

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS

CÂMPUS DE JABOTICABAL

**CLONAGEM E EXPRESSÃO DO GENE DA
NUCLEOPROTEÍNA (NP) DO VÍRUS DA DOENÇA DE
NEWCASTLE EM *Escherichia coli* PARA APLICAÇÃO NO
IMUNODIAGNÓSTICO**

Ketherson Rodrigues Silva

(Médico Veterinário)

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL
2011

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS

CÂMPUS DE JABOTICABAL

**CLONAGEM E EXPRESSÃO DO GENE DA
NUCLEOPROTEÍNA (NP) DO VÍRUS DA DOENÇA DE
NEWCASTLE EM *Escherichia coli* PARA APLICAÇÃO NO
IMUNODIAGNÓSTICO**

**Ketherson Rodrigues Silva
ORIENTADOR: Prof. Dr. Hélio José Montassier**

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Medicina Veterinária (Patologia Animal).

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL
Fevereiro de 2011

S546c Silva, Ketherson Rodrigues
Clonagem e expressão do gene da nucleoproteína (np) do vírus da doença de newcastle em *Escherichia coli* para aplicação no imunodiagnóstico / Ketherson Rodrigues Silva. -- Jaboticabal, 2011 xix, 101 f. : il. ; 28 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2011
Orientador: Hélio José Montassier
Banca examinadora: Aramis Augusto Pinto, Camillo Del Cistia Andrade
Bibliografia

1. Clonagem e expressão. 2. Nucleoproteína recombinante. 3. Vírus da doença de Newcastle. 4. ELISA. 5. Anticorpos I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 619:616.98:639.5

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação – Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

Ketherson Rodrigues Silva – Nascido em agosto de 1984, natural de Uberaba - Minas Gerais, Brasil. Formado em Medicina Veterinária pela Universidade de Uberaba – UNIUBE, Uberaba – MG, no ano de 2008. Inscrito no Conselho Regional de Medicina Veterinária do Estado de Minas Gerais sob o nº 9907. Durante a graduação participou, como aluno de Iniciação Científica, durante três anos consecutivos, no projeto nº PAPE 2005/038 de agosto de 2005 a julho de 2006, intitulado “Efeito de mananoligossacarídeos sobre a morfometria da mucosa intestinal de frangos de corte e controle de colibacilose aviária”. No período de agosto de 2006 a julho de 2007 participou, como aluno de Iniciação Científica do projeto nº PAPE 2005/010, com o título - Avaliação “in vivo” e “in vitro” das características físico-químicas e histopatológicas de aloenxertos de osso cortical preservado em diversos meios e a fresco. Estudo experimental em coelhos, e ainda como extensão do projeto anterior, durante agosto de 2007 a julho de 2008, participou, como aluno de Iniciação Científica, no projeto nº PAPE 2007/058 – Avaliação clínica, radiográfica, biomecânica e histológica da utilização de abraçadeira de náilon com sistema de autotravamento no tratamento de fraturas oblíquas dos ossos longos. Estudo “in vivo” e “in vitro” em coelhos. Ingressou no mestrado em março de 2009, no programa de Medicina Veterinária / Patologia Animal na FCAV/UNESP/Jaboticabal. E-mail: kethersonrodrigues@uol.com.br

Poema da Prosperidade

*Nem a tristeza, nem a desilusão;
nem a incerteza, nem a solidão;
nada me impedirá de sorrir.*

*Nem o medo, nem a depressão;
por mais que sofra o meu
coração;
nada me impedirá de sonhar.*

*Nem o desespero, nem a descrença;
muito menos o ódio ou alguma
ofensa;
nada me impedirá de viver.*

*Em meio às trevas, entre os espinhos;
nas tempestades e nos descaminhos;
nada me impedirá de crer em Deus.*

*Mesmo errando e aprendendo,
tudo me será favorável,
tudo me será necessário,
pra que eu possa sempre evoluir,
perseverar, servir, cantar,
agradecer, perdoar, recomeçar...*

*Quero manter o meu otimismo,
conservar o meu equilíbrio,
fortalecer a minha esperança,
recompor as minhas energias*

*para prosperar na minha missão
e viver alegre todos os dias.*

*Quero caminhar na certeza de chegar,
quero buscar na certeza de alcançar,
quero lutar na certeza de vencer,
quero saber esperar para poder realizar
os ideais do meu ser.*

*Enfim,
quero dar o máximo de mim
para viver intensamente e maravilhosamente
todos os dias da minha vida.*

LUIZ BASTOS

Dedicatória

Dedicado este momento as pessoas sem as quais, seria impossível a realização desta etapa...

Suzamar e Jair, meus pais...

Exemplos de dedicação e honestidade, o meu respeito e gratidão... Amo vocês!

Kelson e Kéttima, meus irmãos...

*Pela amizade incondicional
ao longo desta jornada.*

Odórico (in memoriam) e Antonia, meus queridos Avós...

Tenho a certeza que estou hoje aqui graças a vocês e só Deus e eu sabemos o quanto amo, agradeço e admiro vocês dois.

Ana Clara, minha afilhada e sobrinha...

Um anjinho que Deus colocou em nossas vidas.

Dedico...

