a mesma amostra, amostras idênticas ou padrões, utilizando o mesmo método, no mesmo laboratório, mas definindo exatamente quais as condições a variar (uma ou mais), tais como (OIE, 2010):

- Diferentes analistas;
- Diferentes equipamentos;
- Temporalidade diferente.

Esta medida de precisão é reconhecida como a mais representativa da variabilidade dos resultados em um laboratório e, como tal, mais aconselhável de usar. Para determinar a precisão intermediária de um método, efetuam-se “n” medições em replicata, ou em ensaio único, sobre a amostra, nas condições pré-definidas, pois existem vários métodos de estudar este tipo de precisão. Quando aplicável este

procedimento é repetido sobre outras amostras, abrangendo outros níveis de concentração (ANVISA, 2001).

### 2.2.9. ROBUSTEZ

A robustez de um método de ensaio mede a sensibilidade que este apresenta em face de pequenas variações. Um método diz-se robusto se revelar praticamente insensível a pequenas variações que possam ocorrer quando esse está sendo executado. Convém salientar que quanto maior for a robustez de um método, maior será a confiança desse relacionamento à sua precisão (ANVISA, 2001).

A avaliação da robustez do método deve começar durante a otimização das etapas. Variações nos parâmetros do método podem ser usados posteriormente para estabelecer as condições ideais do ensaio (OIE, 2010).

## 3. METODOLOGIA

### 3.1. LOCAL

O trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Biologia Molecular (LBM) do Laboratório Nacional Agropecuário de Minas Gerais (LANAGRO/MG) que pertence ao Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). O interlaboratorial foi desenvolvido no Laboratório de Rotina de Virologia Animal (Escola de Veterinária da UFMG).

### 3.2. AMOSTRAS

As amostras utilizadas foram contaminadas com a cepa padrão Shope, genótipo I, titulado ( $10^{4.5}$  TCID<sub>50</sub>/50µL), multiplicado em células PK-15, fornecido pelo Laboratório de Diagnóstico de Doenças Virais do LANAGRO-MG. A matriz utilizada, cérebro de suíno, foi conseguida em uma granja da região sem histórico de DA.

Para a contaminação da amostra  $10^{-1}$  foi colocado em um tubo 900 µL de tampão TE (10mM Tris HCl 1mM EDTA , pH 8) e adicionado 100 µL da cepa Shope. A partir desse tubo foram feitas as diluições

seguintes:  $10^{-2}$  (900  $\mu\text{L}$  de TE + 100  $\mu\text{L}$  da diluição  $10^{-1}$ );  $10^{-3}$  (900  $\mu\text{L}$  de TE + 100  $\mu\text{L}$  da diluição  $10^{-2}$ );  $10^{-4}$  (540  $\mu\text{L}$  de TE + 60  $\mu\text{L}$  da diluição  $10^{-3}$ );  $10^{-4,5}$  (480  $\mu\text{L}$  de TE + 120  $\mu\text{L}$  da diluição  $10^{-4}$ );  $10^{-5}$  (540  $\mu\text{L}$  de TE + 60  $\mu\text{L}$  da diluição  $10^{-4}$ ). Após a diluição foram contaminadas com aproximadamente 25 mg de tecido de cérebro suíno em 600  $\mu\text{L}$  das soluções.

Foram testadas diluições seriadas do vírus em TE nas seguintes concentrações:  $10^{3,5}$  TCID<sub>50</sub>/ 50 $\mu\text{L}$ ,  $10^{2,5}$  TCID<sub>50</sub>/ 50 $\mu\text{L}$ ,  $10^{1,5}$  TCID<sub>50</sub>/ 50 $\mu\text{L}$ ,  $10^{0,5}$  TCID<sub>50</sub>/ 50 $\mu\text{L}$ ,  $10^{-1,5}$  TCID<sub>50</sub>/ 50 $\mu\text{L}$  e  $10^{-2,5}$  TCID<sub>50</sub>/50 $\mu\text{L}$ . Além disso, foram testadas amostras positivas e negativas fornecidas pelo laboratório CEDISA (Centro de Diagnóstico de Sanidade Animal).

### 3.3. EXTRAÇÃO DAS AMOSTRAS

Foram testadas três metodologias de extração da suspensão do vírus.

#### Procedimentos da extração simples:

A amostra foi deixada em banho-maria a 95°C por 15 minutos. Centrifugada por 60 minutos a 12.000 g. Em seguida, descartado o sobrenadante e acrescentado 100 $\mu\text{L}$  de TE (10mM Tris HCl 1mM EDTA , pH 8). Armazenar a -20°C.

#### Procedimentos para extração com Trizol® (Invitrogen, EUA):

Adicionou-se 1125  $\mu\text{L}$  de trizol na amostra. Em seguida, a amostra foi homogeneizada por inversão e incubada por 5 minutos a 30°C sob agitação. Centrifugou-se a 12.000 g por 15 minutos (2 a 8°C). A fase aquosa (translúcida) foi pipetada com cuidado e descartada. A interfase e fase inferior podem ser estocadas por 18 h (2 a 8°C). Acrescentou-se 300  $\mu\text{L}$  de etanol 100% a mistura (interfase+fase inferior) para cada 1 mL de trizol utilizado. Homogeneizou-se por inversão e incubou por 2 minutos a 30°C. Centrifugou-se a 2.000 g por 5 minutos (2 a 8°C). O sobrenadante foi coletado e transferido ao novo tubo. Adicionou-se 1 mL de citrato de sódio para 1 mL de trizol utilizado. Incubou-se por 30 minutos sob agitação a 30°C (homogeneizar

periodicamente). A mistura então foi centrifugada a 2.000 g por 5 minutos (2 a 8°C). Foi coletado o sobrenadante com auxílio de micropipeta e transferido ao novo tubo. Adicionou-se 2,5 mL de etanol 75% para cada 1 mL de trizol utilizado. Incubou-se por 10 minutos sob agitação a 30°C (homogeneizar). A mistura foi centrifugada novamente a 2.000 g por 5 minutos (2 a 8°C). O sobrenadante foi descartado por inversão. Os tubos foram deixados por 5 a 15 minutos com a tampa aberta para secagem. O pellet foi ressuscitado em 80  $\mu\text{L}$  de NaOH e homogeneizado suavemente. Centrifugou-se por 10 minutos a 12.000 g (2 a 8°C). Finalmente, acrescentado 6,9  $\mu\text{L}$  de Tampão TE (10mM Tris HCl 1mM EDTA , pH 8) e armazenado a -20°C.

#### Procedimentos da extração Fenol-Clorofórmio (Sambrook *et al*, 2001):

Foi adicionada à amostra 20 $\mu\text{L}$  de Proteinase K (10 mg/ $\mu\text{L}$ ) e 180  $\mu\text{L}$  de tampão TE (10mM Tris HCl 1mM EDTA , pH 8). A mistura foi mantida a 55°C por 1 hora. Adicionou-se 200 $\mu\text{L}$  de Fenol Saturado pH 8,0 e homogeneizado por inversão. A mistura foi centrifugada por 5 minutos a 434 g. A fase aquosa foi coletada e transferida para um novo tubo. Foi adicionada 200  $\mu\text{L}$  de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1) ao novo tubo e novamente homogeneizado por inversão. Centrifugou-se a 18.327 g por 5 minutos a 20°C. A fase aquosa foi coletada e transferida para um novo tubo. Foi adicionada 2x o volume da fase aquosa de Etanol 95% e adicionada 0,1x do volume da fase aquosa de acetato de amônio. A mistura foi homogeneizada e mantida a -80°C por 1 hora e depois centrifugada por 10 minutos a 18.327 g 4°C. Acrescentou-se 500  $\mu\text{L}$  de Etanol 70% para lavar o DNA. Centrifugou-se novamente a 18.327 g. O sobrenadante foi descartado e esperou-se o pellet secar em papel absorvente por 10 minutos. Finalmente, o pellet foi ressuscitado em 100  $\mu\text{L}$  de tampão TE (10mM Tris HCl 1mM EDTA , pH 8) e armazenado a -20°C.

### 3.4. DOSAGEM DE DNA

Utilizou-se o instrumento NanoVue® (GE healthcare, EUA) para estimar a quantidade e a qualidade do material genético extraído por amostra.

### 3.5. DESENHO DOS INICIADORES

Sequências conservadas do vírus foram escolhidas como alvo para a PCR após o alinhamento no programa BioEdit (Hall, 1999) de sequências disponíveis no GenBank (NCBI). Após a verificação das

regiões desejadas, os iniciadores para o sistema de detecção SybrGreen (Tabela 1) e os iniciadores e a sonda de hibridização (Tabela 2) foram desenhados utilizando o programa Primer3Plus (Untergasser et al., 2007) e para a tecnologia Plexor (Tabela 3) utilizou-se o programa Plexor Primer Design (Hoffmann et al., 2007). Após a construção dos iniciadores todos os oligonucleotídeos foram analisados no programa Oligo Analyser 3.1 (IDT, USA) para verificação das estruturas secundárias e dos dímeros formados. A especificidade *in silico* dos iniciadores foi testada no programa PrimerBlast (NCBI) (Altschul et al., 1990).

Tabela 1 – Relação dos iniciadores usados na PCR em tempo real para amplificar os alvos gB, gC, gD e gE do SuHV-1 através do agente intercalante SybrGreen

Iniciadores	Sequência de nucleotídeos	Posição no Genoma*	Tamanho do Amplicon	Referência
gB Sybr R	5' – GGTTACGGGTACCCCGC – 3'	16697-16713	195bp	Bascuñana et al., 1997
gB Sybr F	5' – ACGGCACGGGCGTGATC – 3'	16891-16875		
gCTR R	5' – GACACCTCGCCCGAGAC – 3'	53614-53598	107bp	Trabalho atual
gCTR F	5' – CTCTTCAGCTCCGCCAAC – 3'	53508-53525		
VDA-TR-gD-123-R	5'- GCCACCGCCTCGTTCAGC- 3'	119129-119112	123bp	Trabalho atual
VDA-TR-gD-123-F	5'- GGTCGCCCTCGCCCTTCGTC- 3'	119007-119025		
gE-116 R	5' – GGAGAGACGATGGGGTGAGT – 3'	45470-45451	116bp	Trabalho atual
gE-116 F	5' – GACGGATGTGATGTTGCTGA – 3'	45355-45374		

\* sequência JF797218.1 do GenBank

Tabela 2 – Relação dos iniciadores e sondas de hibridização usados na PCR em tempo real para amplificar os alvos gB e gE do SuHV-1

Iniciadores	Sequência de nucleotídeos	Posição no Genoma*	Tamanho do Amplicon	Referência
gB-TR-Sense	5' - CTCCTGCCGCACCTGAAG- 3'	19051-19034	92bp	Trabalho atual
gB-TR-Antisense	5'- GTCTGGAAGCGGTAGAAGCC- 3'	18960-18979		
VDAgB TaqS	5'-/56-FAM/CGGAACCTCGCTGACGCACCA-3'			
VDA-Taq-gE-136-R	5'- GATGCAGGGCTCGTACAC-3'	122148-122131	136bp	Trabalho atual
VDA-Taq-gE-136-F	5'-GGACACGTTGACCTGATG-3'	122013-122031		
VDA-Taq-gE-136-P	5'-/5CY5/AGCGTGCCGGTGAAGTTCTCG-3'			

\* sequência JF797218.1 do GenBank

Tabela 3 – Relação dos iniciadores usados na PCR em tempo real para amplificar os alvos gD e gE do SuHV-1 através da tecnologia Plexor

Iniciadores	Sequência de nucleotídeos	Posição no Genoma*	Tamanho do Amplicon	Referência
VDA-Abort-gD R	5' – GACTACATGTTCACCGGAGGA - 3'	119290-119312	76bp	Trabalho atual
VDA-Abort-gD F	FAM-5-iso-dC-GGTACTGGCCCTCGTTGAACC-3'	119365-119345		
VDA-Plexor-gE R	5' – GCCACGCTGGACTGGTACTAC – 3'	122077-122097	126bp	Trabalho atual
VDA-Plexor-gE F	TexRd-5-iso-dC-GAAGCTGCACG - 3'	122202-122192		

\* sequência JF797218.1 do GenBank

### 3.6. PIPETAS

Para garantir o controle de qualidade, as micropipetas do LBM estavam calibradas e verificadas, conforme exigido pela ABNT NBR ISO/IEC 17025.

