



**SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOLOGIA
CURSO DE GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**



DANIEL DE PAULA PACHECO

Determinação da curva de crescimento de Metapneumovírus aviário subtipo A em cultura de células primárias de fibroblasto de embrião de galinha

**UBERLÂNDIA-MG
2021**

DANIEL DE PAULA PACHECO

Determinação da curva de crescimento de Metapneumovírus aviário subtipo A em cultura de células primárias de fibroblasto de embrião de galinha

Trabalho de Conclusão do Curso de Graduação em Ciências Biológicas, apresentado à coordenação do Instituto de Biologia da Universidade Federal de Uberlândia, como requisito para obtenção do título de Licenciado em Ciências Biológicas.

Orientador: Prof. D.r Jonny Yokosawa

**UBERLÂNDIA-MG
2021**

DANIEL DE PAULA PACHECO

Determinação da curva de crescimento de Metapneumovírus aviário subtipo A em cultura de células primárias de fibroblasto de embrião de galinha

Trabalho de Conclusão de Curso aprovado para obtenção do título de Licenciado em Ciências Biológicas pela Universidade Federal de Uberlândia.

Uberlândia-MG, 19 de maio de 2021.

Banca avaliadora formada por:

Prof. D.r Jonny Yokosawa – ICBIM/UFU

Profa. Dra. Lizandra Ferreira de Almeida e Borges – ICBIM/UFU

Ms. Mayara Garcia Polli – ICBIM/UFU

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pela vida e por me proporcionar saúde, força, disposição para perseverar e conquistar a realização de mais este sonho.

Agradeço a minha família que apesar das minhas ausências e dos vários momentos difíceis que enfrentamos, sempre me incentivou a continuar nesta caminhada. Obrigado por toda compreensão, paciência, apoio e amor incondicional. Sem vocês eu não teria chegado até aqui.

Registro a minha admiração e agradecimento ao meu orientador prof. D.r Jonny Yokosawa. Sou imensamente grato pela oportunidade, confiança, aprendizado, amizade e tempo a mim dedicado.

Agradeço aos membros da banca avaliadora, profa. Dra. Lizandra Ferreira de Almeida e Borges e a Ms. Mayara Garcia Polli por aceitarem o convite e agregar ainda mais valor a este trabalho.

Agradeço a empresa Laudo Laboratório Avícola Uberlândia Ltda. na pessoa do Sr. Márcio Danilo Botrel Coutinho por custear e oportunizar a realização dos experimentos em suas instalações colaborando para a realização deste trabalho.

Agradeço aos professores e demais colaboradores da Universidade Federal de Uberlândia pela seriedade e dedicação ao ensino.

Agradeço aos meus amigos da turma 13 de Biologia e aos que também foram agregados durante o decorrer do curso. Nesta turma construímos vínculos de companheirismo e amizade os quais faço questão de preservar.

*“Consagre ao Senhor tudo
o que você faz, e seus planos
serão bem sucedidos”.*
(Pv 16,3)

RESUMO

A produção comercial de frangos pode ser acometida por diversas enfermidades, tais como: Coccidiose aviária, Aspergilose aviária, Clostridiose aviária, Colibacilose aviária, Salmonelose aviária, Micoplasmose aviária, Anemia infecciosa das galinhas, Bronquite infecciosa das galinhas, Doença de Marek, Doença de Gumboro, Encefalomielite aviária, Influenza aviária e outras. Neste cenário, o Metapneumovírus aviário (aMPV) tem adquirido papel de destaque entre os patógenos respiratórios, desencadeando severos problemas sanitários, principalmente por estar associado a infecções secundárias, provocando perdas econômicas significativas. O aMPV possui um genoma de RNA de fita simples envelopado com polaridade negativa, sendo o agente primário causador de rinotraqueíte em perus (do inglês *Turkey rhinotracheitis* - TRT), está também constantemente associado à síndrome da cabeça inchada em galinhas (do inglês *Swollen Head Syndrome* - SHS), acometendo frangos de corte, poedeiras e reprodutoras. Com isso, constitui-se uma fonte significativa de perdas econômicas para o processo de criação comercial destes animais. Sendo assim, o objetivo principal do presente trabalho foi avaliar três diferentes quantidades inoculadas da cepa vacinal do aMPV em células primárias de embrião de galinha, com a finalidade de se determinar qual a quantidade inoculada será responsável pelo maior rendimento de vírus no cultivo. E também determinar a curva de crescimento em cada condição, para verificar com quanto tempo de inoculo em cada condição o título viral é maior, com isso, estabelecer o momento ideal para a colheita do vírus, otimizando o rendimento do cultivo da cepa vacinal na formulação da vacina.

Palavras-chave: Metapneumovírus aviário, Rinotraqueíte do peru (TRT), Síndrome da cabeça inchada em galinhas (SHS), vacina, curva de crescimento do título viral.

ABSTRACT

The commercial production of chickens can be affected by several diseases, such as: Avian Coccidiosis, Avian Aspergillosis, Avian Clostridiosis, Avian Colibacillosis, Avian Salmonellosis, Avian Mycoplasmosis, Infectious Chicken Anemia, Infectious Bronchitis of Chickens, Marek's Disease, Gumboro Disease, Avian Encephalomyelitis, Avian Influenza and others. In this scenario, the Avian Metapneumovirus (aMPV) has acquired a prominent role among respiratory pathogens, triggering severe health problems, mainly because it is associated with secondary infections, causing significant economic losses. The aMPV has a negative sense, single-stranded RNA genome and it is enveloped, being the primary causative agent of Turkey Rhinotracheitis (TRT), and it is also constantly associated with Swollen Head Syndrome in chickens (SHS), affecting broilers, layers and breeders. Thus, it constitutes a significant source of economical losses for the process of commercial breeding of these animals. The main objective of the present work was to evaluate three different inoculated amounts of the aMPV vaccine strain in primary cells of chicken embryos, in order to determine which inoculated amount will be responsible for the highest viral yield in the culture. For this, we evaluated the growth curve in each condition, to verify the time point when the viral titer reach the peak in each condition, in order to establish the ideal time for virus harvesting and optimize the yield for the cultivation of the aMPV vaccine strain.

KEYWORDS: Avian Metapneumovirus, Turkey Rhinotracheitis (TRT), Swollen Head Syndrome in chickens (SHS), vaccine, viral titer growth curve.