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a **Deus**, por ter colocado em meu caminho pessoas muito especiais, que me deram as mais variadas condições, permitindo a chegada desse dia, e a realização desse sonho;

Ao **Prof. Dr. Hélio José Montassier**, que me orientadou de forma pacienciosa e incentivadora, pela transmissão dos infinitos conhecimentos, pela amizade e pela confiança que ele me concedeu de realizar este trabalho, ao qual serei eternamente agradecido;

A **Profª Drª Rosangela Zacarias Machado**, pela a oportunidade e ajuda concedidas;

Ao **Profº. Dr.º Antonio Carlos Paulilo** e a **Profª. Drª. Janete Ap. Desidério Sena**, pela disponibilidade no uso das facilidades do laboratório, pela sua atenção, sugestões e contribuições extremamente valiosas;

Aos Professores **Drª. Eliana Gertrudes Macedo Lemos**, **Dr.º Ângelo Berchieri Júnior** e ao **Dr.º Manoel Victor Franco Lemos** pela disponibilidade no uso dos equipamentos de seus laboratórios e em especial aos seus respectivos técnicos **João Carlos**, **Adriana Almeida** e **Eliana Alves**, agradeço a amizade e competência que sempre demonstraram ao me ajudar quando precisei;

Aos membros da banca de qualificação, **Profª. Drª. Adolorata Aparecida Bianco Carvalho** e **Dr. Aramis Augusto Pinto** pela disponibilidade em participar do exame de qualificação e pelas inúmeras contribuições dadas para a finalização deste trabalho;

A **Drª Maria de Fátima Montassier**, pela amizade, pela atenção, pelo carinho, que foram de extrema importância para o enriquecimento da minha vida profissional;

A **Aliandra M. Gibertoni Malaman, Camila Cesário Fernandes, Daniela Gomes da Silva, Elisabete Schirato de Oliveira e Mariana Gonçalves**, pela amizade e pelos conhecimentos que contribuíram na elaboração deste trabalho, jamais me esquecerei dos ensinamentos de vocês;

A **Maria de Lurdes Feres Tamanini “Lurdinha”**, uma excelente profissional de caráter singular, que sempre me ajudou e incentivou nos momentos mais difíceis desse trabalho. E também por sua infinita amizade;

Aos colegas de laboratório **Alan, Aline, Cíntia, Filipe, Felipe, Igor, Mariana Demétrio, Mariana Monezi e Phillip** pela amizade e ajuda;

Aos amigos **Adriana, Bruna, Bruno, Carla, Clarissa, Daiênia, Eugenio, Flávio, Greice, Henrique, Keila, Livia e Vitor** pelo companheirismo e ajuda em muitos momentos difíceis e também, pelas horas e horas de descontração e alegria que dividimos juntos;

A **Edna, Rosângela e Silvina**, excelentes funcionárias do Departamento de Microbiologia, sempre prestativas e dispostas nos ajudar em tudo que precisamos;

Aos **funcionários e professores** do Departamento de Patologia Veterinária;

A **FortDodge**, pela doação dos ovos SPF;

Ao **Instituto Biológico de Bastos-SP**, pelo auxílio na obtenção de amostras de sangue de aves de postura de granjas comerciais e em especial as pesquisadoras **Drª Nilce Soares Gama e Msc Elisabete Ap. Lopes Guastali**

Ao **CNPq**, pelo financiamento deste projeto (proc. 578453/2008-8);

A **CAPES** pela bolsa auxílio concedida;

Ao Laboratório Nacional Agropecuário (**LANAGRO**), unidade Campinas/SP pela parceria no desenvolvimento deste projeto;

A Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” / **Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Câmpus de Jaboticabal**;

As **aves**, que tiveram suas vidas solicitadas para esse projeto.

SUMÁRIO

Página

LISTA DE QUADROS E TABELAS	xi
LISTA DE FIGURAS	xii
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xvi
RESUMO.....	xviii
ABSTRACT	xix
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO LITERATURA	3
2.1. A Doença de Newcastle	3
2.2. Etiologia, Aspectos Estruturais e Patogenia	4
2.3. Epidemiologia	9
2.4. Medidas de Controle	12
2.5. Diagnóstico Laboratorial	13
3. OBJETIVOS	19
3.1. Geral	19
3.2 Específicos	19
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	20
4.1. Propagação e Titulação da Infectividade Viral	20
4.2. Oligonucleotídeos Iniciadores	20
4.3. Extração do RNA viral	21
4.4. Amplificação do gene da proteína NP do VDN pela técnica de RT-PCR	22
4.5. Reação em cadeia da polimerase (PCR)	22
4.6. Análise eletroforética em gel de agarose dos produtos amplificados do gene NP da estirpe LaSota do VDN	23
4.7. Purificação do produto amplificado do gene NP da estirpe LaSota do VDN	23
4.8. A metodologia para a clonagem e expressão da Proteína N do VDN em <i>E. coli</i>	23
4.8.1. Vetor de Clonagem do Produto da RT- PCR	23
4.8.2. Transformação de células competentes do vetor pET SUMO One Shot Mach 1-T1.....	26
4.8.3. Análise dos clones transformantes com o vetor pET SUMO – Gene NP	26
4.8.4. Eletroforese em gel de agarose para a identificação dos produtos amplificados a partir do DNA plasmideal dos clones transformantes.....	28
4.8.5. Sequenciamento de nucleotídeos do inserto do gene NP do VDN dos clones bacterianos transformantes.....	28