### 3.7. TERMOCICLADORES

O termociclador em tempo real Real Time 7500 (registro LBM/PL/096) (Applied Biosystems, EUA) foi utilizado durante todo o processo de verificação de desempenho. Para teste de robustez foi utilizado o

equipamento Rotorgene (registro LBM/PL/010) (Qiagen, EUA). Para o teste Interlaboratorial também foi utilizado o modelo 7500 da Applied Biosystems pertencente ao Departamento de Medicina Veterinária Preventiva da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais.

### 3.8. PROTOCOLO DE TEMPERATURA

Os protocolos de temperatura padronizados neste trabalho, seguiram as recomendações dos fabricantes dos *Master Mix* utilizados.

Quadro 1 - Protocolos de temperaturas utilizadas nos ensaios

	Pré-ciclo	Ciclos	Curva de Melting
<b>Sonda de hibridização</b>	50°C (2 minutos) 90°C (10 minutos)	45 ciclos 95°C (15 segundos) 60°C (1 minutos)*	
<b>SybrGreen</b>	50°C (2 minutos) 90°C (10 minutos)	35 ciclos 95°C (25 segundos) 58°C (25 segundos) 72°C (30 segundos) *	95°C (15 segundos) 70°C (1 minuto) Rampa de 1% com detecção de fluorescência 99.9°C (30 segundos) 60°C (15 segundos)
<b>Plexor</b>	50°C (2 minutos) 95°C (3 minutos)	40 ciclos 95°C (15 segundos) 62°C (1 minuto)*	95°C (15 segundos) 70°C (1 minuto) Rampa de 1% com detecção de fluorescência 99.9°C (30 segundos) 60°C (15 segundos)

\*detecção de fluorescência

### 3.9. CRITÉRIOS

Os parâmetros para a validação utilizados foram realizados segundo descritos no *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals 2010* (OIE, 2010).

### 3.10. PADRONIZAÇÃO

Todos os testes foram realizados segundo tentativa e erro, de acordo com ajustes nas concentrações de oligonucleotídeos e na temperatura de anelamento, visando a padronização das melhores concentrações dos reagentes da PCR.

Foram utilizados o TaqMan<sup>®</sup> *Fast Universal PCR Master Mix* (Applied Biosystem, EUA) para os oligonucleotídeos gB-TR-Sense, gB-TR-Antisense e sonda para gB; SybrGreen PCR *Master Mix* (Applied Biosystem, EUA) para os iniciadores VDA-TR-gD-123-F e VDA-TR-gD-123-R e GoTaq qPCR *Master Mix Plexor<sup>®</sup> System* (Promega, EUA) para os iniciadores VDA-Abort-gD-F e VDA-Abort-gD-R.

O volume final da reação foi padronizado em 20 µL, sendo 18 µL de mix mais 2 µL de DNA. As concentrações dos reagentes da PCR em tempo real para a Doença de

Aujeszky adequadas às nossas condições laboratoriais estão descritas a seguir: 0,375 pmol/μL de cada iniciador, 10 μL de *Master Mix 2X* e 0,8% de DMSO (Amresco®). Para completar o volume final foi adicionada água DECP estéril. Para o mix da reação com a sonda de hibridização, além dos reagentes citados, foi acrescentado 0,2 pmol/μL da sonda.

### 3.11. CONTROLES

Para garantir a segurança e confiabilidade dos resultados obtidos, algumas precauções foram tomadas de forma a evitar resultados falsos-positivos e falsos-negativos. O controle interno de amplificação foi realizado através de uma PCR em tempo real para o gene da beta-actina utilizando os iniciadores mostrados na Tabela 4. Um controle interno de amplificação é uma seqüência de DNA não-alvo presente no tubo da reação, o qual é co-amplificado simultaneamente com a

seqüência-alvo. Na PCR sem um controle interno de amplificação, uma resposta negativa (sem banda ou sinal) pode significar que não há presença da seqüência-alvo na reação, mas também pode significar que a reação foi inibida, como um resultado de mau funcionamento do termociclador, preparação incorreta da mistura da PCR, baixa atividade da polimerase e presença de substâncias inibidoras na matriz da amostra.

Foram usados ainda controles positivos, controles negativos e controles brancos. Sabe-se que a robustez de um método de PCR pode ser monitorada pelo uso de controle positivo e reagente de teste (negativo) nas reações.

Para minimizar os riscos de contaminação das amostras e das reações de PCR, o LBM possui as áreas de trabalho separadas.

Tabela 4 - Iniciadores usados como controles nas reações de PCR em tempo real

Iniciadores	Seqüência	Referência
Beta-actina F	5'- TTCAGNTTTCGAACCACTTCCC-3'	Bielansk <i>et al.</i> , (2009)
Beta-actina R	5'- TGCCTTATCAGCTNTCGATTGTAG-3'	

### 3.12. EFICIÊNCIA DA REAÇÃO

Para a avaliação da eficiência da reação foram testadas diluições do DNA das amostras contaminadas com o vírus SuHV-1 da cepa padrão Shope. Cada diluição foi testada em triplicata ( $\pm 200$  ng de DNA e  $\pm 100$  ng de DNA), tendo as concentrações estimadas em espectrofotômetro de luz ultra-violeta (Nanovue®, GE Healthcare, EUA). Foram feitas uma série de curvas-padrão (seis diluições seriadas:  $10^{3,5}$  TCID<sub>50</sub>/ 50μL,  $10^{2,5}$  TCID<sub>50</sub>/ 50μL,  $10^{1,5}$  TCID<sub>50</sub>/ 50μL,  $10^{0,5}$  TCID<sub>50</sub>/ 50μL,  $10^{-1,5}$  TCID<sub>50</sub>/ 50μL e  $10^{-2,5}$  TCID<sub>50</sub>/ 50μL) para determinação da eficiência da PCR, analisando os valores obtidos pelo R<sup>2</sup> e o *slope* (fator de inclinação da curva).

### 3.13. ESPECIFICIDADE ANALÍTICA

Para o teste de especificidade analítica foram usadas 30 amostras negativas provenientes de 30 animais diagnosticadas através das metodologias de isolamento viral e teste de neutralização (Fonseca Jr. *et al.*, 2010). Seguindo os critérios da OIE, foram realizados os testes de seletividade, exclusão e inclusão.

### 3.14. SENSIBILIDADE DIAGNÓSTICA

Para o teste de sensibilidade diagnóstica foram testadas 25 amostras positivas para o SuHV-1 (caracterizadas como genótipo II) nos métodos de isolamento viral e teste de neutralização (Fonseca Jr. *et al.*, 2010).

### 3.15. LIMITE DE DETECÇÃO (LD)

A determinação do limite de detecção (sensibilidade analítica) para os sistemas testados foi realizada a partir de amostras de cérebro suíno contaminadas com diluições na base dez, utilizando a cepa padrão Shope. A curva padrão foi construída com sete logs de diluição seriada em triplicatas, nas seguintes concentrações:  $10^{3.5}$  TCID<sub>50</sub>/ 50µL,  $10^{2.5}$  TCID<sub>50</sub>/ 50µL,  $10^{1.5}$  TCID<sub>50</sub>/ 50µL,  $10^{0.5}$  TCID<sub>50</sub>/ 50µL,  $10^{-1.5}$  TCID<sub>50</sub>/ 50µL,  $10^{-2.5}$  TCID<sub>50</sub>/ 50µL e  $10^{-3.5}$  TCID<sub>50</sub>/ 50µL. O LD foi determinado na última diluição na qual todas as amostras apresentaram resultado positivo sem falhar nenhuma replicata. Para confirmação do resultado, a diluição na qual apresentava o LD foi repetida em sete replicatas. Além disso, também foram repedidos um log abaixo e um log acima do LD em sete replicatas para confirmação dos resultados.

### 3.16. REPETITIVIDADE E REPRODUTIBILIDADE

Os testes de repetitividade ocorreram em três dias consecutivos, usando sete amostras diferentes em triplicatas: uma amostra no LD, três amostras um log abaixo do LD e três amostras ½ log abaixo do LD, nas respectivas concentrações:  $10^{0.5}$  TCID<sub>50</sub>/ 50µL,  $10^{-1.0}$  TCID<sub>50</sub>/ 50µL e  $10^{-1.5}$  TCID<sub>50</sub>/ 50µL). Para a PCR durante a repetitividade utilizou-se somente o sistema com a sonda de hibridização e o equipamento de PCR 7500 da Applied Biosystem. Prosseguiu-se com os testes de desempenho apenas com os iniciadores e a sonda de hibridização para o alvo gB, devido aos melhores resultados obtidos em comparação aos demais sistemas testados. O equipamento 7500 da Applied Biosystems foi escolhido porque apresenta a vantagem de realizar uma corrida com um maior número de reações de PCR. Além disso, nesse equipamento podem ser usados placas ou tubos, ambos utilizados no experimento.

Já para os testes de reprodutibilidade foram repetidos os mesmos procedimentos da repetitividade, porém por um segundo analista. É importante ressaltar que para os

testes de repetitividade e reprodutibilidade foram utilizados em cada dia, sete amostras diferentes de cérebro suíno contaminadas com uma nova diluição da cepa padrão, seguidos da extração das amostras e dosagem de DNA.

### 3.17. ROBUSTEZ

Foi considerado como relevante para a metodologia: erro de pipetagem, mudança de termociclador e substituição de reagente. Assim, as variáveis testadas foram:

- Erro de pipetagem: foi testada a variação de 1 µL no volume final da reação para mais e para menos.
- Equipamento: utilizou-se o equipamento Rotor gene 3000 (Qiagen, EUA) para comparação dos resultados obtidos no equipamento 7500 (Applied Biosystem, EUA).
- Reagente: as mesmas diluições usadas no teste de repetibilidade foram testadas usando o Real Q-PCR dUTP-UNG *Master Mixes* Kit (6mM MgCl<sub>2</sub>) (Ampliqon, Alemanha) para comparação com o TaqMan® Fast Universal PCR *Master Mix* (Applied Biosystem, EUA).

### 3.18. INTERLABORATORIAL

Para realização do teste interlaboratorial, foram utilizadas 30 amostras negativas e 30 amostras positivas contaminadas artificialmente. Para fazer as amostras negativas foram usados aproximadamente 25mg de tecido (cérebro de suíno) e 600 µL de TE. Para contaminar as amostras positivas foi usada aproximadamente 25mg de tecido (cérebro de suíno) e uma cepa Shope cedida pelo LDDV do LANAGRO-MG (titulação  $10^{4.5}$ TCID<sub>50</sub>/50µL). Foram realizadas duas diluições na base dez em TE para a contaminação das amostras positivas, sendo o volume final de 600 µL e então enviadas ao Laboratório de Rotina de Virologia Animal (Escola de Veterinária da UFMG). O termociclador usado no teste interlaboratorial foi o Real-time 7500 (Applied Biosystems, EUA). A extração do DNA foi realizada com o kit de extração



AccuPrep® Genomic DNA Extraction (Bioneer Corporation, EUA). A PCR utilizou o TaqMan® *Fast Universal PCR Master Mix* (Applied Biosystem, EUA) para os iniciadores gB-TR-Sense, gB-TR-Antisense e sonda. Para aumentar a variável do teste, todo o ensaio (extração e amplificação das amostras) foi repetido por um segundo analista para posterior comparação dos resultados.

#### **Protocolo de extração (AccuPrep® Genomic DNA Extraction, EUA):**

Foi adicionado em cada tubo de amostra, 20 uL de proteinase K (10 mg/μL) do kit. Vortexado e incubado a 60°C por 18 h. No dia seguinte, vortexado novamente e adicionado 200 uL do lisado em 200 uL de “*Binding Buffer*”, e vortexado. As amostras foram incubadas a 60°C por 10 minutos. Em seguida, adicionado 100uL de isopropanol por tubo, e misturado por inversão. Os lisados foram transferidos para as colunas. Centrifugados a 6000g por 1 minuto. Foi descartado o líquido dos tubos e adicionado 500 uL de “*Washing Buffer 1*” por tubo. Centrifugado a 6.000 g por 1 minuto. Novamente descartado o líquido dos tubos e adicionar 500 uL de “*Washing Buffer 2*” por tubo. Centrifugado a 6.000 g por 1 minuto, e em seguida a 18.000 g por 1 minuto. As colunas foram transferidas para um tubo de 1,5 mL e adicionado 200 uL de “*Elution Buffer*” por tubo. Após 1-5 minutos, os tubos centrifugado a 18.000 g por 1 minuto. Armazenar a - 20°C.