SUMÁRIO

1 - INTRODUÇÃO	9
2 - OBJETIVOS	12
2.1 - Geral.....	12
2.2 - Específicos.....	12
3 - MATERIAL E MÉTODOS	12
3.1 - Local onde o experimento foi realizado.....	12
3.2 - Obtenção e preparo do concentrado celular.....	13
3.3 - Cultivo do Metapneumovírus aviário.....	14
3.4 - Coleta e titulação viral dos cultivos.....	16
4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO	17
5 - CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS	22
6 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	23

1 – INTRODUÇÃO

O Metapneumovírus aviário (aMPV) pertence à família *Pneumoviridae* e ao gênero *Metapneumovirus*. (ADAMS et al., 2016). Foi identificado pela primeira vez em 1978 na África do Sul, desde então novos casos de infecção surgiram em outros países (COSWIG, 2008; COSWIG, 2010; KUNERT FILHO et al., 2015). No Brasil, por meio de análises sorológicas realizadas em granjas, foram detectados anticorpos para o aMPV a partir de 1992, indicando que o vírus já estava presente no país (COSWIG, 2008). Mas só foi possível fazer o isolamento e a identificação dele em 1995 em amostras de frangos, nos estados de São Paulo e Minas gerais (DANI et al., 1999).

O aMPV possui um genoma de RNA de fita simples envelopado com polaridade negativa, sendo o agente primário causador de rinotraqueíte em perus (do inglês *Turkey rhinotracheitis* - TRT), está também constantemente associado à síndrome da cabeça inchada em galinhas (do inglês *Swollen Head Syndrome* - SHS), acometendo frangos de corte, poedeiras e reprodutoras. Com isso, constituiu-se uma fonte significativa de perdas econômicas para o processo de criação comercial destes animais (KUNERT FILHO et al., 2015). Sendo assim, torna-se importante o desenvolvimento e utilização de medidas preventivas, tais como vacinas contra este agente infeccioso.

Aves de diferentes espécies e de qualquer idade são suscetíveis à infecção por aMPV, que acomete inicialmente o trato respiratório superior (HAFEZ, 1993; COOK, 2000), espalhando-se por células dos epitélios ciliados dos cornetos nasais e traqueia, provocando uma deformação e perda dos cílios nestas áreas, o que facilita maior penetração de agentes secundários que complicam e agravam o processo patológico (NAYLOR et al., 1992; MAJÓ et al., 1996; VAN DE ZANDE et al., 2001; MARIEN et al., 2005; VAN LOOCK et al., 2006). Vinte e quatro horas após o início da infecção é possível detectar o aMPV na cavidade nasal e traqueia, onde a máxima quantidade de vírus é detectada entre o terceiro e sexto dia após o início da infecção, e, posteriormente, após a fase de viremia em aves adultas propaga-se também pelo trato reprodutivo. As aves enfermas liberam o vírus em secreções respiratórias, na forma de aerossol, provocando a transmissão horizontalmente (COOK et al., 1991).

Galinhas reprodutoras e poedeiras podem ter a replicação viral ocorrendo de igual modo no oviduto, sofrendo queda na postura e afetando a qualidade da casca do ovo. É possível também identificar sintomatologia nervosa, torcicolo e opistótono, devido a infecções secundárias bacterianas ascendentes do ouvido médio, que produzem uma osteomielite do crânio (MAJÓ et al., 1996).

De acordo com o relatório de produção avícola e suína divulgado pela Associação Brasileira de Proteína Animal, em 2019, a produção mundial de carne de frango foi de 98.594 mil toneladas e, deste montante, o Brasil contribuiu com a produção de 13.245 mil toneladas, ocupando o 3º lugar mundial na produção de carne de frango. Com um total de exportação de 4,2 milhões de toneladas de carne de frango, o Brasil é o número 1, seguido pelos Estados Unidos com 3,3 milhões de toneladas; União Europeia com 1,5 milhão de toneladas; Tailândia com 881 mil toneladas; e China com 428 mil toneladas (ABPA, 2020). Tal posição brasileira de destaque contribui significativamente para o abastecimento mundial e alavanca a economia do país. Por isso, é importante o monitoramento e controle sanitário dos plantéis avícolas.

A produção comercial de frangos pode ser acometida por diversas enfermidades, tais como: Coccidiose aviária, Aspergilose aviária, Clostridiose aviária, Colibacilose aviária, Salmonelose aviária, Micoplasmose aviária, Anemia infecciosa das galinhas, Bronquite infecciosa das galinhas, Doença de Marek, Doença de Gumboro, Encefalomielite aviária, Influenza aviária e outras (AMARAL et al. 2014). Neste cenário, o aMPV tem adquirido papel de destaque entre os patógenos respiratórios, desencadeando severos problemas sanitários, principalmente por estar associado a infecções secundárias, provocando perdas econômicas significativas (SANTOS et al., 2012).

Atualmente o aMPV possui quatro subtipos identificados, são eles: A, B, C e D (KUNERT FILHO et al., 2015). Os subtipos A e B são difundidos mundialmente, o subtipo C foi identificado nos Estados Unidos e França, e o subtipo D também foi identificado na França (SANTOS et al., 2012). No Brasil circulam os subtipos A e B, inicialmente com predominância do subtipo A, mas a partir de 2007 notou-se a troca pelo subtipo B. Isto pode ter ocorrido devido ao intenso e amplo uso de vacinas contra o subtipo A após ter sido detectado no país (CHACÓN et al., 2011).

Ainda não se conhece um antiviral que seja efetivo para o tratamento da infecção causada pelo aMPV. O controle de infecções causadas pelo aMPV não

foge às boas práticas de gestão e de biossegurança rigorosa já conhecidas, tais como: manejo e densidades populacionais adequados, controle de agentes imunossupressores, boa qualidade da cama, controle ambiental de poeira, controle de temperatura e ventilação, controle microbiológico da água. No tratamento das infecções secundárias causadas exclusivamente por bactérias é aconselhável o uso de antibióticos. O principal método de controle se dá por meio de vacinação (COOK, 2000). E um programa de vacinação para ser eficaz, necessita de vacinas de boa qualidade, que conferem uma alta proteção imunológica por um período prolongado. Este pode contemplar tanto vacina inativada como viva atenuada, observando sempre a legislação sanitária de cada país.