4.9 Expressão do gene NP do VDN em bactérias.....	29
4.9.1 Preparação de células competentes da bactéria <i>E. coli</i> para transformação e expressão da Proteína NP recombinante.....	29
4.9.2 Transformação de células competentes da bactéria <i>E. coli</i> por choque térmico	30
4.9.3 Indução da expressão da NP recombinante do VDN	31
4.10. Análise da expressão dos clones transformantes por SDS-PAGE e “Western blotting”	32
4.10.1. Dosagem de proteína total e purificada	32
4.10.2. Concentração do VDN com Polietileno-Glicol para uso nas técnicas de PAGE-SDS e de Western-Blotting	32
4.10.3. Preparação de soros de referência contra o VDN	32
4.10.4. Análise de proteínas em gel de poliacrilamida na presença de dodecilsulfato de sódio (PAGE-SDS)	33
4.10.5. Análise imunoquímica da NP recombinante do VDN expressas em <i>E. coli</i> pela técnica de “Western-blotting”	33
4.11. Purificação da NP recombinante do VDN.....	34
4.12. Amostras de soros para aplicação em teste de imunodiagnóstico da proteína NP recombinante do VDN	35
4.12.1 Amostras de soros de galinhas de postura	35
4.12.2. Soros de frangos de corte	35
4.12.3. Amostras de soros negativos para o VDN	36
4.13. Aplicação da NP recombinante do VDN no teste de ELISA indireto / NP-VDN-ELISA	36
4.14. Teste de inibição da hemaglutinação (HI).....	37
4.15. Análise dos resultados do NP-VDN-ELISA	38
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	40
5.1. Propagação e titulação da infectividade viral	40
5.2. Extração de RNA viral e amplificação pela técnica de RT-PCR do gene N do VDN	40
5.3. Otimização da temperatura de anelamento dos oligonucleotídeos iniciadores do gene NP do VDN para a PCR.....	41
5.4. Reação de purificação e quantificação do DNA amplificado do gene NP do VDN	42
5.5. Identificação dos clones bacterianos portadores do gene N do VDN após sua inserção no vetor Champion™ pET SUMO Protein Expression System®	43
5.6. Sequenciamento de nucleotídeos do inserto do gene NP do VDN nos clones bacterianos transformantes selecionados.....	45

5.7. Indução da expressão e purificação da proteína recombinante NP do VDN e análise pelas técnicas de SDS-PAGE e de “Western-blotting”	50
5.8. Desenvolvimento de um método indireto de ELISA com a proteína NP recombinante do VDN expressa em <i>E. coli</i> (NP-VDN-ELISA)	58
5.9. Relações entre os resultados do NP-VDN-ELISA e do teste de HI usados na detecção de anticorpos contra o VDN	60
6. CONCLUSÕES	65
7. REFERÊNCIAS	66

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Página

Quadro 1. Descrição dos iniciadores utilizados na PCR para Obtenção do gene da proteína NP do VDN.....	21
Quadro 2. Descrição dos oligonucleotídeos do vetor utilizados na PCR para a avaliação dos clones transformantes bacteriano (<i>E. coli</i>).....	27
Tabela 1. Comparação dos resultados obtidos nas técnicas de HI e ELISA para a detecção de anticorpos para VDN em soros de aves de postura e de corte e análises de validação do teste.....	63

LISTA DE FIGURAS

Página

- Figura 1.** Esquema da organização estrutural das proteínas estruturais do vírus da doença de Newcastle. Estão destacadas as seis proteínas estruturais principais: a proteína de nucleocapsídeo (NP); a fosfoproteína (P); a grande proteína (L); a proteína de matriz (M); a glicoproteína hemaglutinina e neuraminidase (HN) e a glicoproteína de fusão (F) 6
- Figura 2.** Mapa do vetor de clonagem e expressão pET SUMO (Invitrogen) 25
- Figura 3.** Eletroforese em gel de agarose a 1%, contendo o fragmento gênico amplificado da NP do VDN. Canaletas (1) fragmento amplificado do gene NP com os iniciadores específicos N⁺ e N⁻, (2) marcador de tamanho molecular 1kb Plus DNA Ladder (3) controle negativo da reação (LCA-SPF)41
- Figura 4.** Visualização em gel de agarose (1% tampão TAE), para o gradiente de temperatura do pareamento dos primers. Nas canaletas 1 e 15, 5 µl Marcador molecular 1Kb plus DNA Ladder (Invitrogen). Nas canaletas de 2 a 13, os produtos de RT-PCR 5 µl provenientes das seguintes temperaturas 40,0°C; 41,2°C; 42,8 °C; 43,5°C; 49,6°C; 50,2°C; 51,0°C; 52,3,1°C; 53,3 °C; 54,3°C; 56,0°C e 57.5°C, respectivamente. Melhores temperaturas correspondem as canaletas 6 e 1342
- Figura 5.** Visualização em gel de agarose (1% tampão TAE), para quantificar cDNA purificado. Na canaleta 1, 7 µl Marcador molecular 1Kb plus DNA Ladder (Invitrogen), Canaleta 2 e 3 produto de RT-PCR e na canaleta 4, 2 µl Low DNA Mass Ladder (Invitrogen).43
- Figura 6.** Combinação de oligonucleotídeos iniciadores visualizado em gel de agarose (1% tampão TAE), canaleta 1, 7 µl Marcador molecular 1Kb plus DNA Ladder

(Invitrogen). Nas canaletas de 2 a 5 os resultados do clone C6 submetido a combinação dos primers e na canaleta 6 o controle negativo da.....44

Figura 7. Visualização dos “scores” dos nucleotídeos seqüenciados do clone C6 de *E.coli* transformado pelo vetor PET SUMO – Gene NP da Estirpe LaSota do VDN produzido nesse trabalho, que foram obtidos através da análise pelo programa BLASTn no site <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/bl2seq/wblast2.cgi>, com destaque para os escores de “E-value” e os de identidade máxima com relação às seqüências do gene NP de diversas estirpes do VDN. As caixas retangulares destacam os escores obtidos com as seqüências do gene NP das estirpes vacinais atenuadas mais relevantes do VDN [Estirpe LaSota (1 delas com 100% de identidade e duas outras com 99%, caixas de cor vermelha e cor azul, respectivamente); Estirpe B1 (98% de identidade, caixa de cor lilás) e Estirpe Ulster 2C (90% de identidade, caixa de cor lilás).....46