## **4. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Os ensaios foram realizados no LANAGRO/MG com o intuito de disponibilizar o método, ao final do trabalho, como ferramenta de diagnóstico para a DA. Com a verificação de desempenho dos diferentes sistemas disponíveis como método diagnóstico para a DA, foi possível oferecer ao LBM o método mais sensível e robusto, alcançado com a sonda de hibridização. Este fato, porém não indica que a sonda de hibridização é o melhor sistema oferecido comercialmente. As químicas testadas neste trabalho sofreram influência dos diferentes iniciadores

utilizados, o que interferiu no desempenho das reações de PCR em tempo real avaliadas. Todas as químicas testadas podem ser usadas como método de diagnóstico para o SuHV-1, porém apresentaram diferentes limites de detecção. Os resultados alcançados através da verificação de desempenho dos diferentes sistemas para a DA estão descritos a seguir.

#### **Amostras**

Em relação à quantidade de DNA das amostras, foram testadas aproximadamente 100 ng/μL e 200 ng/μL. Como não foi constatada diferença significativa de amplificação entre as quantidades de DNA testadas, optou-se pela menor quantidade de DNA a fim de obter um teste mais sensível e com menos interferentes.

#### **Extração**

Em relação aos diferentes métodos de extração *in house* oferecidos pelo LBM e testados neste experimento, a extração fenol-clorofórmio foi a que apresentou mais vantagens. A extração simples foi usada a princípio por ser mais rápida. Após a adição de tecido, essa técnica não apresentou bons resultados de amplificação e foi substituída. Com a extração simples, observou-se que o limite de detecção estava variando durante as repetições. A extração simples deixa muito resíduos protéicos junto ao DNA extraído, além de não separar o RNA do DNA, o que pode ter interferido na interpretação dos dados. Posteriormente, utilizaram-se as extrações trizol e fenol-clorofórmio, sendo que ambas mostraram-se eficientes. Essas extrações, apesar de serem mais demoradas, são melhores porque ao final da extração o DNA está separado do RNA e com menos resíduos protéicos. A escolha pela extração fenol-clorofórmio ocorreu pelo fato de esse método ser menos oneroso, em relação aos custos dos insumos, e menos trabalhoso do que a extração com trizol.

#### **Iniciadores**

Foram desenhados e testados dois pares de iniciadores e duas sondas de hibridização, com diferentes alvos (gB e gE), para a padronização de uma PCR em tempo real, conforme Tabela 2. Wejun Ma *et al.*, 2008, também utilizaram os alvos gB e gE para desenvolver uma PCR em tempo real para detecção do SuHV-1. Após os ajustes das concentrações dos oligonucleotídeos e dos protocolos das temperaturas, foram escolhidos os oligonucleotídeos desenhados para o alvo gB, que mostraram maior eficiência das reações. As reações de PCR com os oligonucleotídeos desenhados para a gE, utilizando a sonda de hibridização, mostraram-se menos sensíveis (um log da curva padrão) quando comparadas com as reações de PCR para gB, sendo este fato relevante para a escolha dos oligonucleotídeos. Para o desenho dos oligonucleotídeos, o alvo gB foi escolhido por ser uma região altamente conservada e essencial para a replicação do vírus (Pomeranz *et al.*, 2005). O gene codificante de gE não é essencial para a replicação viral e menos conservado (Kluge *et al.*, 1999), portanto, optou-se por desenhar oligonucleotídeos para este alvo para se diferenciar animais vacinados de animais positivos. Wejun Ma *et al.*, 2008, também utilizaram os alvos gB e gE para desenvolver uma PCR em tempo real para detecção e diferenciação do SuHV-1 em animais positivos e animais vacinados.

A PCR para gE era a opção inicial para o diagnóstico da DA, pois poderia ser utilizada para se diferenciar animais vacinados com o vírus atenuado deletado para essa glicoproteína daqueles infectados pela vírus selvagem. De acordo com o Plano de Erradicação da Doença de Aujeszky, aprovado pelo MAPA em 2007, a vacinação no Brasil é permitida somente em casos de focos confirmados, sendo autorizado o uso de vacinas atenuadas e inativadas, desde que não produzam anticorpos para gE. No entanto, a escolha da qPCR para gB não provoca nenhuma desvantagem para o uso da técnica no Brasil por diversos motivos. O primeiro é o fato de a vacinação só ser permitida em focos confirmados com diagnóstico laboratorial e com permissão do MAPA. O segundo é a proibição da

utilização do vírus atenuado para a vacinação de animais no Brasil, conforme o parecer 0809/2006 da Comissão Técnica Nacional de Biossegurança.

A questão da diferenciação dos animais positivos dos animais vacinados pode ser solucionada utilizando uma *Nested-PCR* desenvolvida e padronizada por Fonseca Jr. *et al.*, (2010). A *nested-PCR* é uma técnica que pode auxiliar em programas de erradicação e na certificação de granjas como método confirmatório em casos de animais únicos reativos, ou seja, indivíduos que sejam positivos no método de triagem (ELISA para glicoproteína B), porém negativos no ELISA para diferenciação de animais vacinados (Bascunãna *et al.*, 1997). A técnica utiliza dois conjuntos de iniciadores para amplificar um fragmento. Um par de iniciadores é utilizado na primeira PCR e o outro par é usado na segunda PCR, usando o produto amplificado da primeira reação. Conforme testada por Fonseca Jr. *et al.* (2010), a técnica mostrou-se mais sensível e mais rápida do que o método usual de genotipagem do SuHV-1. Porém, a *nested-PCR* é uma técnica menos vantajosa quando comparada com a PCR em tempo real, pois necessita de duas reações consecutivas de amplificação do DNA, além de ser mais suscetível a contaminação e consequentemente a resultados falso positivos.

Além dos alvos para gB e gE, também foram desenhados iniciadores para os alvos gB, gC, gD e gE para a padronização da PCR em tempo real utilizando o agente intercalante SybrGreen, conforme a Tabela 1. Todas essas glicoproteínas estão presentes no envelope viral e nas membranas das células infectadas. As glicoproteínas do envelope viral desempenham um papel importante durante o ciclo de replicação (interação célula-hospedeiro). O estudo de Bascunãna *et al.*, 1997, revelou a presença de sequências de gB, gE e gD nos tecido do gânglio trigêmeo, bulbo olfatório, amígdalas e cérebro. Este fato é relevante para obter um diagnóstico da presença do SuHV-1 no estado latente da doença.

Para a padronização da PCR utilizando o intercalante SybrGreen, foram escolhidos os iniciadores desenhados para o alvo gD, sendo esses iniciadores os que apresentaram o melhor desempenho. As sequências de iniciadores desenhados para os genes das gB, gC, e gE não apresentaram bons resultados de amplificação durante os testes, apesar das tentativas de otimização. Nos ensaios de otimização das PCRs foram testados diferentes concentrações de iniciadores, DMSO e ajustes nas temperaturas de anelamento. Porém, conforme observado na Figura 4, nas curvas de dissociação eram observados picos inespecíficos e formação de dímeros, prejudicando a interpretação dos resultados. No teste de otimização, as

diferentes concentrações de DMSO utilizadas estão ilustradas na Figura 3. É interessante observar que quanto maior a concentração de DMSO, menor a temperatura de dissociação. O DMSO é importante para inibir a formação das estruturas secundárias produzidas por interações intermoleculares ou intramoleculares. Entretanto, a medida que se adiciona o DMSO ocorre a inibição da reação. Em todas as reações de PCR padronizadas neste trabalho, foi usado o DMSO na concentração de 0,8% v/v no mix de reação para diminuir a formação de dímeros e facilitar a desnaturação de DNA devido ao alto conteúdo de GC presente no genoma do SuHV-1.

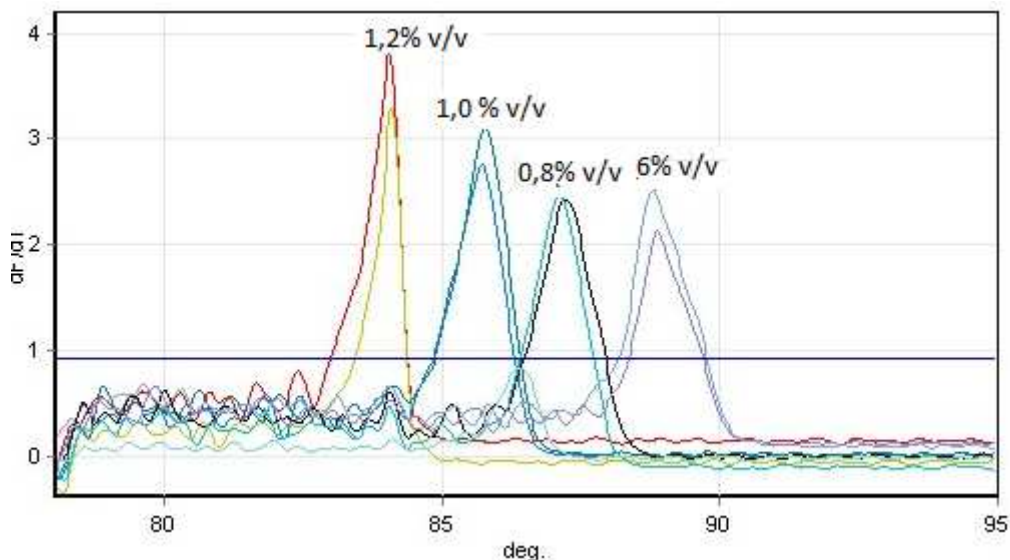


Figura 3 – Demonstração da influência de diferentes concentrações de DMSO (respectivas concentrações: 0,6% v/v, 0,8% v/v, 1,0% v/v e 1,2% v/v) na temperatura de dissociação da PCR em tempo real para detecção do SuHV-1 utilizando como química o agente intercalante. Para esse teste foram usados os iniciadores VDA-TR-gD-123-F e VDA-TR-gD-123-R.

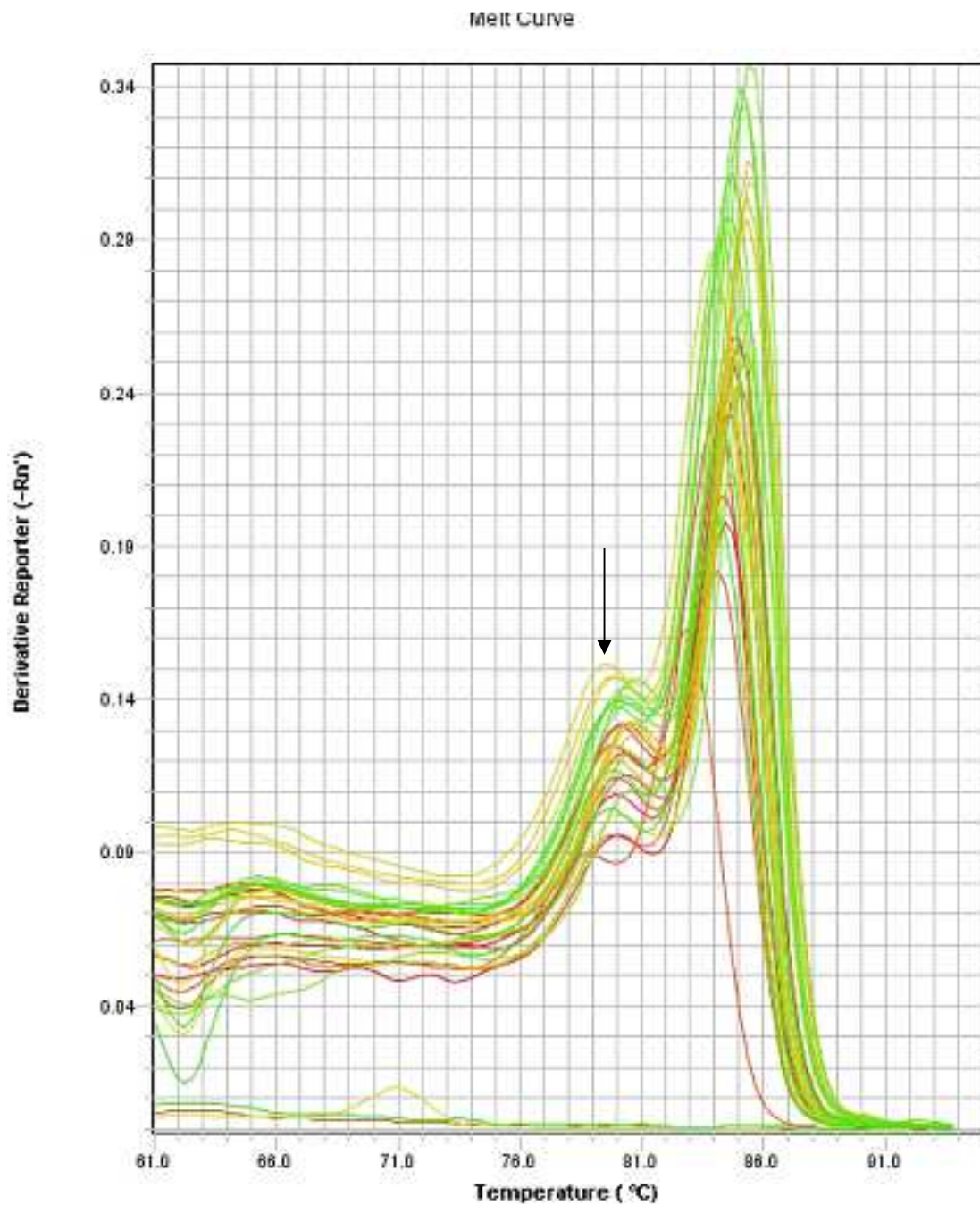


Figura 4 - Curva de dissociação da PCR em tempo real para detecção do SuHV-1 com a química do agente intercalante SybrGreen, usando os iniciadores gE-116 F e gE-116 R (a seta está apontada para o pico inespecífico).