Para a produção da vacina para proteção contra a infecção causada pelo aMPV, o vírus é cultivado em células suscetíveis *in vitro* e a obtenção de alta quantidade de vírus neste processo é de suma importância para a empresa que fabrica a vacina. Para isso, durante o cultivo do vírus vacinal é necessário definir a quantidade ideal da amostra estoque a ser inoculada para se obtenha a maior replicação viral possível. Este cultivo, após finalizado, deve ser submetido a um processo de quantificação viral, tal como o que foi descrito por Reed & Muench (1938), cujo título viral é expresso em TCID₅₀ - dose infecciosa para 50% da cultura de tecidos (do inglês, *50% Tissue Culture Infective Dose*) por volume do preparado. Assim, o objetivo principal do presente trabalho foi avaliar três diferentes quantidades inoculadas da cepa vacinal do aMPV em células primárias de embrião de galinha, com a finalidade de se determinar qual a quantidade inoculada de vírus será responsável pelo maior rendimento no cultivo. Neste estudo, também será determinada a curva de crescimento em cada quantidade, para se determinar o tempo no qual o título viral é maior em cada condição e estabelecer o melhor momento para a colheita do vírus.

Para o processo de produção da vacina contra a TRT e a SHS, mais especificamente no cultivo do vírus vacinal, é de suma importância estabelecer a quantidade adequada de vírus a ser inoculada e o tempo necessário para que se obtenha o rendimento máximo do cultivo. De posse destas informações é possível fazer a coleta do cultivo viral no momento ideal, garantido um maior aproveitamento do mesmo para a formulação da vacina.

No Brasil, mesmo com o uso de vacinas contra o aMPV ainda é possível verificar a circulação deste patógeno (SANTOS et al., 2012). Com isso, fica

evidenciada a importância deste trabalho com a proposta de desenvolver uma metodologia mais eficiente para o cultivo do vírus vacinal, com a finalidade de colocar no mercado uma vacina que estimule uma maior resposta imunológica, assegurando por um período prolongado uma melhor proteção.

2 – OBJETIVOS

2.1– Objetivo geral

- ✓ Comparar cultivos com três diferentes quantidades inoculadas da cepa vacinal aMPV-L10 em células fibroblásticas primárias de embrião de galinha.

2.2– Objetivos específicos

- ✓ Obter e preparar o concentrado de células de fibroblastos primárias de embrião de galinha.
- ✓ Analisar e comparar os dados obtidos a partir do cultivo das três diferentes concentrações da cepa vacinal aMPV-L10.
- ✓ Verificar qual a quantidade de vírus será responsável pelo maior rendimento do cultivo.
- ✓ Verificar quanto tempo será necessário para que o vírus atinja o maior título em cada uma das três condições de cultivo.
- ✓ Determinar a curva de crescimento da cepa vacinal (aMPV-L10) do Metapneumovírus aviário subtipo-A cultivado em células primárias de fibroblastos de embrião de galinha, em cada uma das três condições de cultivo.

3 – MATERIAL E MÉTODOS

3.1 – Local onde o experimento foi realizado

Este trabalho foi realizado em parceria com a empresa de iniciativa privada denominada Laudo Laboratório Avícola Uberlândia Ltda - CNPJ: 23.259.427/0001-

04, situada na Rodovia BR 365, KM 615 - S/Nº, Bairro Alvorada, CEP: 38.407-180 - Uberlândia/MG, na qual exerço atividade laboral. Por intermédio de seus representantes legais, a empresa cedeu suas instalações, insumos e todos os materiais necessários para a realização dos ensaios, assumindo o custo financeiro do projeto.

3.2 – Obtenção e preparo do concentrado celular

Para obtenção das células primárias de fibroblastos de embrião de galinha (FEG) foram utilizados ovos embrionados *SPF* (*specific pathogen free*) com 10 dias de incubação. Os embriões foram retirados dos ovos, colocados em placa de Petri com papel de filtro, onde foram retiradas as cabeças, asas, patas e vísceras. O restante dos embriões foi transferido para um Becker de vidro, onde foi executado o procedimento de lavagem dos tecidos com PBS-Dulbecco, na proporção de 3 a 5 ml por embrião, para eliminar as hemácias. Após a lavagem, os tecidos foram tratados com tripsina 0,25% para individualização das células. Após centrifugação, o sedimento celular foi ressuspense em meio de cultura 199 com bicarbonato de sódio 2,2 g/L, gentamicina 40 mg/L, enriquecido com L-glutamina 0,2 g/L e com soro fetal bovino 5%.

A concentração de células da suspensão foi determinada utilizando a contagem em uma câmara de Neubauer com uma diluição 1:20 da suspensão. Foram contadas 79 células no primeiro quadrante, 77 células no segundo, 78 no terceiro e 74 no quarto. (Figura 1).

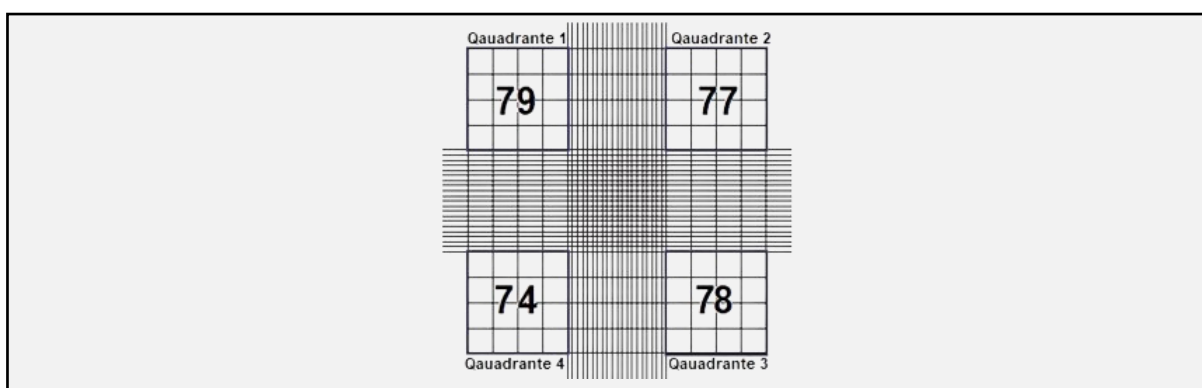


Figura 1. Esquema representando a área de contagem da câmara de Neubauer com o número de células contadas em cada quadrante.
Fonte: autoria própria.

A média aritmética da quantidade de células contadas nos quatro quadrantes foi 77, isto é, $(79+77+78+74 = 308 \div 4 = 77)$.

Para se calcular a concentração de células da suspensão, multiplicou-se a média aritmética das células contadas (77) pelo fator de diluição da suspensão (20) e pelo fator de correção padrão da câmara de Neubauer (10.000), isto é, $(77 \times 20 \times 10.000)$ obtendo-se o valor de $1,54 \times 10^7$ células/mL. Para o preparo do volume final de cultura de 50 mL foram utilizadas 5×10^7 células.