Figura 8. Alinhamento entre a seqüência de nucleotídeos completa do gene NP da estirpe LaSota do VDN clonado no vetor pET SUMO (Invitrogen) com o mesmo gene da estirpe de referencia LaSota do VDN depositado no “Gene Bank” sob o número de acesso AY 84540048

Figura 9. Caracterização por Western Blotting da NP recombinante expressa em *E. coli* dos clones A1 e B12. Na Canaleta 1, 5 µL Marcador de peso molecular (Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder Fermentas); nas canaletas 2 e 3 frações solúveis do clone A1 a 0,4 e 1,0mM de IPTG e nas canaletas 4 e 5 frações solúveis da cultura de bactéria do clone B12 a 0,4 e 1,0mM de IPTG..... 51

Figura 10. Caracterização SDS-PAGE da Proteína N recombinante expressa em *E. coli*. Canaleta 1, 5 µL Marcador de peso molecular (Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder Fermentas); nas canaletas 2, 3, e 4 frações solúveis da cinética de 24 h, 16 h e 4 h do clone A1 respectivamente, e as setas indicam a proteína N

recombinante do VDN (~66 kDa); na canaleta 5, fração do extrato da cultura de *E. coli* contendo apenas o vetor pET SUMO sem o inserto do gene N do VDN (controle positivo da “etiqueta” SUMO-Poli-His)..... 52

Figura 11. Caracterização por Western Blotting da Proteína NP recombinante expressa em *E. coli*. Canaleta 1, 5 µL Marcador de peso molecular (Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder Fermentas); canaletas 2, 3 e 4 frações solúveis da cinética de 24 h, 16 h e 4 h do clone A1 respectivamente, e as setas indicam a proteína N recombinante do VDN (~66 kDa); na canaleta 5, fração do extrato da cultura de *E. coli* contendo apenas o vetor pET SUMO sem o inserto do gene N do VDN (controle positivo da expressão da “etiqueta” SUMO-Poli-His); nas na canaleta 6, fração do extrato da cultura de *E. coli* não induzida com IPTG. Foi usado anticorpo monoclonal anti-poli-histidina na diluição 1:2500 53

Figura 12. Análise pela técnica de SDS-PAGE das frações de lavagem e eluição da resina de Níquel-Agarose nas diferentes etapas de purificação. Canaleta 1, 5 µL de Marcador de peso molecular (Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder Fermentas); na canaleta 2, cultura de *E.coli* não induzida (controle negativo da expressão); nas canaletas 3 e 4, frações das etapas de lavagens do lisado em resina de Níquel-Agarose; nas canaletas 5, 6, 7 e 8 extrato protéico purificado em resina de Níquel-Agarose do lisado da cultura de *E. coli* recombinante após as etapas de lavagens, e na canaleta 9, fração do extrato da cultura de *E. coli* contendo apenas o vetor pET SUMO (controle positivo da “etiqueta” SUMO-Poli-His)..... 55

Figura 13. Análise pela técnica de Western-blotting, usando-se o anticorpo Monoclonal anti-Poli-Histidina como anticorpo revelador, das frações de lavagem e eluição da resina de Níquel-Agarose nas diferentes etapas de purificação. Canaleta 1, 5 µL de Marcador de peso molecular (Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder Fermentas); na canaleta 2 cultura de *E.coli* não induzida (controle negativo da expressão); nas canaletas 3 e 4, frações das etapas de lavagens do lisado em resina de Níquel-Agarose; nas canaletas 5, 6, 7 e 8 extrato protéico purificado em resina de

Níquel-Agarose do lisado da cultura de *E. coli* recombinante após as etapas de lavagens, na canaleta 9, fração do extrato da cultura de *E. coli* contendo apenas o vetor pET SUMO sem o inserto do gene N do VDN (controle positivo da expressão da “etiqueta” SUMO-Poli-His)..... 55

Figura 14. Membrana de Western com “pool” soro de galinha, anticorpos policlonais, para observar a sua reatividade contra a NP recombinante. Na canaleta 1, 5 µL Marcador de peso molecular (Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder Fermentas); na canaleta 2, fração solúvel da purificação e na canaleta 3, estirpe LaSota concentrada com PEG, indicando a NP própria do VDN.....57

Figura 15. Resultados do método NP-NDV-ELISA realizado com diferentes concentrações da proteína recombinante da estirpe La Sota do VDN expressa em *E. coli*, ensaiando-se amostras de soro positivo e soro negativo de galinha, em diluições de 1:100 a 1:3200.....59

Figura 16. Correlação entre os níveis de anticorpos detectados pelo teste de HI (Log10 Título) e pelo NP-VDN-ELISA (Valor A/P)61

LISTA DE ABREVIATURAS

- cDNA:** Ácido desoxiribonucleico complementar
- CNPq:** Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
- DEPC:** Dimetil pirocarbonato
- DN:** Doença de Newcastle
- DNA:** Ácido desoxiribonucleico
- DNAc:** Ácido desoxiribonucleico complementar
- DO:** Densidades ópticas
- ELISA:** “Enzyme-Linked Immunosorbent Assay”
- HA:** Teste de Hemaglutinação
- HI:** Inibição da Hemaglutinação
- ICTV:** International Committee for the Taxonomy of Virus
- IPIC:** Índice de Patogenicidade Intracerebral
- IPIV:** Índice de Patogenicidade Intravenosa
- LANAGRO:** Laboratório Nacional Agropecuário
- LCA:** Líquido Córion Alantóide
- LCAi:** Líquido Córion Alantóide infectado
- LPD:** leite em pó desnatado
- MAPA:** Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento
- NP:** Nucleoproteína
- OIE:** Escritório Internacional de Epizootias
- OPD:** Orto-fenileno-diamina
- SNC:** Sistema Nervoso Central
- SPF:** “Specific Pathogen Free” Livre de patógeno específico
- TBE:** Tampão tris-borato-EDTA
- TCB:** Tampão carbonato bicarbonato
- TCF:** Tampão citrato fosfato
- TMME:** Tempo Médio de morte Embrionária