Foram desenhados ainda iniciadores para os alvos gD e gE, conforme mostrado na Tabela 3, utilizando a tecnologia Plexor. Os iniciadores para o gene da gE geravam

reações inespecíficas durante as reações de PCR, por isso optou-se em padronizar a PCR com os iniciadores para o gene da gD.

## Controles

Sabe-se que a PCR pode ser monitorada pelo uso de controle positivo e negativo nas reações. Além disso, a presença de inibidores da PCR pode ser monitorada pelo uso de um controle interno de amplificação em cada reação. Após a introdução da matriz (cérebro suíno) para fazer as amostras contaminadas artificialmente, as reações de PCR foram monitoradas com iniciadores específicos para o gene da beta-actina (Bielansk *et al.*, 2009). Foram usados ainda: controles positivos (amostras sabidamente positivas para o SuHV-1 através de isolamento viral), controles negativos (amostras sabidamente negativas para o SuHV-1 através de isolamento viral) e branco (mix com os reagentes sem adição de DNA). Todas as amostras contaminadas artificialmente e usadas durante os testes resultaram em amplificação para o gene da Beta-actina. A reação da beta-actina funciona como controle interno de amplificação e como indicativo de que o resultado falso-negativo pode ser devido à presença de inibidores da PCR ou falha na extração. Estudos já demonstraram que alguns componentes não desejados presentes na matriz podem resultar em falsos-negativos (Schulten *et al.*, 1997). As metodologias desenvolvidas e testadas neste experimento são qualitativas, ou seja, respondem tanto pela presença quanto pela ausência do alvo em uma determinada amostra, por isso a importância do uso de controles para evitar falsos resultados e garantir que não ocorreu contaminação das amostras durante os ensaios.

## Eficiência da reação

As reações de PCR usando as sequências de iniciadores e sonda de hibridização foram as que mostraram maiores porcentagens de eficiência para esse ensaio, seguido do sistema Plexor e por último o sistema SybrGreen. O desempenho

global dos ensaios de PCR em tempo real pode ser observado na Tabela 5. Das reações de PCR utilizando iniciadores e sondas de hibridização, o melhor desempenho foi alcançado com os oligonucleotídeos desenhados para o gene codificante da gB. Já com a tecnologia Plexor, a maior eficiência foi alcançada com as sequências de iniciadores desenhados para o gene codificante da gE. E, usando o intercalante SybrGreen, a maior eficiência foi alcançada com as sequências de iniciadores desenhados para o gene codificante da gD. As reações de PCR usando o intercalante SybrGreen com as sequências de iniciadores desenhados para o alvo gC não aplicavam adequadamente, gerando um elevado número de reações inespecíficas e dímeros a despeito de ajustes na reação, portanto não foi construída uma curva padrão para eles.

Neste estudo, para avaliar a eficiência da PCR foi construída uma curva padrão com diluições do SuHV-1 titulado (cepa Shope) ( $10^{3.5}$  TCID<sub>50</sub>/50  $\mu$ L,  $10^{2.5}$  TCID<sub>50</sub>/50  $\mu$ L,  $10^{1.5}$  TCID<sub>50</sub>/50  $\mu$ L,  $10^{0.5}$  TCID<sub>50</sub>/ mL,  $10^{-0.5}$  TCID<sub>50</sub>/ mL,  $10^{-1.5}$  TCID<sub>50</sub>/ mL). A eficiência de amplificação da PCR é a taxa na qual um *amplicon* de PCR é gerado, geralmente expressa como porcentagem. Se um *amplicon* dobrar em quantidade durante a fase geométrica da amplificação da PCR, então a PCR apresentará 100% de eficiência. O slope de uma curva padrão é comumente usado para estimar a eficiência de amplificação de uma PCR em tempo real. Um slope de -3,3 reflete na eficiência de 100% da PCR. Uma baixa eficiência tende a gerar uma baixa sensibilidade. Outro parâmetro que avalia a eficiência é o cálculo da equação de regressão do R<sup>2</sup> que é um termo estatístico que indica como um bom valor é a predição de outro. Esse cálculo da eficiência da reação é obtido através da curva padrão construída com as diluições seriadas e o valor da inclinação da reta (slope).

Tabela 5 – Eficiência da PCR em tempo real para a detecção do SuHV-1 alcançadas com as diferentes químicas testadas

Química	Iniciadores	Eficiência	R <sup>2</sup>	Slope
Sonda de hibridização	gB	99%	0,99	-3,3
Sonda de hibridização	gE	96%	0,99	-3,4
Plexor	gD	88%	0,95	-3,6
Plexor	gE	86%	0,86	-3,7
SybrGreen	gB	78%	0,98	-4,0
SybrGreen	gC	-	-	-
SybrGreen	gD	97%	0,99	-3,4
SybrGreen	gE	75%	0,99	-4,08

### Especificidade Analítica

Para o teste de especificidade foram introduzidos como interferentes outros agentes infecciosos. Todas as PCR padronizadas apresentam alta especificidade (100%). A especificidade foi testada utilizando trinta amostras negativas nos métodos de isolamento viral e teste de neutralização (Fonseca Jr. *et al.*, 2010). Todos os sistemas de detecção (SybrGreen, Sonda de hibridização e Plexor) apresentaram resultados satisfatórios, ou seja, não ocorreu amplificação em nenhuma das amostras sabidamente negativas.

Para esse ensaio foi considerado a avaliação da seletividade apenas na matriz cérebro suíno porque não havia o interesse de testar outras matrizes. A introdução da matriz nas diluições da cepa padrão resultou em uma variação da sensibilidade analítica para todas as químicas testadas, devido à presença de interferentes, porém não gerou resultados falsos-negativos.

No teste de exclusão foram utilizados organismos que poderiam gerar reação cruzada e interferir na interpretação dos resultados. Então, foram introduzidos no ensaio amostras de BoHV-1, BoHV-5 (devido à semelhança genética entre os herpesvírus) e *Streptococcus suis* (devido à semelhança dos sinais clínicos da doença). Os organismos introduzidos no ensaio não interferiram na PCR. Já no teste de inclusão

durante os ensaios foram usadas amostras do genótipo I e genótipo II do SuHV-1, demonstrando que os oligonucleotídeos foram capazes de detectar diferentes genótipos dessa espécie.

### Sensibilidade diagnóstica

Para determinar a sensibilidade diagnóstica foram testadas 25 amostras positivas (caracterizadas como genótipo II do SuHV-1) nos métodos de isolamento viral e teste de neutralização (Fonseca Jr. *et al.* 2010). As amostras foram diluídas 1:10 em TE e testadas para todas as químicas avaliadas neste trabalho. A PCR desenvolvida com os iniciadores e a sonda de hibridização desenhados para o gene codificante da gB foi a que apresentou maior sensibilidade diagnóstica, ocorrendo amplificação em todas as amostras positivas, ou seja 100% de sensibilidade diagnóstica. Já a PCR usando o intercalante SybrGreen e os iniciadores desenhados para o alvo gD, apresentaram uma sensibilidade diagnóstica de 72%, uma vez que sete amostras positivas falharam no teste. Já PCR com a tecnologia Plexor usando os iniciadores desenhados para o alvo gD apresentou uma sensibilidade diagnóstica de 96%, das amostras positivas somente uma falhou. É importante ressaltar que anteriormente, as mesmas amostras foram testadas com os mesmos iniciadores para o gene codificante da gD utilizando a química EvaGreen por Fonseca Jr. *et al.* (2011), porém sem

estarem diluídas e ocorreu amplificação em todas as amostras positivas. Então, o fato das amostras estarem diluídas influenciou na sensibilidade diagnóstica das PCR em tempo real com as químicas do agente intercalante SybrGreen e Plexor. Por outro lado, a amplificação em 100% das amostras testadas com a sonda de hibridização demonstra o excelente desempenho do método desenvolvido com os oligonucleotídeos desenhados para o gene codificante da gB. Para determinar com precisão a sensibilidade diagnóstica das químicas testadas seria necessário um volume maior de amostras positivas para DA. A dificuldade em obter um grande número de amostras positivas para a DA no Brasil, impossibilitou um melhor desempenho dos ensaios.

No trabalho de Wenjun Ma *et al.*, 2008, foi possível observar o melhor desempenho da PCR em tempo real quando comparada a sensibilidade diagnóstica e especificidade com a PCR convencional.

#### **Limite de Detecção (LD)**

A sensibilidade analítica (ou LD) de cada química (a menor quantidade de DNA detectável em uma reação) foi determinada e comparada usando as mesmas diluições da cepa padrão Shope. Os primeiros testes foram realizados apenas com as diluições da cepa padrão Shope, seguido da extração fenol:clorofórmio. Foi construída uma curva padrão com sete diluições, nas respectivas concentrações:  $10^{3.5}$  TCID<sub>50</sub>/50µL,  $10^{2.5}$  TCID<sub>50</sub>/50µL,  $10^{1.5}$  TCID<sub>50</sub>/50µL,  $10^{0.5}$  TCID<sub>50</sub>/50µL,  $10^{-0.5}$  TCID<sub>50</sub>/50µL,  $10^{-1.5}$  TCID<sub>50</sub>/50µL,  $10^{-2.5}$  TCID<sub>50</sub>/50µL, e assim estabelecido o LD. As amostras testadas estavam em triplicata, conforme observado nas Figura 5 e Figura 6. Como critério avaliou-se a amplificação até o último log onde as replicatas não falharam. Os seguintes LD foram encontrados para os

diferentes sistemas de detecção, através do SuHV-1 titulado (titulação 4,5 TCID<sub>50</sub>/50µL):  $10^{-0.5}$  TCID<sub>50</sub>/50µL com o intercalante SybrGreen,  $10^{-1.5}$  TCID<sub>50</sub>/50µL com a tecnologia Plexor,  $10^{-2.5}$  TCID<sub>50</sub>/50µL com a sonda de hibridização. No teste seguinte, uma nova curva padrão foi construída, desta vez, aproximadamente 25 mg de tecido de cérebro suíno (por tubo) foi acrescentado nas diluições da cepa padrão Shope (respectivas concentrações:  $10^{3.5}$  TCID<sub>50</sub>/50µL,  $10^{2.5}$  TCID<sub>50</sub>/50µL,  $10^{1.5}$  TCID<sub>50</sub>/50µL,  $10^{0.5}$  TCID<sub>50</sub>/50µL,  $10^{-0.5}$  TCID<sub>50</sub>/50µL,  $10^{-1.5}$  TCID<sub>50</sub>/50µL,  $10^{-2.5}$  TCID<sub>50</sub>/50µL). Para todos os sistemas testados, um novo LD foi encontrado:  $10^{0.5}$  TCID<sub>50</sub>/50µL (SybrGreen),  $10^{-0.5}$  TCID<sub>50</sub>/50µL (Plexor),  $10^{-1.5}$  TCID<sub>50</sub>/50µL (Sonda). Essa diferença de um log na sensibilidade analítica pode ter ocorrido devido à presença de interferentes, ou seja, componentes não desejados presentes na matriz. Entretanto, mesmo com a presença de interferentes nas amostras testadas não foram encontrados resultados falso-negativos. A sensibilidade analítica da nested-PCR para o SuHV-1 encontrada por Fonseca Jr *et al.*, 2010, foi semelhante à alcançada neste trabalho com a PCR em tempo real usando a sonda de hibridização. Na comparação com a PCR convencional, ambas as técnicas foram 100 vezes mais sensíveis.