3.3 – Cultivo do Metapneumovírus aviário

A cepa cultivada foi a aMPV-L10 subtipo-A, utilizada como semente para fabricação da vacina. A mesma foi isolada pelo Laudo Laboratório Avícola Uberlândia em aves reprodutoras, adaptada em cultivo celular e certificada para produção de vacina. O título viral da amostra estoque era de $4,27 \times 10^7$ TCID₅₀/mL.

A equipe técnica do Laudo Laboratório, com o intuito de otimizar o processo já utilizado na empresa para o aMPV, para fabricação da vacina, cogitou a possibilidade de aumentar a quantidade inoculada de vírus (TCID₅₀) na cultura de células, com a intenção de obter também um maior rendimento no final do cultivo. Atualmente, utiliza-se TCID₅₀ de 5×10^6 . Para verificar a viabilidade desta alteração, considerando-se todos os fatores que influenciam na produção comercial em larga escala, foi planejado trabalhar nesta pesquisa com inóculos de valores de TCID₅₀ de 5×10^5 , 5×10^6 e 5×10^7 TCID₅₀

Foi estabelecido também que seriam feitas coletas de 5 mL de cada condição em sete tempos de incubação distintos, 30 h, 48 h, 54 h, 66 h, 72 h, 78 h e 90 h pós-inoculação (p.i.), para procedimento de titulação e determinação da curva de título, sendo necessários 50 mL de cultura (Figura 2). Inicialmente, para a adsorção viral, a incubação do vírus com a célula foi feita em volume de 10 mL (Tabela 1), a 37 °C por 2 h sob agitação lenta utilizando barra magnética.

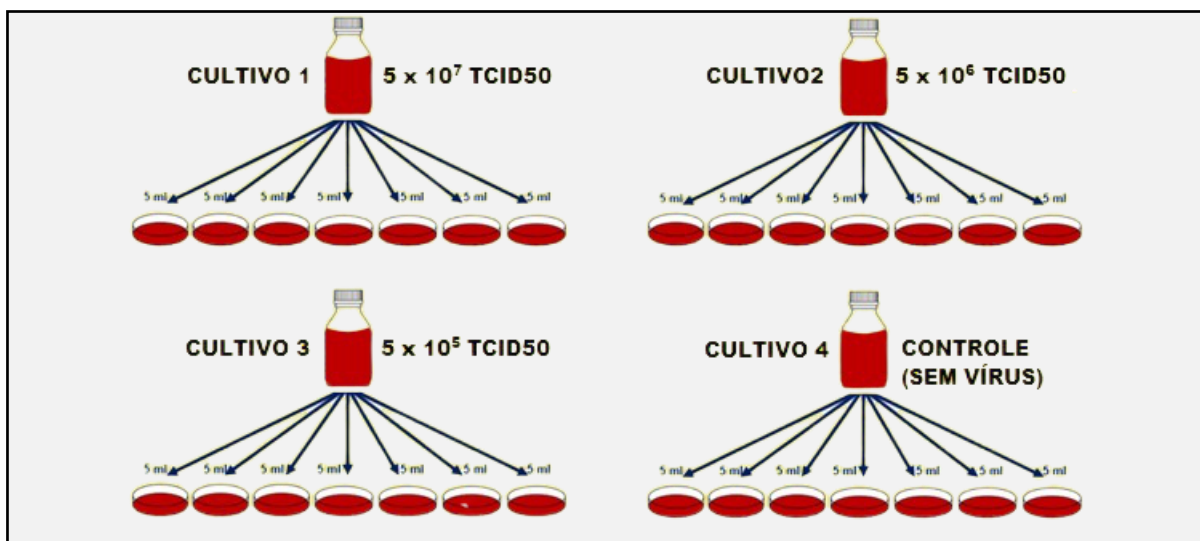


Figura 2. Esquema representativo dos cultivos realizados. Cultivo 1 realizado com a quantidade de 5×10^7 TCID50 de vírus, Cultivo 2 realizado com a quantidade de 5×10^6 TCID50 de vírus, Cultivo 3 realizado com a quantidade de 5×10^5 TCID50 de vírus, Cultivo 4 realizado sem inoculo viral.

Fonte: autoria própria.

Tabela 1. Volumes utilizados para a incubação na etapa de adsorção (semente - cepa vacinal aMPV-L10, preparado celular e meio de cultura 199)

	CULTIVOS			
	1 (5×10^7 TCID50)	2 (5×10^6 TCID50)	3 (5×10^5 TCID50)	4 Controle (sem vírus)
Volume da semente ($4,27 \times 10^7$ TCID50/mL)	1,172 mL	0,1172 mL	0,01172 mL	-----
Volume do preparado celular ($1,54 \times 10^7$ células/mL)	3,247 mL	3,247 mL	3,247 mL	3,247 mL
Volume de meio 199	5,581 mL	6,6358 mL	6,74128 mL	6,753 mL
Volume final para adsorção	10 mL	10 mL	10 mL	10 mL

Após o período de adsorção, foi acrescentado mais meio de cultura 199 (com bicarbonato de sódio e soro fetal bovino a 5%), totalizando um volume de 50 mL em cada frasco. Após a homogeneização, foram preparadas sete placas de Petri (medindo 60 mm x 15 mm com superfície tratada para cultivo celular) contendo 5 mL de cada cultivo, inclusive do controle, que foram incubadas a 37 °C e CO₂ 4%. Em cada tempo de coleta, uma placa de cada cultivo era removida para a coleta das amostras virais.

3.4 – Coleta e titulação viral dos cultivos

Todas as placas foram armazenadas a -80 °C, inclusive as da última coleta. Em seguida, as amostras foram descongeladas e congeladas novamente, a fim de promover a liberação dos vírus que estavam no interior das células. Concluído estes procedimentos (congelamento e descongelamento por duas vezes) as amostras foram transferidas para microtubos e submetidas ao processo de titulação utilizando o método de Reed & Muench (1938).

Para isso, foram utilizadas placas de cultura celular de 96 poços, com cada poço contendo 4×10^4 células de fibroblastos de embrião de galinha. Foram realizadas sete diluições seriadas 1:10 das amostras obtidas de cada ponto de coleta (Figura 3), de todos os cultivos e 50 µL de cada diluição foi inoculada em cinco diferentes poços (Figura 4). Após a incubação por cinco dias, as placas foram visualizadas em microscópio invertido para observação de possível aparecimento de áreas dispersas com arredondamento celular e formação de sincícios, efeito citopático característico da infecção causada pelo aMPV. O experimento de titulação foi realizado em duplicata (titulações 1 e 2, conforme layout mostrado na Figura 4). Após a visualização microscópica de todas as placas, foram feitas anotações com a quantidade de poços que apresentaram e/ou não efeitos citopáticos em cada uma das diluições inoculadas. De posse destes dados, foi realizado o cálculo do título viral de cada amostra analisada e este foi expresso em TCID₅₀/mL.