PBS: Tampão Fosfato Salina
PBST: Tampão Fosfato Salina Tween a 20%
PCR: Reação em Cadeia da Polimerase
PEG: polietilenoglicol
PMSF: phenylmethysulfonyl fluoride
APMV: Paramixovírus aviário
PNSA: Plano Nacional de Sanidade Avícola
RNA: Ácido ribonucleico
RT: Transcriptase Reverse
EUA: Estados Unidos da América
VDN: Vírus da Doença de Newcastle
DN: Doença de Newcastle

CLONAGEM E EXPRESSÃO DO GENE DA NUCLEOPROTEÍNA (NP) DO VÍRUS DA DOENÇA DE NEWCASTLE EM *Escherichia coli* PARA APLICAÇÃO NO IMUNODIAGNÓSTICO

RESUMO – A nucleoproteína do vírus da doença de Newcastle (VDN) é um dos componentes antigênicos ideais para fazer o imunodiagnóstico da DN, por ser mais conservada e possuir uma elevada imunogenicidade. A sequência completa do gene da nucleoproteína (NP) (1470 pb) da estirpe La Sota do VDN foi amplificada, nesse estudo, por RT-PCR e submetida a clonagem no vetor de expressão em *Escherichia coli* pETSUMO (Invitrogen). A proteína NP foi expressa sob a forma de uma proteína recombinante de fusão contendo o peptídeo SUMO e a sequência de poli-histidina, em seguida foi purificada em resina de níquel-agarose e caracterizada por SDS-PAGE e Western-blotting, apresentando um peso molecular de cerca de 66kDa e reatividade com anticorpos policlonais de galinhas hiperimunizadas com esse mesmo vírus. Foi então desenvolvido um método indireto de ELISA com essa proteína (NP-VDN-ELISA) para ser aplicado na detecção de anticorpos anti-virais específicos. O NP-VDN-ELISA revelou ser capaz de diferenciar amostras de soros positivos para o VDN das amostras de soros negativos e, na comparação dos resultados obtidos na análise de 125 soros de campo pelo NP-VDN-ELISA com os do teste de Inibição da Hemaglutinação (HI), foi encontrado um coeficiente de correlação significativa entre estes métodos ($r = 0,8345$), bem como elevadas sensibilidade (89,3%), acurácia (90,4%) e especificidade (95,5%). Concluindo, a proteína NP recombinante expressa pelo sistema pET SUMO – *E. coli* compartilha os principais epítomos para interagir com anticorpos de galinhas produzidos contra a proteína NP do VDN, tendo, portanto, um bom potencial de ser aplicada de forma bem sucedida e com vantagens no teste de ELISA para realizar de forma mais rápida e prática, o imunodiagnóstico da DN de um maior número de amostras séricas de galinhas.

Palavras-chave: clonagem e expressão, nucleoproteína recombinante, vírus da doença de Newcastle, ELISA, anticorpos.

CLONING AND EXPRESSION OF NUCLEOPROTEIN GENE (NP) OF NEWCASTLE DISEASE VIRUS IN *Escherichia coli* FOR APPLICATION IN IMMUNODIAGNOSIS

ABSTRACT – The nucleocapsid protein (NP) of Newcastle Disease Virus (NDV), is a preferred choice to develop a serologic assay on account of highly conserved sequences, and high immunogenicity. The whole open-reading-frame (orf) of NP gene from LaSota strain of NDV was amplified by RT-PCR and cloned in pETSUMO vector (Invitrogen) and *Escherichia coli* as cellular host. The NP protein was expressed as a fusion recombinant protein containing SUMO peptide and poly-histidine tags. This protein was easily purified in nickel-agarose resin, and characterized by SDS-PAGE and Western-blotting, showing a molecular weight of approximately 66 kDa and reactivity with polyclonal antibodies from NDV hiperimmunized chickens. The recombinant NP protein was used as antigen to develop an indirect ELISA (NP-NDV-ELISA) for the detection chicken anti-NDV antibodies. The capability of the recombinant NP protein to differentiate positive from normal chicken sera was evident in NP-NDV-ELISA, and by comparing this ELISA with haemagglutination-inhibition test (HI) a high and significant correlation with the haemagglutination-inhibition test ($r = 0,8345$), as well as high sensitivity (89,3%), specificity (95,5%) and accuracy (90,4%) were obtained. In conclusion the results indicated that the recombinant NP protein shared the main epitopes with the homologous viral protein and has a great potential to be advantageously used in the ELISA for the analysis of large number of samples in the DN immunodiagnosis.

Key-words: cloning and expression, recombinant nucleoprotein, Newcastle disease virus, ELISA, antibodies.

1. INTRODUÇÃO

O vírus da doença de Newcastle (VDN) é o agente etiológico da doença de Newcastle (DN) e causa uma enfermidade aguda, altamente contagiosa e de rápido poder de disseminação, que acomete aves comerciais e outras espécies de aves, já tendo sido comprovada a presença do vírus em mais da metade das 50 ordens da classe *Avis*. É considerada uma das doenças mais importantes para a avicultura industrial, portanto, fazendo parte da lista das enfermidades emergenciais do código zoosanitário internacional da Organização Mundial de Saúde Animal (OIE), sendo obrigatória a sua notificação. Ademais, tal enfermidade tem sido, até hoje, um dos problemas sanitários mais importantes, seja pelas perdas diretas na produção, seja pela imposição de barreiras na comercialização de produtos avícolas.