Para verificar o LD em cada química, o ensaio seguinte utilizou sete amostras diferentes em cada uma das três diluições da cepa padrão Shope (½ log abaixo do LD, o LD e ½ log acima do LD) e o mesmo critério de avaliação. Assim, foi confirmado o LD encontrado:  $10^{0.5}$  TCID<sub>50</sub>/50µL (SybrGreen),  $10^{-0.5}$  TCID<sub>50</sub>/50µL (Plexor),  $10^{-1.5}$  TCID<sub>50</sub>/50µL (Sonda). De acordo com a CE nº657/2007, a margem de erro de um plano de amostragem é de 5%. Portanto, foi determinado o “n” amostral de vinte e uma amostras para obter uma margem de erro de 5%, onde poderia falhar apenas uma replicata.



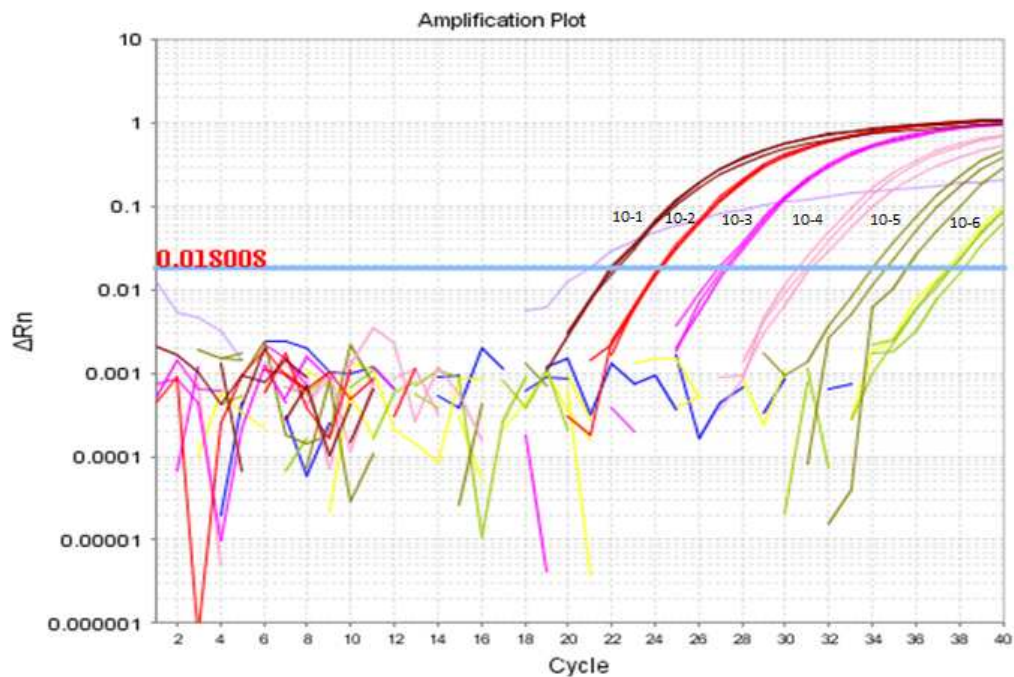


Figura 5 - Curva do LD da PCR em tempo real para detecção do SuHV-1 utilizando os oligonucleotídeos gB-TR-Sense, gB-TR-Antisense e sonda de hibridização VDAgBTAqS, nas seguintes concentrações:  $10^{3,5}$  TCID<sub>50</sub>/ 50μL,  $10^{2,5}$  TCID<sub>50</sub>/ 50μL,  $10^{1,5}$  TCID<sub>50</sub>/ 50μL,  $10^{0,5}$  TCID<sub>50</sub>/ 50μL,  $10^{-0,5}$  TCID<sub>50</sub>/ 50μL,  $10^{-1,5}$  TCID<sub>50</sub>/ 50μL.

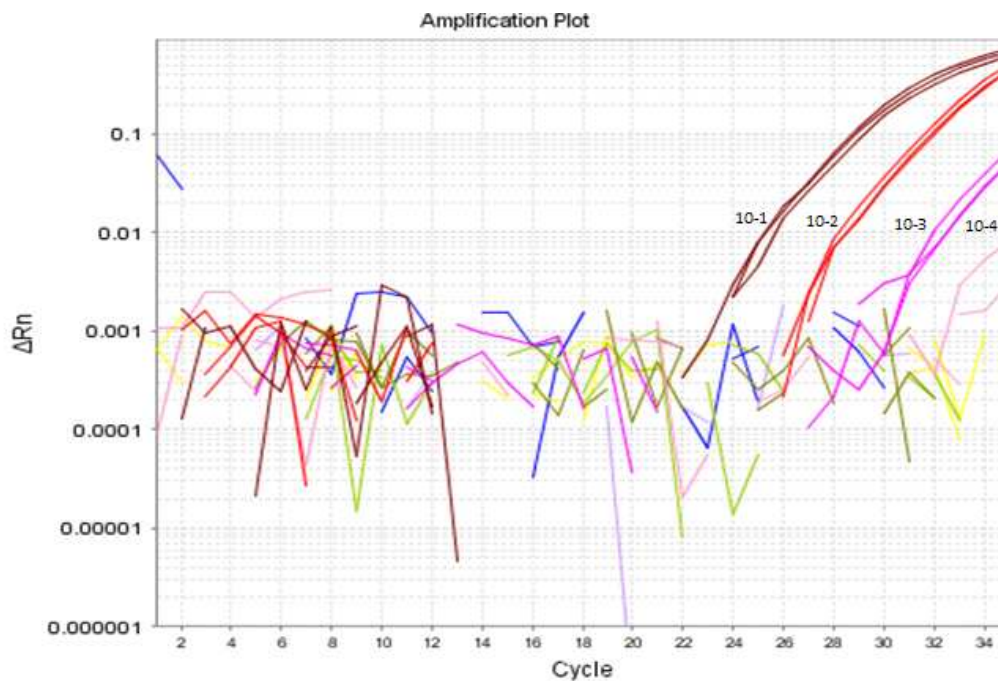


Figura 6 – Curva do LD da PCR em tempo real para detecção do SuHV-1 utilizando usando o agente intercalante SybrGreen com os iniciadores VDA-TR-gD-123 F e VDA-TR-gD-123 R, nas seguintes concentrações:  $10^{3,5}$  TCID<sub>50</sub>/ 50μL,  $10^{2,5}$  TCID<sub>50</sub>/ 50μL,  $10^{1,5}$  TCID<sub>50</sub>/ 50μL,  $10^{0,5}$  TCID<sub>50</sub>/ 50μL,  $10^{-0,5}$  TCID<sub>50</sub>/ 50μL,  $10^{-1,5}$  TCID<sub>50</sub>/ 50μL,  $10^{-2,5}$  TCID<sub>50</sub>/ 50μL.



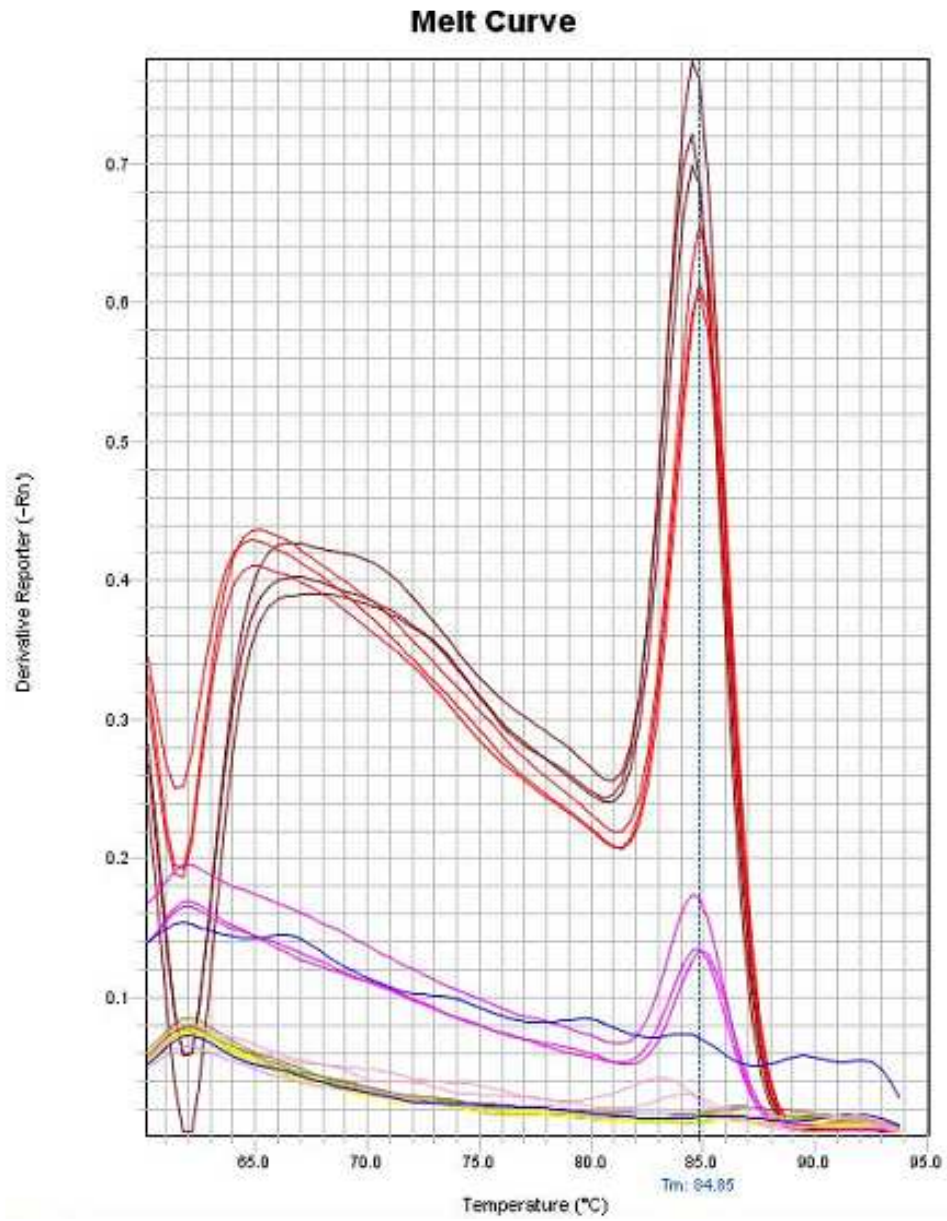


Figura 7 - Curva de dissociação da PCR em tempo real para detecção do SuHV-1 utilizando o agente intercalante SybrGreen e os iniciadores VDA-TR-gD-123 F e VDA-TR-gD-123 R.

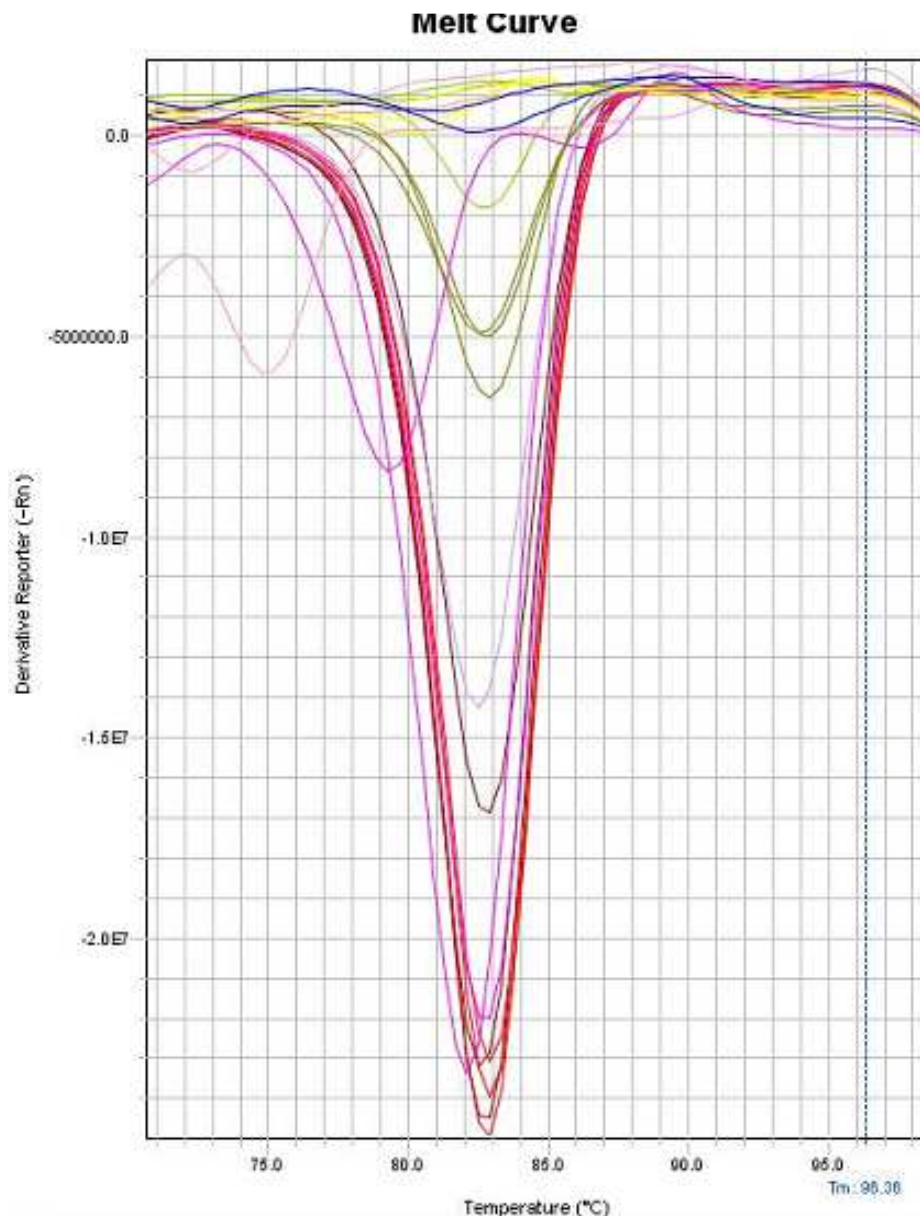


Figura 8 - Curva de dissociação da PCR em tempo real para detecção do SuHV-1 usando a tecnologia Plexor e os iniciadores VDA-Abort-gD F e VDA-Abort-gD R.