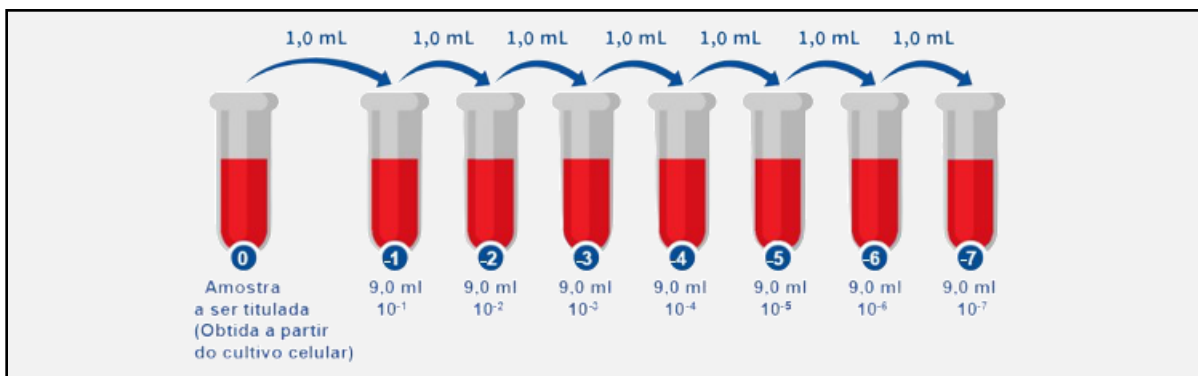


Figura 3. Esquema representativo da diluição seriada realizada com as amostras obtidas de cada tempo de coleta dos cultivos realizados nas diferentes condições.

Fonte: adaptação realizada a partir do site da KASVI, disponível em:

<https://kasvi.com.br/preparo-de-solucoes-laboratorio-concentracao-fator-diluicao-seriada/>
Acesso em: 23 nov. 2019.

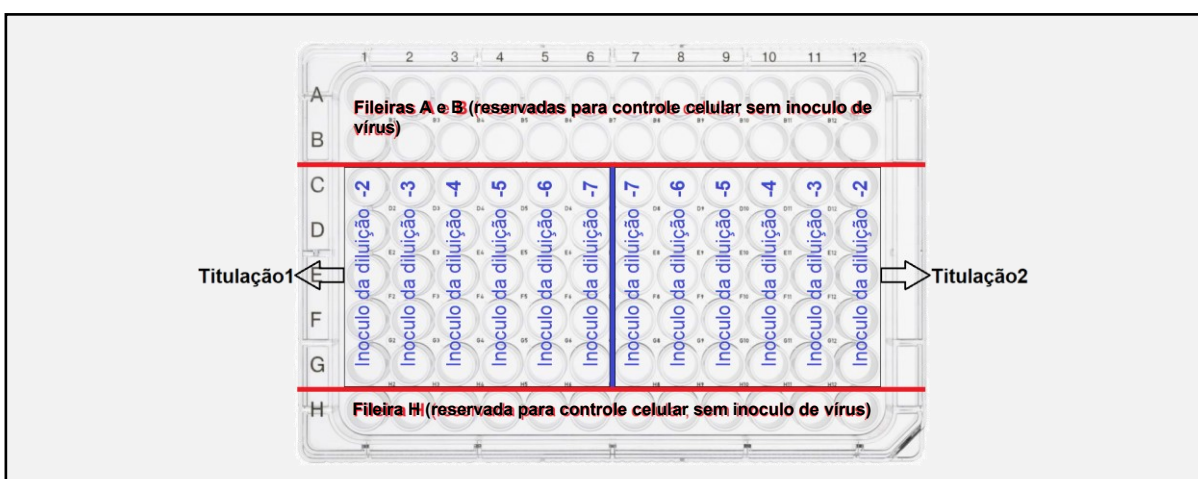


Figura 4. Layout da distribuição das diluições das amostras virais na placa de cultivo celular.

Fonte: adaptação realizada a partir do site da LABELIANS, disponível em:

<https://labelians.fr/media/catalog/category/12233.jpg> Acesso em: 23 nov. 2019.

4 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

As sete amostras provenientes do grupo controle (sem inóculo viral) não apresentaram efeito citopático, conforme o esperado. Na amostra coletada com 30 h de incubação do cultivo 1, foram observados efeitos citopáticos (Figura 5) nos poços da cultura de células indicados na tabela 2 e esses resultados foram utilizados para o cálculo do título viral (Tabela 3 e Figura 6).

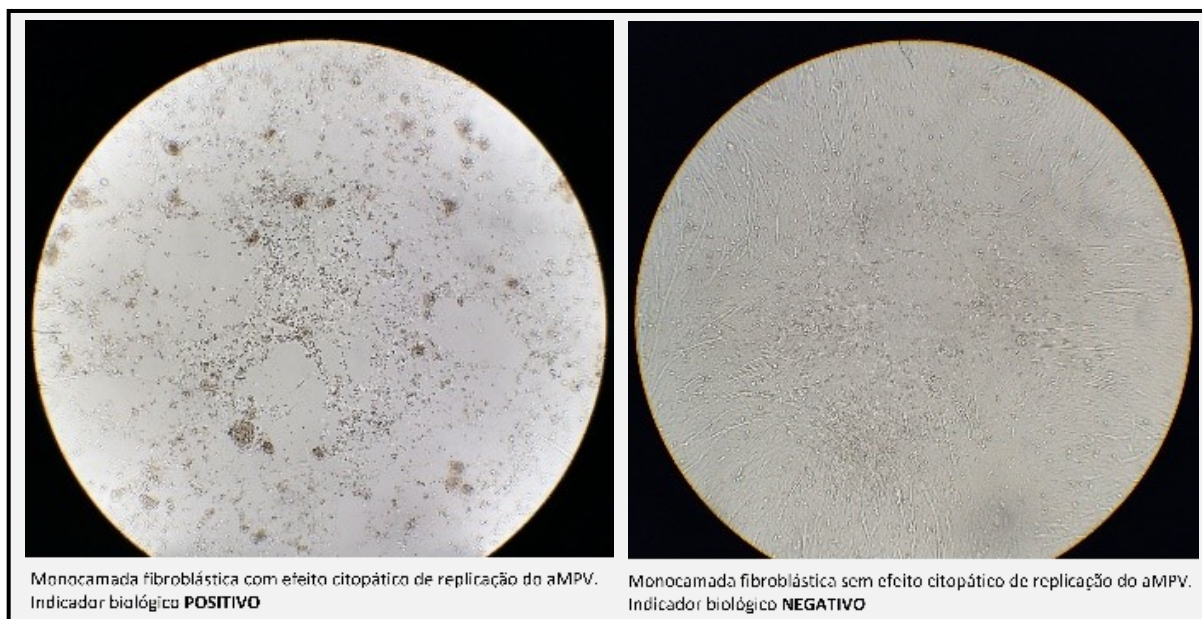


Figura 5. Observação microscópica. Imagem de fibroblastos de embrião de galinha cultivados com (esquerda) ou sem (direita) inoculação de metapneumovírus aviário, cepa aMPV-L10 subtipo-A.