São de enorme importância, portanto, a aplicação de meios rápidos para o diagnóstico da DN, juntamente com a utilização de técnicas objetivando a determinação do estado imune após a administração de vacinas, a fim de se conseguir uma condição mais efetiva de controle dos surtos da infecção pelo VDN, tanto nas criações de galinhas de postura, como de frangos de corte. Nesse contexto, os ensaios imunoenzimáticos em fase sólida (ELISA), desde que executados com padrões apropriados, podem se constituir em indicadores bastante acurados dos níveis de anticorpos produzidos por aves infectadas ou imunizadas com o VDN, facilitando, dessa forma, o monitoramento do estado imune em granjas onde está sendo criado um número cada vez maior de aves.

No momento, preparações de partículas virais purificadas são rotineiramente usadas como antígeno para a adsorção à fase sólida dos testes imunoenzimáticos, particularmente, nos kits comerciais de ELISA, que estão disponíveis para a detecção e mensuração de anticorpos contra o VDN. A purificação do VDN exige, por sua vez, que o vírus seja propagado em grande escala e, nesse caso é necessária a utilização de um grande número de ovos embrionados livres de patógenos específicos ("Specific Pathogen Free" - SPF). Além disso, os procedimentos de purificação são complexos, demorados e onerosos e, muitas vezes, com baixo rendimento.

Por ser altamente imunogênica na natureza, a proteína de nucleocapsídeo do VDN induz elevadas repostas de anticorpos em coelhos, camundongos e galinhas, embora essa mesma proteína falha em conferir proteção. O desafio de aves imunizadas com a proteína NP com estirpes virulentas do VDN acarreta a morte dessas aves em 5 dias. Devido a sua abundância e alta imunogenicidade a proteína NP do VDN é frequentemente usada para monitorar os programas de vacinação, bem como testes de sorodiagnóstico para distinguir animais vacinados daqueles somente infectados, isso graças à existência de vacinas com deleção do gene NP do VDN (AHMAD-RAUS et al., 2009).

Ademais a proteína NP do VDN já foi clonada e expressa pelo sistema baculovírus por ERRINGTON et al. (1995) e por MAKKAY et al. (1998) para ser aplicada no método indireto de ELISA destinado à mensuração de anticorpos no soro de galinhas contra o VDN, bem como foi também expressa por vetor bacteriano apropriado para expressão em *Escherichia coli* para fins de estudos da estrutura do capsídeo desse mesmo vírus (KHO et al., 2001). No entanto, não foi ainda testado em técnicas de imunodiagnóstico como o ELISA, esse mesmo tipo de proteína recombinante expresso por sistemas procariotos que são de mais simples manipulação e não requerem cultivos celulares, tal como exige o sistema baculovírus.

Sendo assim, a clonagem e a expressão da proteína N do VDN em sistemas procariotos como a *Escherichia coli*, podem trazer algumas vantagens significativas para o preparo de antígenos a serem utilizados em testes sorológicos, principalmente em razão de ela ser bastante conservada, entre diferentes estirpes desse vírus. Desta forma a proteína N é um componente potencialmente mais vantajoso para ser usado como alvo antigênico em técnicas de imunodiagnóstico, como os ensaios imunoenzimáticos (ELISA), de aves infectadas a campo por diferentes estirpes do VDN.

Considerando-se todas as explanações anteriores, foi conduzido o presente estudo com o objetivo precípua de fazer a clonagem e a caracterização imunológica da proteína N deste vírus expressa em *Escherichia coli* e avaliar, assim, o potencial desse sistema ser utilizado na produção da proteína N recombinante do VDN para ser empregada como antígeno em ensaios imunoenzimáticos.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. A Doença de Newcastle

A doença de Newcastle (DN), também conhecida como pseudo-pesto aviária, pneumoencefalite aviária, desordem neuro-respiratória, faz parte das enfermidades emergenciais listadas no código Zoosanitário Internacional da “Organização Mundial de Saúde Animal- OIE”. É considerada em todo o mundo, uma das mais importantes doenças virais em aves não só devido a sua alta mortalidade e gravidade, mas também por causa do grande impacto econômico que resulta na obrigatoriedade de notificação aos órgãos competentes, e impondo restrições e embargos comerciais às áreas e países onde os surtos ocorrem (OIE, 2008; BRASIL, 2007).

O primeiro surto da DN no mundo foi relatado em 1926, na Ilha de Java, na Indonésia e também no mesmo ano em Newcastle, na Inglaterra (ALEXANDER, 1997, SEAL et al., 2000). No Brasil, o primeiro surto da DN ocorreu também simultaneamente em duas regiões distintas, em Belém do Pará e em Macapá, por volta de 1953 (SANTOS *et al.*, 1954), sendo que isolamento viral foi realizado por CUNHA & SILVA em 1954. A entrada do VDN no país foi atribuída à importação de carcaças de aves contaminadas procedentes dos EUA para hotéis da capital paraense (CUNHA & SILVA, 1955).

Em um estudo sobre a prevalência do VDN em frangos de corte no Brasil ORSI et al. (2010) demonstrou a presença de vírus circulante, de estirpes não virulentas, IPIC (0,51 - 0,66) em regiões do país onde não há vacinação. A soropositividade e a isolamento do vírus nos estados onde não é feita a vacinação contra a DN pode ser explicada pelo alto número de pássaros que se concentram em algumas regiões e a possível proximidade entre criação de diferentes tipos de aves ou até mesmo por falhas no manejo sanitário nas granjas (ORSI et al., 2010).