### Repetitividade e Reprodutibilidade

As etapas de repetitividade, reprodutibilidade e robustez foram realizadas somente usando os iniciadores e sonda de hibridização desenhados para o gene codificante da gB. O melhor desempenho foi alcançado utilizando esses oligonucleotídeos, o que influenciou na tomada de decisão para a escolha da

metodologia a ser disponibilizada no LBM, como ferramenta de diagnóstico para a DA.

Foram analisados os Cts obtidos, utilizando uma planilha excel. Primeiro, foi calculado a média das sete amostras em triplicatas. A dispersão dos valores em torno da média foi expressa pelo desvio padrão, também calculado. O desvio padrão em termos percentuais é chamado de coeficiente de

variação (CV), também calculado. Todos os valores calculados através dos Cts gerados nas reações de PCR usando os Tabela 6 e Tabela 7.

A análise dos dados através do CV, utilizando as sete amostras em triplicatas, nos três dias de repetitividade e nos três dias de reprodutibilidade, totalizando 42 amostras, geraram os seguintes resultados: para as amostras com 100 ng de DNA, o CV foi de 5%, já para as amostras com 200 ng de DNA, o CV foi de 8%, o que demonstra uma baixa dispersão dos dados, ou seja, o método desenvolvido mostrou-se estável e homogêneo para as duas concentrações de DNA. Foi observado que alguns valores obtidos durante a repetitividade e reprodutibilidade mostraram uma diferença maior do que 0,5 Ct, mas essa diferença não foi maior que 1,3Ct. O Ct (*threshold cycle*) é a interseção entre a curva de amplificação e a linha threshold. Ele representa a concentração de DNA da amostra na PCR. O nível de fluorescência do *threshold* é usado para quantificação absoluta, não sendo considerada como relevante para este estudo (Dennis *et al.*,2006). Como critério de confiabilidade do resultado o ponto de início de amplificação deve ser utilizado como critério de exclusão.

oligonucleotídeos desenhados para o alvo gB, podem ser visualizados na

O critério foi definido de acordo com o modelo matemático de John Tukey, sendo determinado que as amostras cujo ponto de início de amplificação ultrapassar o ciclo 36,0 devem ser repetidas ou não consideradas. Segundo Dorak (2006) para analisar as replicatas a variação entre os Ct deve ser menor que 0,5 Ct. E de acordo com Bustin e Nolan (2004), realizar a corrida em triplicata e repetir o experimento três vezes favorece a análise estatística significativa dos resultados. Na tentativa de representar a realidade do diagnóstico, o desempenho do método foi avaliado usando diferentes amostras biológicas (porém mesma matriz) e diferentes cepas Shope durante as etapas de repetitividade e reprodutibilidade, o que pode ter gerado essa variação um pouco maior do que 0,5 Ct entre as replicatas. Além disso, por ser tratar de uma metodologia de diagnóstico qualitativo essa pequena variação entre os Ct não foi considerada significativa, pois não alteraram o resultado final das amostras. Vale ressaltar que os valores de Ct são usados diretamente ou indiretamente para as análises quantitativas.

Tabela 6 - Dados estatísticos gerados a partir dos Cts das amostras com 100 ng de DNA/ $\mu$ L das reações de PCR em tempo real para diagnóstico da DA, utilizando os oligonucleotídeos gB-TR-Sense, gB-TR-Antisense e sonda de hibridização VDAgBTaqS

Amostra	Dados	Repetitividade			Reprodutibilidade			Robustez Termociclador			Robustez Master Mix		
		Dia 1	Dia 2	Dia 3	Dia 1	Dia 2	Dia 3	Dia 1	Dia 2	Dia 3	Dia 1	Dia 2	Dia 3
1	Média	30,248	28,479	30,033	29,271	28,851	28,507	29,387	28,950	31,500	31,090	30,343	33,054
	Desvio padrão	0,535	0,078	0,169	0,140	0,086	0,134	0,386	0,072	1,000	0,205	0,119	0,279
	CV	1,8%	0,3%	0,6%	0,5%	0,3%	0,5%	1,3%	0,2%	3,2%	0,7%	0,4%	0,8%
2	Média	29,831	28,237	27,441	29,341	28,776	28,174	28,347	28,603	33,447	30,469	30,295	30,278
	Desvio padrão	0,072	0,130	0,032	0,082	0,114	0,037	0,649	0,414	0,832	0,278	0,071	0,103
	CV	0,2%	0,5%	0,1%	0,3%	0,4%	0,1%	2,3%	1,4%	2,5%	0,9%	0,2%	0,3%
3	Média	29,617	28,747	28,182	30,232	28,330	28,727	27,883	28,947	32,820	30,320	30,962	30,808
	Desvio padrão	0,090	0,097	0,227	0,235	0,024	0,109	0,331	0,601	1,746	0,192	0,058	0,064
	CV	0,3%	0,3%	0,8%	0,8%	0,1%	0,4%	1,2%	2,1%	5,3%	0,6%	0,2%	0,2%
4	Média	32,664	30,981	30,529	32,107	30,806	30,454	31,043	30,973	32,597	33,037	33,041	32,792
	Desvio padrão	0,733	0,288	0,064	0,224	0,122	0,107	0,917	0,645	1,351	0,182	0,134	0,140
	CV	2,2%	0,9%	0,2%	0,7%	0,4%	0,4%	3,0%	2,1%	4,1%	0,6%	0,4%	0,4%
5	Média	32,098	31,243	30,664	31,182	31,312	30,524	30,747	30,950	33,440	32,972	33,524	33,294
	Desvio padrão	0,123	0,286	0,120	0,150	0,065	0,475	0,711	0,471	1,812	0,183	0,137	0,115
	CV	0,4%	0,9%	0,4%	0,5%	0,2%	1,6%	2,3%	1,5%	5,4%	0,6%	0,4%	0,3%
6	Média	32,104	31,645	31,298	32,932	30,308	30,056	30,887	31,850	32,240	33,677	33,683	33,855
	Desvio padrão	0,665	0,024	0,605	0,229	0,073	0,056	0,662	0,699	0,648	0,108	0,305	0,214
	CV	2,1%	0,1%	1,9%	0,7%	0,2%	0,2%	2,1%	2,2%	2,0%	0,3%	0,9%	0,6%
7	Média	33,316	31,687	31,458	35,324	33,266	31,998	32,540	31,807	34,573	34,285	33,891	33,952
	Desvio padrão	0,307	0,163	0,231	0,378	0,277	0,116	1,349	0,620	1,684	0,197	0,148	0,218
	CV	0,9%	0,5%	0,7%	1,1%	0,8%	0,4%	4,1%	1,9%	4,9%	0,6%	0,4%	0,6%

Tabela 7 - Dados estatísticos gerados a partir dos Cts das amostras com 200 ng de DNA/  $\mu\text{L}$  das reações de PCR em tempo real para diagnóstico da DA, utilizando os oligonucleotídeos gB-TR-Sense, gB-TR-Antisense e sonda de hibridização VDAgBTaqS

Amostra	Dados	Repetitividade			Reprodutibilidade		
		Dia 1	Dia 2	Dia 3	Dia 1	Dia 2	Dia 3
1	Média	29,502	28,240	29,132	28,803	26,987	29,632
	Desvio padrão	0,134	0,160	0,057	0,097	0,100	0,135
	CV	0,5%	0,6%	0,2%	0,3%	0,4%	0,5%
2	Média	29,887	27,348	27,284	28,618	27,186	29,686
	Desvio padrão	0,085	0,121	0,014	0,040	0,648	0,124
	CV	0,3%	0,4%	0,1%	0,1%	2,4%	0,4%
3	Média	28,711	28,279	27,329	28,823	26,389	30,612
	Desvio padrão	0,589	0,241	0,296	0,493	0,082	0,197
	CV	2,1%	0,9%	1,1%	1,7%	0,3%	0,6%
4	Média	31,500	30,451	29,554	30,733	28,926	32,497
	Desvio padrão	0,322	0,210	0,351	0,067	0,088	0,178
	CV	1,0%	0,7%	1,2%	0,2%	0,3%	0,5%
5	Média	31,561	30,264	29,820	30,635	30,123	31,528
	Desvio padrão	0,078	0,114	0,166	0,190	0,882	0,154
	CV	0,2%	0,4%	0,6%	0,6%	2,9%	0,5%
6	Média	32,339	30,601	30,048	30,593	29,501	32,932
	Desvio padrão	0,372	0,209	0,083	0,061	0,976	0,281
	CV	1,2%	0,7%	0,3%	0,2%	3,3%	0,9%
7	Média	33,057	31,244	31,039	32,800	31,151	35,560
	Desvio padrão	0,241	0,177	0,172	0,505	0,586	0,123
	CV	0,7%	0,6%	0,6%	1,5%	1,9%	0,3%

## Robustez

Na etapa seguinte, a robustez do método desenvolvido foi avaliada, ou seja, foram realizados testes de resistência a variações intencionais. Assim, as variações consideradas significativas para o método foram: o termociclador, o *Master Mix* e o erro de pipetagem (variação do volume da reação). Em relação ao termociclador o CV encontrado foi de 5,5%. A substituição do *Master mix* obteve um CV de 1%, o que nos mostra que a troca de equipamento e a substituição do *Master Mix* não alteraram o desempenho do método. Os resultados podem ser observados na tabela 6. Em seu estudo, Allnutt *et al.* (2010), também demonstrou a robustez de um método de diagnóstico ao testar diferentes modelos de termocicladores. Uma variação significativa para amostras biológicas deve apresentar um CV maior que 15% (Sampaio, 2010). A

variação de 1  $\mu\text{L}$  a menos demonstrou não interferir na PCR, ou seja, a variação de 1  $\mu\text{L}$  no volume não alteraram os resultados das amostras analisadas. Já a variação de 1  $\mu\text{L}$  a mais no mix de reação, sugeriu que um aumento no volume final da reação poderia gerar um aumento da sensibilidade analítica. Porém, novos testes seriam necessários para verificar se esse aumento traria benefícios ao ensaio, uma vez que com o aumento o volume final da reação, aumentaria também o custo da reação.

## Interlaboratorial

Segundo a OIE, a reprodutibilidade interlaboratorial é um importante parâmetro de precisão do ensaio. Já foi demonstrada, em um estudo interlaboratorial, a variação significativa no desempenho do termociclador no resultado do diagnóstico obtido por PCR (Saunders *et al.*, 2001).

Então, foi realizado um estudo interlaboratorial no Laboratório de Rotina de Virologia Animal que obteve 100% de concordância na sensibilidade diagnóstica (trinta amostras positivas) e 100% de concordância na especificidade (trinta amostras negativas). A alta robustez de um método é uma boa indicação de uma alta reprodutibilidade interlaboratorial.