Fonte: autoria própria.

Tabela 2. Quantidade de poços com e sem efeito citopático (POSITIVO e NEGATIVO para replicação viral respectivamente), observados em cada diluição inoculada. Dados referentes a titulação 1 da amostra do cultivo 1, coletada com 30 h de inóculo.

Titulação 1		
Diluições	Número de poços positivos	Número de poços negativos
-2	5	0
-3	5	0
-4	5	0
-5	3	2
-6	0	5
-7	0	5

Tabela 3. Cálculo do título viral aplicando o método de Reed & Muench (1938).

Diluições	Acumulados Positivos	Acumulados Negativos	Total (Acumulados Positivos + Negativos)	Percentual de Positivos em relação ao acumulado total
-2	18	0	18	100%
-3	13	0	13	100%
-4	8	0	8	100%
-5	3	2	5	60%
-6	0	7	7	0%
-7	0	12	12	0%

$$\text{Título} = \frac{\% \text{ diluição} > 50\% - 50}{\% \text{ diluição} > 50\% - \% \text{ diluição} < 50\%} + \text{recíproca da diluição} > 50\%$$

$$\text{Título} = \frac{60-50}{60-0} + 5 = \frac{10}{60} + 5 = 0,166 + 5 = 5,17$$

$$\text{Título} = 10^{5,17} \text{ TCID}_{50}/0,05 \text{ mL} = 1,48 \times 10^5/0,05 \text{ mL}$$

$$\text{Título viral} = 2,96 \times 10^6 \text{ TCID}_{50}/\text{mL}$$

Figura 6: Cálculo do título viral segundo o método de Reed & Muench (1938).

Fonte: autoria própria.

O mesmo procedimento foi realizado com as demais amostras, totalizando sete tempos de coleta, três condições e duas repetições do experimento de titulação, e os títulos virais foram obtidos (Tabela 4). Estes dados foram utilizados para elaboração das curvas de título viral de acordo com o tempo de incubação da cultura em cada condição (Figura 7).

Tabela 4. Títulos virais ($\times 10^6$ TCID50/mL) obtidos nas amostras (sendo, sete tempos de coleta e três diferentes quantidades de cepa vacinal inoculadas, 5×10^7 TCID50, 5×10^6 TCID50 e 5×10^5 TCID50). A coluna Tit.1 corresponde ao título obtido na titulação 1 e a Tit.2 corresponde ao título obtido na titulação 2. A coluna Média representa a média aritmética das duas titulações (valores estes que foram utilizados para a elaboração das curvas de títulos) e a coluna Desvio padrão representa o desvio entre as duas titulações (neste caso específico não foi considerado para efeito de análise estatística).

Tempo de incubação (h)	INÓCULOS (TCID50)											
	5×10^5				5×10^6				5×10^7			
	Tit. 1	Tit. 2	Média	Desvio padrão	Tit. 1	Tit. 2	Média	Desvio padrão	Tit. 1	Tit. 2	Média	Desvio padrão
30	0,30	0,20	0,25	0,07	6,31	2,95	4,63	2,37	2,95	4,17	3,56	0,86
48	2,95	4,68	3,81	1,22	4,68	8,32	6,50	2,57	1,35	1,35	1,35	0,00
54	2,95	4,68	3,81	1,22	8,32	6,31	7,31	1,42	4,68	1,35	3,01	2,35
66	8,32	6,31	7,31	1,42	8,32	4,68	6,50	2,57	1,12	4,68	2,90	2,51
72	2,00	6,31	4,15	3,05	6,31	6,31	6,31	0,00	0,63	0,83	0,73	0,14
78	6,31	2,95	4,63	2,37	1,35	2,95	2,15	1,13	1,35	0,95	1,15	0,28
90	1,35	2,95	2,15	1,13	1,35	2,95	2,15	1,13	0,63	0,42	0,52	0,15