A DN é uma doença infecto-contagiosa causada pelo vírus da doença de Newcastle (VDN) que acomete as aves. Infecções pelo VDN entre aves domésticas ou confinadas têm sido associadas com uma variedade de sintomas que vão desde uma

doença subclínica, problemas respiratórios leves e diminuição da produção de ovos, até uma infecção respiratória aguda (tosse, espirro e estertores) freqüentemente seguida por manifestações nervosas, diarreia e edema da cabeça (ALDOUS & ALEXANDER, 2001). Mortalidades com estirpes patogênicas podem rapidamente exceder 90% em galinhas e perus, porem em aves silvestres, como perdiz, codorna, avestruz, psitacídeos e aves domésticas como patos, marrecos e gansos, a infecção pode não apresentar nenhuma sintomatologia (ALEXANDER, 2009).

2.2. Etiologia, aspectos estruturais e patogenia

A definição mais recente da DN é uma infecção causada pelo sorotipo 1 do *Paramyxovirus* aviário (APMV-1) que apresente Índice de Patogenicidade intracerebral (IPIC) em aves jovens, da espécie *Gallus gallus* - SPF ("Specific Pathogen Free") de um dia de idade maior que 0,7. Alternativamente ao IPIC considera-se como agente etiológico da DN o APMV-1 que demonstrar através de sequenciamento de nucleotídeos do genoma viral, uma seqüência codificadora de aminoácidos básicos na posição carbóxi-terminal da proteína F2, sendo fenilalanina na posição 117 da extremidade amino-terminal da proteína F1. Nesse caso, o termo "múltiplos aminoácidos básicos" usado para caracterizar a proteína F das estirpes mais virulentas do VDN, refere-se aos três últimos resíduos de arginina ou lisina entre as posições 113 e 116 dessa mesma proteína (ALEXANDER, 2003).

O vírus da doença de Newcastle (VDN) pertence à Ordem *Mononegavirales*, à Família *Paramyxoviridae* que é subdividida em duas subfamílias: *Pneumovirinae*, composta de um único gênero, o *Pneumovirus*, incluindo os pneumovirus aviários; e a subfamília *Paramyxovirinae*, na qual estão incluídos três gêneros, dentre eles o *Avulavirus*, tendo o vírus da Doença de Newcastle - *Paramyxovirus* Aviário Tipo 1 (APMV1 – "Avian Paramyxovirus Type 1"). Ainda ao gênero *Avulavirus* existem outros sorotipos, *Paramyxovirus* Aviários Tipo 2 ao 9. Além destes existe ainda estirpes denominadas *Paramyxovirus* Tipo 1 provenientes de pombos (PPMV-1 – "Pigeon

Paramyxovirus Type 1"). Essas estirpes são variantes do APMV-1 que após sucessivas passagens em outras espécies de aves, sofreram um mecanismo de adaptação aos pombos, tornando-se resistentes a essa espécie (ALEXANDER, 2009, BOX et al., 1988; International Committee on Taxonomy of Viruses - ICTV, 2010).

As partículas do VDN são envelopadas, pleomórficas, muitas vezes esféricas e se apresentam com um diâmetro entre 100 a 500 nanômetros. O genoma do VDN é composto por RNA de fita simples, não segmentado, de polaridade negativa e contendo cerca de 15,2 kilobases, equivalente 5×10^6 daltons (ALEXANDER, 2003; ARNS et al., 2007; SAMSON, 1988).

O genoma deste vírus codifica seis proteínas estruturais importantes (Figura 1), a proteína de nucleocapsídeo (NP); a fosfoproteína (P) e a grande proteína (L), que são associadas ao nucleocapsídeo; a glicoproteína de fusão (F), que se constitui nas menores projeções na superfície das partículas virais; a glicoproteína hemaglutinina e neuraminidase (HN), responsável pela atividade da hemaglutinina e neuraminidase, sendo que estas últimas formam os dois tipos de projeções vistas na superfície das partículas virais; e a proteína de matriz (M) (YUSOFF & TAN, 2001).

As proteínas estruturais de envelope, a glicoproteína Hemaglutinina-Neuraminidase (HN) e a glicoproteína F têm papéis importantes na relação com o hospedeiro, pois confere a função de adesão e fusão da partícula viral à membrana celular do hospedeiro. A hemaglutinina tem a capacidade de aglutinar hemácias, enquanto a neuraminidase promove a eluição gradual dos vírions associados às hemácias que estavam constituindo as porções aglutinadas (LEEuw & PEETERS, 1999).

A proteína de nucleocapsídeo (NP) é uma das mais importantes das proteínas do VDN. Essa proteína mantém uma relação estreita com o genoma viral durante a replicação do vírus, através da síntese de nucleocapsídeo RNase resistente, proporcionando proteção às novas partículas virais sintetizadas em ação conjunta com as proteínas P e L. Quanto a proteína de matriz (M), está presente em maior quantidade no interior do vírus, com a função de organizar a morfogênese do virion (KHO, 2001). A replicação viral ocorre no citoplasma da célula hospedeira. A transcrição ocorre por

meio da atuação da enzima transcriptase, que produzirá moléculas com capacidade de atuar com o RNA mensageiro e utilizar mecanismos da própria célula parasitada para tradução das proteínas virais as quais serão transportadas até a membrana plasmática celular, que se modificará devido ao pareamento nucleocapsídeo, culminando assim na liberação de novos virions (PEEPLES, 1988).