### Diagnóstico da DA

O diagnóstico da DA tem como referência o isolamento viral (OIE, 2009). A desvantagem dessa técnica é a necessidade do cultivo de células de linhagem contínua e o fato de precisar do vírus ainda ativo. Já os testes imunológicos, estão sujeitos a resultados falso-negativos quando os animais ainda estão na fase aguda da infecção ou quando ocorre queda do título de anticorpos na infecção latente (McCaw *et al.*, 1997). As técnicas sorológicas apresentam a desvantagem de depender da soroconversão do animal (Kinke *et al.*, 1997). A PCR em tempo real é uma importante ferramenta que pode ser usada como diagnóstico da DA. A detecção do vírus, no estado latente ou replicativo, pela PCR, é uma ferramenta importante no controle da doença (Yoon *et al.*, 2006). Devido à realização das etapas de amplificação dos ácidos nucleicos e detecção do produto amplificado no interior de um único tubo durante a PCR em tempo real traz inúmeras vantagens como ferramenta de pesquisa e diagnóstico. Dentre elas, podemos citar: redução do risco de contaminação cruzada, curto tempo necessário para a realização da técnica, permite rápidos resultados, além de apresentar execução simples associada à excelente sensibilidade e especificidade.

### 5. CONCLUSÃO

1. A PCR em tempo real desenvolvida e validada neste estudo, com os iniciadores e sonda para o gene codificante da gB, é uma técnica que pode ser usada como ferramenta para auxiliar no diagnóstico da DA no Brasil.

2. O método desenvolvido e validado demonstrou ser sensível e robusto o que é importante para um método de diagnóstico. Apesar das químicas SybrGreen e Plexor apresentarem um menor custo por reação, para este experimento, as sensibilidades analítica e diagnóstica foram inferiores comparadas à sonda de hibridização.
3. Apesar da maior sensibilidade encontrada neste trabalho com a utilização da sonda de hibridização, os demais sistemas testados também podem ser usados como metodologia de diagnóstico para a DA.

### 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. NBR 14501 - Glossário de termos para uso no laboratório clínico e no diagnóstico *in vitro*. 2001. Disponível em: <<http://xa.yimg.com/kq/groups/15700523/813857501/name/NBR+14501+Glossario+de+Terminos+para+uso+no+Laboratorio+Clinico.pdf>>
- ALLEPUZ, A.; SAEZ M.; ALBA A.; NAPP S.; CASAL J. Exploratory spatial analysis of Aujeszky's disease during four phases of eradication programme in Catalonia, Spain (2003-2007). **Preventive Veterinary Medicine**, v. 86, p.164-175, 2008.
- ALMEIDA FILHO, N.; ROUQUAYROL, M. Z. Introdução à Epidemiologia Moderna. Cap. VI: Metodologia da Pesquisa Epidemiológica, p. 84-96, 2. Ed.: COOPMED/APCE/ABRASCO, 1992.
- ANDERSON, H.; LEXMON, A.; ROBERTSSON, J.; LUNDEHEIM, N.; WIERUP, M. Agricultural policy and social returns to eradication programs: the case of Aujeszky's disease in Sweden. **Preventive Veterinary Medicine**. V. 29, Issue 4, p. 311-328, 1997.
- ANDERSON, L.A.; BLACK, N.; HAGERTY, T. KLUGE, J.P. *et al.* Pseudorabies (Aujeszky's Disease) and its eradication. United States Department of Agriculture.

**Animal and Plant health Inpection Service Technical Bulletin**, nº1923, 2008.

BASCUÑANA, C. R., BJÖRNEROT, L., BALLAGI-PORDÁNY, A., ROBERTSSON, J. A., BÉLAK, S. Detection of pseudorabies virus genomic sequences in apparently uninfected "single reactor" pigs. **Veterinary Microbiology**. v. 55, pp 37- 47, 1997.

BAUER, A.G. Primeira constatação do mal de Aujeszky no Rio Grande do Sul. **Arquivo do Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor**, Porto Alegre, v. 1, p. 15-16, 1955.

BERSANO, J.G. Focos da Doença de Aujeszky no Estado de Sao Paulo no Período de 1982-1986. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 53, p.65-70, 1986.

BRAGA, A.C; ROSA, J.C.; ROEHE, P.M.; MACHADO, C.H; REIS, G. *et al.* Diagnóstico da doença de Aujeszky em suínos no Estado do Rio Grande do Sul. **Veterinária em Foco**. v.2. n.2., 2005.

BIELANSKY, A.; AGIRE, J.; LALONDE, A., NADIN-DAVIS, S. Transmission of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) via in vitro-fertilized embryos to recipients, but not to their offspring. **Theriogenology**, v.71, nº3, pp.499-508, 2009.

BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Decreto nº 24.548, de 3 de Julho de 1934. **Diário Oficial da República dos Estados Unidos do Brasil**, Rio de Janeiro, RJ.

BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa DIPROD 001/85. Disponível em: <[http://www.agricultura.gov.br/das/dda/pdf/legislacao\\_pnss\\_1.pdf](http://www.agricultura.gov.br/das/dda/pdf/legislacao_pnss_1.pdf)>

BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa Nº 19, DE 15 de fevereiro de 2002. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, nº 41, Seção 1, 2002.

BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 8 de 3 de abril de 2007. **Diário Oficial da União, Brasília**, DF, nº 68, Seção 1, 2007.

BRENTANO, L. Doença de Aujeszky dos suínos: Etiologia-diagnóstico-Patogenia-Controle. Periódico Suinocultura Dinâmica. EMBRAPA-CNPSA, Ano I nº 5, out/1992.

CACCI-ZANELLA, J.R.; AMARAL, A.L.; VENTURA, L.V.; MORES, N.B. Erradicação da doença de Aujeszky em Santa Catarina: importância da condição sanitária das leitoas de reposição. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.38, p.749-754, 2008.

CARINI, A., MACIEL, J. La Pseudorage ou paralysie bulbaire infectieuse au Bresil. **Bulletin de La Societe de Pathologie Exotique et de Ses Finales**, v. 5, p. 576-578, 1912.

CENTER FOR FOOD SECURITY & PUBLIC HEALTH. Aujeszky's Disease. **Institute for International Cooperation in Animal Biologics**, Iowa State University, College of Veterinary Medicine, 2006.

Commission Decision 93/24/EEC of 11 December 1992 concerning additional guarantees relating to Aujeszky's disease for pigs destined to Member States or regions free of the disease. **Official Journal L 016**, 0018-0021, 25/01/1993.

Commission Decision 2008/185/CE of 4 de October 2011 concerning additional guarantees relating to Aujeszky's disease for pigs destined to Member States or regions free of the disease. **Official Journal L 260**, 0019-0020, 05/10/2011.

CUNHA, E.M.S.; PEIXOTO, Z.M.P.; KOTAIT, I.; BERSANO, J.G.; ISHIZUKA, M.M.; BACCARO, M.R. Eficácia de vacina inativada contra a doença de Aujeszky: infecção experimental de suínos. **Bras. J.Vet. Anim. Sci**, São Paulo, v.35. n.4. pp. 188-194, 1998.

CUNHA, E.M.S.; NASSAR, A.F.C.; LARA, M.C.C.S.H.; BERSANO, J.G. *et al.*

Antibodies against pseudorabies virus in feral swine in southeast Brazil. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.58, nº4, p.462-466, 2006.

DE LEEUW, P. W.; VAN OIRSCHOT, J. T. Vaccines against Aujeszky's disease: evaluation of their efficacy under standardized laboratory conditions. **Vet. Q.**, v.7, pp.191-197, 1985.

DORAK, T. Real-time PCR. Newcastle University, UK, Taylor & Francis Group, p. 362, 2006.

DURHAM, P.J.; SILLARS, H.M.; HOBBS, I.F. Comparison of the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and serum neutralization test for the serodiagnosis of Aujeszky's disease. **N. Z. Vet. J.**, v. 33, nº 8, pp.132-135, 1985.

EURACHEM WORKING GROUP. **Eurachem Guide: The Fitness for purpose of Analytical Methods.** 1998. Disponível em: <<http://www.eurachem.org/guides/pdf/vol1id.pdf>>

EUROPA. 64/432/CEE de 26 de junho de 1964. Jornal Oficial nº 121 de 29/07/1964. Disponível em: <<http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=CELEX:31964L0432:PT:HTML>>

EUROPA. 93/24/CEE de 11 de dezembro de 1992. Jornal Oficial nº L 016 de 25/01/1993 p. 0018 – 0021 Disponível em: <<http://eurlex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=CELEX:31993D0024:PT:HTML>>

EUROPA. 657/2007/CE de 14 de junho de 2007. Jornal Oficial da União Europeia nº L155 de 15/06/2007. Disponível em: <<http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2007:155:0007:0009:PT:PDF>>

FRANCKMAN, S.; EKENBERG, S.; HOFFMANN, K.; KRENKE, B. *et al.* Plexor™ Technology: A new chemistry for real-time PCR. **Promega Notes**, nº 90, 2005.

FEINSTEIN, A.R. Clinical biostatistics. Saint Louis: The C. V. Mosby Company, p.468, 1977.

FLORES, E.F.; OSORIO, F.A.; ZANELLA, E.L. *et al.* Efficacy of a deletion mutant bovineherpesvirus-1 (BHV-1) vaccine that allows serologic differentiation of vaccinated from naturally infected animals. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 5, p. 534-540, 1993.

FONSECA Jr., A. A.; CAMARGOS, M. F.; D'AMBROS, R. M. F. *et al.* Diagnóstico e genotipagem do vírus da pseudorraiva por nested-PCR e análise de restrição enzimática. **Ciência Rural**, vol. 40, no. 4, pp. 921–927, 2010.

FONSECA Jr., A. A.; CAMARGOS, M. F.; OLIVEIRA, A. M. *et al.* Molecular epidemiology of Brazilian pseudorabies viral isolates. **Veterinary Microbiology**, vol. 141, no. 3-4, pp. 238–245, 2010.

GOLDSBY, R.A.; KINDT, T.J.; OSBORNE, B.A. Kuby Immunology. W.H. Freeman and Company, 4th Edition, p. 162, 2000.

GROFF, F. H. S.; MERLO, M. A.; STOLL, P. A., STEPAN, A. L.; WEIBLEN, R., FLORES, E. F. Epidemiologia e controle dos focos da doença de Aujeszky no Rio Grande do Sul, em 2003. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 25, n. 1, pp. 25-30, 2005.

HENNEKENS, C.H., BURING, J.E. Epidemiology in medicine. Boston/Toronto: Little, Brown and Company, p. 383, 1987.

HIPÓLITO, O.; SILVA, J.M.L.; BATISTA JUNIOR, J.A. *et al.* A doença de Aujeszky em suínos no estado de Minas Gerais. **Arq. Esc. Sup.Vet. UFMG**, v.13. pp.61-67, 1960.

HOOPER, K. Na introduction to the Plexor™ System. Promega Notes, 2005.

INMETRO, Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial. DOQ-CGCRE-008: Orientação sobre validação de métodos de ensaios químicos. Revisão 03. 20p. 2010. Disponível em:



<[http://www.inmetro.gov.br/Sidoq/Arquivos/CGCRE/DOQ/DOQ-CGCRE-8\\_02.pdf](http://www.inmetro.gov.br/Sidoq/Arquivos/CGCRE/DOQ/DOQ-CGCRE-8_02.pdf) >

ISO/IEC 17025:1999(E). General requirements for the competence of testing and calibration laboratories. Genebra, first edition 1999.

KINKER, D.R.; SWENSON, S.L.; WU, L.L. *et al.* Evaluation of serological tests for the detection of pseudorabies gE antibodies during early infection. **Vet. Microbiol.**, v.55, p.99-106, 1997.

KIMMAN, T.G. Immunological protection against pseudorabies virus. In: OIE SYMPOSIUM, 1994. Bangkok, Thailand. **Proceedings...** Bangkok, p. 11-22, 1994.

KIT, S.; AWAYA, Y.; OTSUKA, H.; KIT, M. Blocking ELISA to distinguish pseudorabies virus-infected pigs from those vaccinated with a glycoprotein gIII deletion mutant. **J. Vet. Diag.** v. 2, pp.14-23, 1990.

KLUGE, J.P.; BERAN, G.W.; HILL, H.T.; PLATT, K.B. Pseudorabies (Aujeszky's Disease), In Straw, B.E., D'Aillaire, S., Mengeling, W.L., Taylor, D.J. (eds.), **Disease of swine**, 8th ed. Iowa State University Press, Ames, Iowa. p.233-246., 1999.