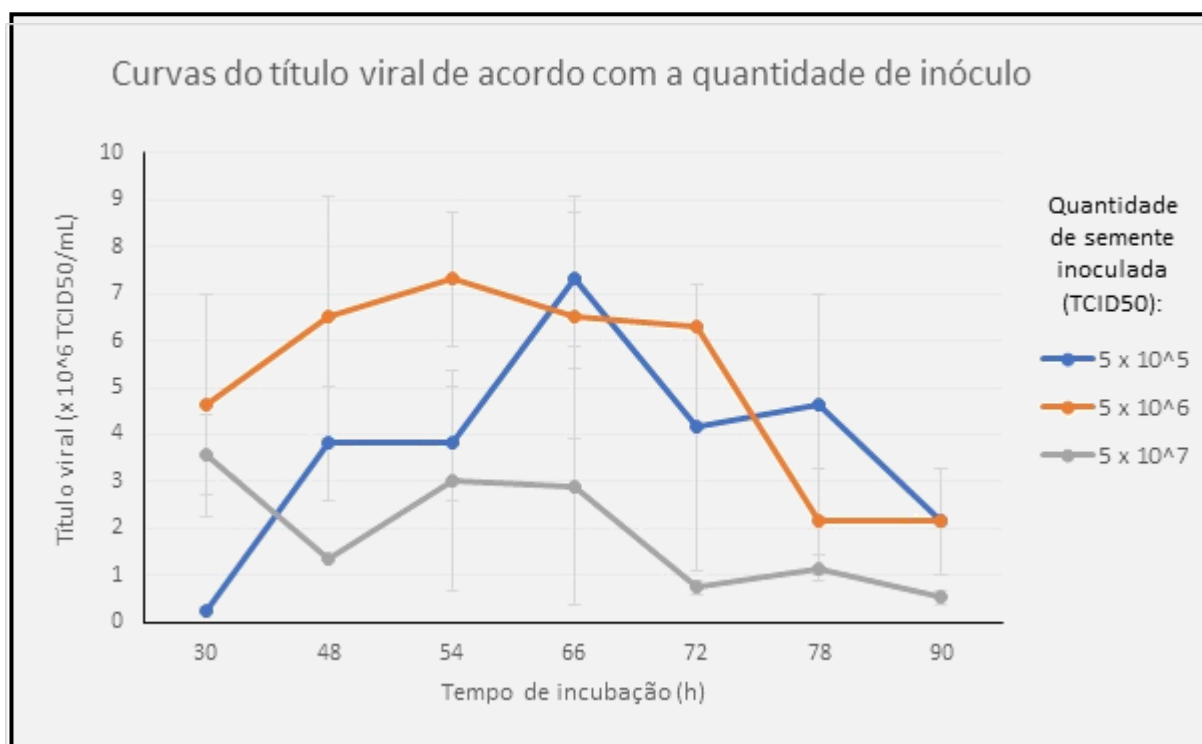


Figura 7. Curvas de crescimento do título viral com as três quantidades inoculadas da semente de aMPV em cultura de fibroblastos de embrião de galinha. As curvas representam o valor médio do título viral da titulação realizada em duplicata com alíquotas de cada cultura coletadas em cada tempo de incubação indicado. As linhas verticais indicam os valores do desvio padrão.

A curva de crescimento com a quantidade menor de semente inoculada (5×10^5 TCID₅₀) indica que o pico do título viral, de $7,3 \times 10^6$ TCID₅₀/mL, foi atingido com 66 h de incubação do vírus na cultura de fibroblastos de embrião de galinha (Figura 7, linha azul). Após esse tempo de incubação, o título viral apresentou rápido declínio, com cerca de 40% de redução do título viral nos dois tempos de coleta seguintes e atingindo 71% de redução com 90 h de incubação.

Com uma quantidade 10 vezes maior de semente inoculada (5×10^6 TCID₅₀), o maior título viral atingido, de $7,3 \times 10^6$ TCID₅₀/mL, foi similar à da menor quantidade inoculada, porém, foi atingido com 54 h de incubação (Figura 7, linha laranja). Após este tempo, também houve declínio do título viral, porém levemente nos dois tempos seguintes de coleta e que se intensificou nos últimos tempos, atingindo igualmente 71% de redução do título viral.

Com a maior quantidade de semente inoculada, de 5×10^7 TCID₅₀, o maior título viral observado foi com o primeiro tempo de coleta, com 30 h de incubação, sugerindo que o pico pode ter sido atingido antes (Figura 7, linha cinza). Devido a este fato, não foi possível determinar se, em algum momento anterior, houve título viral maior, menor ou semelhante em comparação com as demais condições. Além disso, o título viral com este tempo de incubação foi 51% menor que os picos de título viral obtidos com as demais condições. A curva de crescimento mostra, ainda, que as alíquotas coletadas com este inóculo já se encontravam na fase de declínio do título viral.

A ideia de que uma maior quantidade de vírus inoculada na cultura de células poderia também proporcionar um melhor rendimento do cultivo do vírus vacinal com títulos maiores, não foi confirmada. Ao contrário, a condição que apresentou os menores títulos virais foi justamente a que foi cultivada com a maior quantidade de vírus inoculada (5×10^7 TCID₅₀). Nesta condição, o título viral apresentou redução com o tempo de incubação da cultura, sugerindo haver pouca produção de vírus após 30 h de incubação e que este declínio pode representar a redução da viabilidade dos vírus produzidos até o primeiro tempo de coleta.

Não encontramos, na literatura científica, descrição de trabalhos semelhantes que tenham utilizado o cultivo do Metapneumovírus aviário subtipo-A em células primárias de fibroblastos de embrião de galinha para obtenção de curva de crescimento neste substrato específico.

Coswig et al. (2010) descreveram um estudo sobre a propagação de metapneumovírus aviários de subtipos A e B utilizando diferentes tipos celulares. A cepa utilizada do subtipo-A foi a SHS-BR-121, de vírus de uma granja, e isolada em células da linhagem CER (*Chicken Embryo Related*). Após cinco passagens nesta linhagem, o título obtido foi de $7,5 \times 10^7$ TCID₅₀/mL e, no ensaio da curva de crescimento, os maiores títulos virais foram obtidos com 24 a 36 h de incubação, atingindo cerca de 10^7 TCID₅₀/mL. No entanto, não foi mencionada a quantidade de vírus inoculada na cultura de células. Em comparação com o presente estudo, o maior título viral que conseguimos no ensaio para a curva de crescimento, dentro das condições utilizadas e utilizando células primárias de embrião de galinha, foi aproximadamente 1,4 vez menor, tanto com a inoculação de 5×10^5 quanto a de 5×10^6 TCID₅₀. Outras diferenças observadas no estudo de Coswig et al. (2010) em relação a este, além da utilização de células CER, foi o uso para o cultivo de garrafas de 25 cm², concentração de soro fetal bovino a 10% e inoculação do vírus quando a confluência das células já havia atingido 85%.

5 – CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS

Diante dos resultados obtidos a menor quantidade de vírus inoculada apresentou um bom rendimento, mostrando ser em termos de custo benefício a melhor opção de inóculo para o cultivo da cepa aMPV-L10 para o processo de produção da vacina.

Com o intuito de aumentar ainda mais o rendimento do cultivo da cepa vacinal, outras condições poderão ser avaliadas em um próximo estudo, incluindo menores quantidades de vírus inoculadas, a utilização tanto de células fibroblásticas primárias de embrião de galinha como também de células CER ou células VERO, inóculo do vírus em monocamada celular pronta com confluência satisfatória (em torno de 85%) e cultivos com volumes maiores.

6 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, M. J.; LEFKOWITZ, E. J.; KING, A. M.; HARRACH, B.; HARRISON R. L.; KNOWLES, N. J.; KROPINSKI, A. M.; KRUPOVIC, M.; KUHN, J. H.; MUSHEGIAN, A. R.; NIBERT, M.; SABANADZOVIC, S.; SANFAÇON, H.; SIDDELL, S. G.; SIMMONDS, P.; VARSANI, A.; ZERBINI, F.M.; GÖRBALENYA, A. E. & DAVISON, A. J. Ratification vote on taxonomic proposals to the International Committee on Taxonomy of Viruses (2016). **Archives of Virology**, [S.L.], v. 161, n. 10, p. 2921-2949, 16 jul. 2016. Springer Science and Business Media LLC.
<http://dx.doi.org/10.1007/s00705-016-2977-6>

AMARAL, P. F. G. P.; MARTINS, L. A.; OTUTUMI, L. K. Bioseguridade na criação de frango de corte. **Enciclopédia Biosfera**. Centro Científico Conhecer. Goiânia-GO, v.10, n.18; p. 664-685. 2014.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE PROTEINA ANIMAL-ABPA. **Relatório anual 2020**. [2020?] Disponível em: https://abpa-br.org/wp-content/uploads/2020/05/abpa_relatorio_anual_2020_portugues_web.pdf. Acesso em: 25 abr. 2021.