KLUPP, B. G.; HENGARTNER, C. J.; METTENLEITER, T. C.; ENQUIST, L. W. Complete, annotated sequence of the pseudorabies virus genome. **Journal of Virology**, v. 78, n 1, pp 424-440, 2004.

KÖHLER, M., KÖHLER, W. Zentralblatt für bakteriologi – 100 years ago Alçádar Aujeszky detects a “new” disease – or: it was the cow and not the sow. **Journal of Medical Microbiology**, v. 292, 423-427, 2003.

KOTAIT, I., CUNHA, E.M.S., QUEIROZ, LU., et d. Doença de Aujeszky no Estado de São Paulo: inquérito sorológico em plantéis de reprodutores suínos realizado no período de 1982-1986. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 53, p. 71-73, 1986.

KOTAIT, I.; PEIXOTO, Z.M.P; CUNHA, E.M.S.; QUEIROZ, L.H.; SOUZA, M.C.A.M.; SILVA, A.D'Á; SORTICA, A.V; BRAGA, A.C; SPILKI, F.R; FRANCO, A.C *et.al.* Caracterização antigênica e molecular de oito amostras do vírus da doença de Aujeszky isoladas no estado do Rio Grande do Sul em 2003. **Pesq. Vet. Bras.**, vol.25, n.1, Rio de Janeiro, 2005.

KRENKE, B.E. Development of a novel, fluorescent, two primers approach to quantitative PCR. **Profiles in DNA**, Promega Corporation, v.8, nº.1, pp.3-5, 2005.

MAPA (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento). Manual de Legislação: Programas Nacionais de Saúde Animal do Brasil, 2009. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/animal/sanidad-e-animal>>

MAES, R. K; SUSSMAN, M. D; VILNIS, A; THACKER, B. J. Recent developments in latency and recombination of Aujeszky's disease (pseudorabies) virus. **Veterinary Microbiology**, v.55, pp. 13-27, 1997.

METTENLEITER, T. C. Aujeszky's disease (pseudorabies) virus: the virus and molecular pathogenesis – state of the art, june 1999. **Veterinary Research**, v. 31, pp. 99-115, 2000.

METTENLEITER, T. C. Herpesvirus assembly and egress. **Journal of virology**, v. 76, n. 4, p. 1537-1547, 2002.

MORÉS, N.; AMARAL, A.L.; VENTURA, L.; ZANELLA, J.R.C.; SILVA, V.S.. Programa de erradicação da doença de Aujeszky no Estado de Santa Catarina. Concórdia: Embrapa Suínos e Aves, Circular técnica nº 44, 2005.

MORES, N.; AMARAL, A.L.; VENTURA, L.; ZANELLA, J.R.C. *et al.* Disseminação do vírus da doença de Aujeszky, envolvendo o comércio de suínos de reposição. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v. 59, nº 6, p.1387-1387, 2007.

MULLER, T.; KLUPP, B. G.; FREULING, C. *et al.* Characterization of pseudorabies virus of wild boar origin from Europe. **Epidemiology and Infection**, vol. 138, nº. 11, pp. 1590–1600, 2010.

NAUWYNCK, H J.; PENSAERT, M.B. Programmes for the eradication of Aujeszky's disease virus (Pseudorabies Virus) in the member states of the European Union. In: **OIE SYMPOSIUM**,. Bangkok, Thailand. Proceedings... Bangkok, 1994, p. 55-66, 1994.

NAUWYNCK, H.; GLORIEUX, S.; FAVOREEL, H.; PENSAERT, M. Cell biological and molecular characteristics of pseudorabies virus infections in cell cultures and in pigs with emphasis on the respiratory tract. **Vet Res**, v.38, pp.229–241, 2007.

NUNES, J.O.; ROSA, A.L. Circovirose suína (PCV2) e experimentação de vacina autógena em granjas do Brasil. Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor. Universidade Luterana do Brasil, 2005.

OFFICE INTERNATIONAL DES EPIZOOTIES (OIE), World Organization for Animal Health. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals, Paris, France, 2008.

OFFICE INTERNATIONAL DES EPIZOOTIES (OIE). World Organization for Animal Health. Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals. 5th ed. Paris: OIE, 2009. Disponível em: [http://www.oie.int/eng/normes/mmanual/A\\_summry.htm](http://www.oie.int/eng/normes/mmanual/A_summry.htm)>

OFFICE INTERNATIONAL DES EPIZOOTIES (OIE). Aujeszky's Disease. OIE Terrestrial Animal Health Code. Chapter 8.2, 2010. Disponível em: <[http://web.oie.int/eng/normes/mcode/en\\_chapitre\\_1.8.2.pdf](http://web.oie.int/eng/normes/mcode/en_chapitre_1.8.2.pdf)>

OFFICE INTERNATIONAL DES EPIZOOTIES (OIE): World organization for animal health. Animal Disease Data: diseases notifiable to the OIE. Disponível em: <<http://www.oie.int>>

OIRSCHOT, J.T. Intranasal vaccination of pigs against Aujeszky's disease: protective immunity at 2 weeks, 2 months and 4 months after vaccination in pigs with maternal antibodies. **Veterinary Microbiology**, v. 27, nº 2, pp.103-113, 1991.

OSÓRIO, F. A. Pseudorabies /Aujeszky's disease Aujeszky's: Vaccine and diagnostic support to the eradication efforts. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE VETERINÁRIOS ESPECIALISTAS EM SUÍNOS, 10, 2001, Porto Alegre. **Anais**...Porto Alegre, 2001.

PEJSAK, Z.K.; TRUSZCZYNSKI, J. Aujeszky's disease (pseudorabies). In **Diseases of Swine**. Ed. Blackwell publishing. (9th edition), 2006.

PEREZ, M.A.F. **Validação de métodos analíticos: Como Fazer?Por que ela é importante?** CETEA. ISSN2175-5000. v.22, nº3, 2010.

PIATTI, R. M.; IKUNO, A. A.; CUNHA, E. S.; D'AMBROS, R.; GREGORI, F.; SOARES, R. M.; CORTEZ, A., RICHTZENHAIN, L. J. Characterization of aujeszky's disease virus isolates from south and southeast Brazil by RFLP analysis. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 32, pp. 144-146, 2001.

POMERANZ, L.E.; REYNOLDS, A.E.; HENGARTNER, C.J. Molecular biology of pseudorabies virus: impact on neurovirology and veterinary medicine. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, v.69, p.462-500, 2005.

ROWE, C.A.; ROMERO, C.H. Isolamento e identificação do vírus da doença de Aujeszky de surtos em suínos no Estado de Santa Catarina. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.6, p.99-103, 1986.

SAMBROOK J.; FRITSCH, E.F.MANIATIS, T. Molecular cloning: a laboratory manual. 2.ed. **New York: Cold Spring Harbor Laboratory**. 545p. 1989.

SCHULTEN, S.M.; BENSCHOP, E.; NAGELKERKE, N.J.D.; MOOIJMAN, K.A.

Validation of microbiological methods. Enumeration of *Clostridium perfringens* according to ISO 7937, 2ª edição, Research for Man and Environment, 1997.

SILVA, R.A. DOBEREINER, J. Nota sobre a Doença de Aujeszky no município de Sapucaia. **Arquivos do Instituto Biológico Animal**, v. 3, p. 83-90, 1960.

SILVA, R.A., GIOVINI, N. Novos focos da doença de Aujeszky no Estado de Minas Gerais. I. Estudo do foco no município de Almenara. **Arquivo do Instituto Biológico Animal**, v. 4, p. 99-104, 1961.

SILVA, A. D.; SORTICA, V. A.; BRAGA, A., C.; SPILKI, F., R.; FRANCO, A C., ESTEVES, P. A., *et al.* Caracterização antigênica e molecular de oito amostras do vírus da doença de Aujeszky isoladas no estado do Rio Grande do Sul em 20031. **Pesquisa veterinária Brasileira**, v. 25, n 1, p. 21-24, 2005.

STEGEMAN, J.A.; HUNNEMAN, W.A.; KIMMAN, T.G., *et al.* Attempts to reduce the spread of Aujeszky's disease (Pseudorabies) virus by intensive vaccination in area with high pig density. In: **INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON THE ERADICATION OF PSEUDORABIES VIRUS**. St.Paul, Minesotta. Proceedings... St Paul, 1992, p. 175-179, 1992.

SOUZA, C.M.; SOBESTIANSKY, J.; MATOS, M.P.C.; CAIADO, K.L.. Prevalência da infecção pelo vírus da Doença de Aujeszky em matrizes de sistemas de produção que abastecem o mercado consumidor de Goiânia. **Ciência Animal Brasileira**, v. 3, p.53-56, 2002.

SPIRIDON, K.K; NAUWYNCK, H.J.; PENSAERT, M.B. Dissemination of wild-type and gC, gE and gI deleted mutants of Aujeszky's disease virus in the maxillary nerve and trigeminal ganglion of pigs after intranasal inoculation. **Journal of General Virology**, v.76, nº 8, pp.2063-2066, 1995.

THAWLEY, D.G.; GUSTAFSON, D.P.; ORNISTON, R.R. Pseudorabies (Aujeszky's Disease). *Pork Industry Handbook*. v.6, 1991.

U.S. FDA - Guidance for Industry, Bioanalytical Method Validation, 1990.

U.S. FDA - Guidance for Industry (draft) Analytical Procedures and Methods Validation: Chemistry, Manufacturing, and Controls and Documentation, 2000.

VAN OIRSCHOT, J .T.;RZIHA, H.J.; POL, J.M, VAN ZAANE, D. Differentiation of serum antibodies from pigs vaccinated or infected with Aujeszky's disease virus by a competitive enzyme immunoassay. **J. Gen Virol.**, v. 67, pp.1179–1182, 1986.

VAN OIRSCHOT, J.T., GIELKENS, A.LJ., MOORMANN, R.J.H., *et al.* Marker vaccines, virus proteinspecific, antibody assays and the control of Aujeszky's disease. **Veterinary Microbiology**, v. 23, p. 85-101,1990.

VANNIER, P., HUTET, E., BOURGEUIL, E., *et al.* Level of virulent virus excreted by infected pigs previously vaccinated with different glycoprotein-deleted Aujeszky's disease vaccine. **Veterinary Microbiology**, v. 29, p. 213-223, 1991.

VIDOR T. Doença de Aujeszky etiopatogenia e controle. **Hora Veterinária**, v.8, n. 43, p.47 -52, 1988.

YOON, H.A.; EO, S.K.; ALEYAS, A.G. *et al.* Investigation of pseudorabies virus latency in nervous tissues of seropositive pigs exposed to field strain. **J. Vet. Med. Sci.**, v.68, p.143-148, 2006.

WHO – World Health Organization. A WHO guide to good manufacturing practice (GMP) requirements. Part 2: Validation. 1997. Disponível em: <<http://www.who.int/vaccines-documents/DocsPDF/www9666.pdf>>

WISE LA, P. Jr.; SPIEGELMAN, D *et al.* Influence of body size and body fat

distribution on risk of uterine leiomyomata in U.S. black women. **Epidemiology**, v.16, nº 3, pp. 346-54, 2005.

WITTMANN, G. Herpesvirus diseases of cattle, horses, and pigs. Boston: Kluwer Academic,. p. 345, 1989.

WORLD ANIMAL HEALTH INFORMATION DATABASE (WAHID) INTERFACE. Animal Health Information. Disponível em: <<http://web.oie.int/wahis/public.php?page=home>>

ZANELLA, J.R.C.; FLORES, E.F. Vaccines with antigenic markers against bovine herpesvirus Type-1 and Pseudorabies virus. **Cienc. Rural**, vol.25, n.2, Santa Maria, 1995.

ZANELLA, J. R. C., MORÉS, N. Estimativa de impacto econômico anual da doença de Aujeszky para a suinocultura do estado de Santa Catarina. **Embrapa Suínos e Aves. Comunicado Técnico**, nº 294, 2001.

ZANELLA, J.R.C.; MORÉS, N.; GIROTTO, A.F. Estimativa de impacto econômico anual da doença de Aujeszky para a suinocultura do Estado de Santa Catarina. Concórdia: Embrapa Suínos e Aves, 2002. 4p. (Comunicado Técnico, 294).

ZANELLA C.J., AMARAL A. L., VENTURA L. V., MORÉS N., BORTULUZZI H. Erradicação da doença de Aujeszky em Santa Catarina: importância da condição sanitária das leitoas de reposição. **Ciência Rural**, v. 38, nº 3, p. 1-8, 2008.