CHACÓN, J. L.; MIZUMA, M.; VEJARANO, M. P.; TOQUIN, D.; ETERRADOSSI, N.; PATNAYAK, D. P.; GOYAL, S. M.; FERREIRA, A. J. Avian metapneumovirus subtypes circulating in Brazilian vaccinated and nonvaccinated chicken and turkey farms. **Avian Diseases**. v. 55, n. 1, p. 82-89. mar. 2011.
<https://doi.org/10.1637/9501-081310-Reg.1>

COOK, J. K. A.; ELLIS, M. M.; HUGGINS, M. B. The pathogenesis of turkey rhinotracheitis virus in turkey poultlets inoculated with the virus alone or together with two strains of bacteria. **Avian Pathology**. v.20, p.155-166. 1991.
<http://dx.doi.org/10.1080/03079459108418750>

COOK, J. K. A. Avian rhinotracheitis. In: **Revue Scientifique et Technique**, Office International des Epizooties, v.19, n.2, p.602-613. 2000.
<http://dx.doi.org/10.20506/rst.19.2.1233>

COSWIG, Lia Treptow. **Metapneumovirus aviario: suscetibilidade em diferentes sistemas celulares e produção de anticorpos monoclonais**. Orientadoras: Clarice Weis Arns, Dagmar Ruth Stach-Machado. 2008. 102f. Tese (doutorado em genética e biologia molecular na área de microbiologia) - Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia, Campinas, São Paulo, 2008. Disponível em: <http://www.repositorio.unicamp.br/handle/REPOSIP/316628>. Acesso em: 05 jul. 2019.

COSWIG, L. T.; SANTOS, M. B.; HAFEZ, H. M.; FERREIRA, H. L. & ARNS, C. W. Propagation of avian metapneumovirus subtypes A and B using chicken embryo related and other cell systems. **Journal of Virological Methods**. v.16, n.1, p.1-4. 26 feb. 2010. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jviromet.2010.02.018>

DANI, M. A. C.; ARNS, C. W. & DURIGON, E. L. Molecular characterization of Brazilian avian pneumovirus isolates using reverse transcription-polymerase chain reaction, restriction endonuclease analysis and sequencing of a G gene fragment. **Avian Pathology**. v. 28, n.5, p. 473–476. 1999. <http://dx.doi.org/10.1080/03079459994498>

HAFEZ, H. M. The role o pneumovirus in the swollen head syndrome of chickens: review. **Arch Geflügelk**. v. 57, n. 4, p.181-185. 1993. Disponível em: https://www.european-poultry-science.com/artikel.dtl/1993-57-181-185_NTEzODA0OQ.PDF. Acesso em: 23 nov. 2019.

KUNERT FILHO, H. C.; HENTGES, L. P.; GRASSOTTI, T. T.; BRITO, K. C. T. de.; CARVALHO, D.; CUNHA, A. C. da.; CAVALLI, L. S.; OTUTUMI, L. K.; BRITO, B. G. de. Aplicação da técnica de RT-PCR para Metapneumovírus aviário (aMPV). **Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia da UNIPAR**. Umuarama-PR. v. 18, n. 2, p. 75-81. abr./jun. 2015. <https://doi.org/10.25110/arqvet.v18i2.2015.5376>

MAJÓ, N.; MARTI, M.; O'LOAN, C.J.; ALLAN, G.M.; PAGÈS, A. & RAMIS, A. Ultrastructural study of turkey rhinotracheitis virus infection in turbinates of experimentally infected chickens. **Veterinary Microbiology**. v. 52, p. 37–48. 1996. [http://dx.doi.org/10.1016/0378-1135\(96\)00060-0](http://dx.doi.org/10.1016/0378-1135(96)00060-0)

MARIEN, M.; DECOSTERE, A.; MARTEL, A.; CHIERS, K.; FROYMAN, R.; NAUWYNCK, H. Synergy between avian pneumovirus and *Ornithobacterium rhinotracheale* in turkeys. **Avian Pathology**. v. 34, n. 3, p. 204–211. 2005. <http://dx.doi.org/10.1080/03079450500096414>

NAYLOR C. J.; ALANKARI A. R.; ALAFALEQ A. I.; BRADBURY J. M.; JONES R. C. Exacerbation of *Mycoplasma gallisepticum* infection in turkeys by rhinotracheitis virus. **Avian Pathology**, v. 21, p. 295–305. 1992. <http://dx.doi.org/10.1080/03079459208418844>

REED, L.J. & MÜENCH, H.A. A simple method of estimating fifty percent endpoints. **American Journal of Hygiene**. n.27, v.3, p.493-497. may. 1938. <http://dx.doi.org/10.1093/oxfordjournals.aje.a118408>

SANTOS, M.B.; MARTINI, M.C.; FERREIRA, H.L.; SILVA, L.H.A.; FELLIPE, P.A.; SPILKI F.R. & ARNS, C.W. Brazilian avian metapneumovirus subtypes A and B: experimental infection of broilers and evaluation of vaccine efficacy. **Pesquisa Veterinária Brasileira [online]**. v.32, n.12, p.1257-1262. dez. 2012. Disponível em: <http://www.pvb.com.br/portal/pesquisa?term=32%2812%29%3A1257-1262>. Acesso em: 04 mai. 2021.

VAN DE ZANDE, S.; NAUWYNCK, H.; PENSAERT, M. The clinical, pathological and microbiological outcome of an *Escherichia coli* O2:K1 infection in avian pneumovirus infection in turkeys. **Veterinary Microbiology**. v.81, p.353–365, 2001. DOI: 10.1016/s0378-1135(01)00362-5

VAN LOOCK, M.; LOOTS, K.; VAN DE ZANDE, S.; VAN HEERDEN, M.;
NAUWYNCK, H.; GODDEERIS, B.M.; VANROMPAY, D. Pathogenic interactions
between *Chlamydophila psittaci* and avian pneumovirus infections in turkeys.
Veterinary Microbiology. v.112, p.53–63. 2006.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2005.10.013>