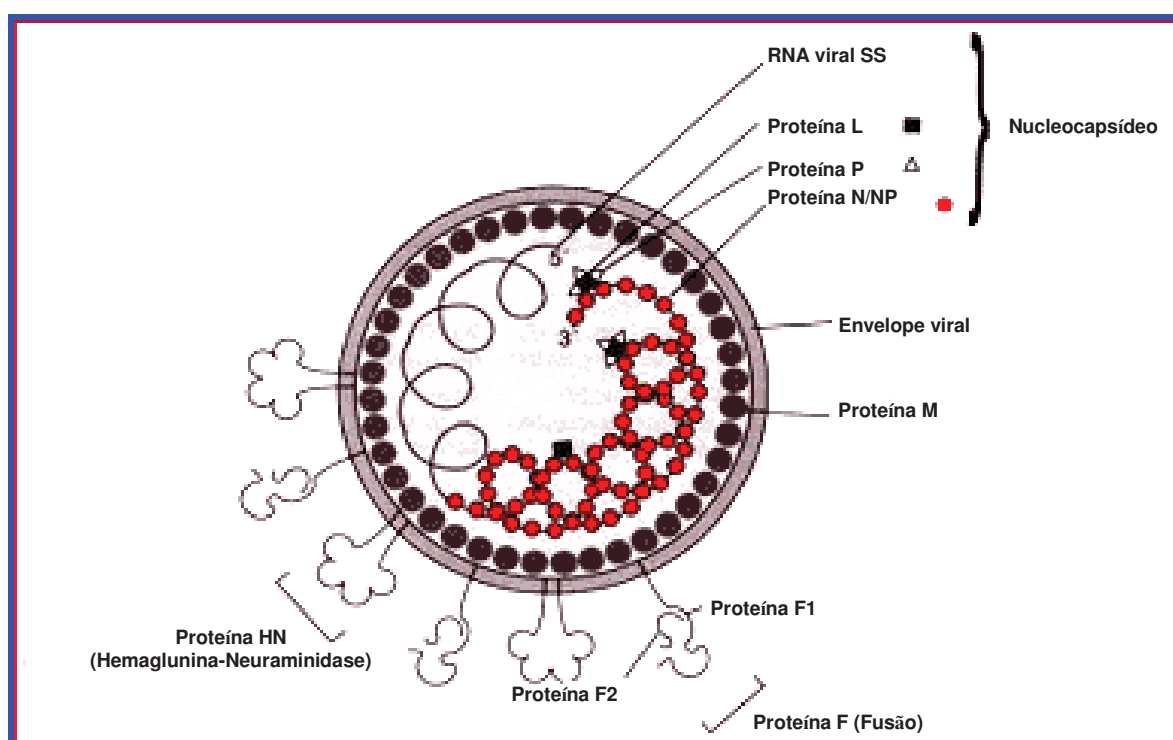


Figura 1. Esquema da organização estrutural das proteínas do vírus da doença de Newcastle. Estão destacadas as seis proteínas estruturais principais: a proteína de nucleocapsídeo (NP); a fosfoproteína (P); a grande proteína (L); a proteína de matriz (M); a glicoproteína hemaglutinina e neuraminidase (HN) e a glicoproteína de fusão (F).

Disponível em: <http://fundacionannavazquez.wordpress.com/category/cancer-en-general/>

A glicoproteína F é sintetizada em uma forma precursora, a F0, e só tem capacidade de fusão após a clivagem em dois polipeptídios, F1 e F2. Entretanto, além da clivagem de F0, ainda é fundamental a ação de HN para que ocorra a fusão (LEEuw & PEETERS, 1999; MERZ et al., 1981). A proteína HN desempenha papel importante na infecção viral. Esta proteína é responsável pelo reconhecimento dos receptores que contêm ácido siálico na superfície das células alvos; pela promoção do

mecanismo de fusão mediado pela proteína F, o qual possibilita a penetração do vírus e também pela remoção do ácido siálico das novas partículas virais, evitando que ocorra a auto-aglutinação do vírus. A demonstração dessa dependência confirmou a hipótese de que a virulência do vírus da Newcastle é multigênica (HUANG et al., 2004).

Ainda no que diz respeito a replicação do VDN, DOMINGO (2002) demonstrou que devido a baixa fidelidade da enzima polimerase (transcriptase), há certamente a possibilidade de formação novos genomas e novos virions, relacionados, porém distintos, caracterizando o que se denomina *quasispecies*. O conjunto de múltiplos genomas gerados na condição de *quasispecies* está relacionado com a sobrevivência e a evolução dos RNA vírus, caracterizada pela concomitância da ocorrência de mutações e maior adaptabilidade viral às pressões seletivas, especialmente do sistema imune do hospedeiro, gerando assim variação no genoma viral, por mutação espontânea ou por mecanismo de fuga da resposta imune (PERALES et al. , 2005; SNOECK, 2008).

HANSON & BRANDLY (1955), inicialmente, classificaram as estirpes do VDN, em função do tempo de mortalidade dos embriões inoculados com essas estirpes, como lentogênicas, mesogênicas e velogênicas. Atualmente, as amostras do VDN têm sido agrupadas por meio de fatores como virulência e manifestação clínica da doença, em cinco patótipos: velogênico viscerotrópico, velogênico neurotrópico, mesogênico, lentogênico ou vacinal, e entérico assintomático (BEARD & HANSON, 1984).

Assim, estirpes virais lentogênicas ou vacinais são de baixa virulência e causam infecções respiratórias ou entéricas brandas; as entéricas assintomáticas consistem de estirpes que causam infecção entérica subclínica, enquanto que estirpes de virulência intermediária causam primariamente doença de sinais respiratórios e, ocasionalmente, sintomatologia nervosa, mas com baixa mortalidade, sendo classificadas como mesogênicas. As estirpes virulentas, por sua vez, provocam alta mortalidade e são classificadas como velogênicas, sendo ainda divididas em neurotrópicas e viscerotrópicas, com base nas manifestações clínicas e patológicas que induzem nas aves (ALEXANDER, 2003; OIE, 2008).

A classificação desses patótipos raramente é observada no campo, uma vez que essas descrições referem-se ao que é observado em aves SPF inoculadas com os respectivos patótipos. Ainda no campo, sinais clínicos observados em aves infectadas com estirpes lentogênicas, foi verificado que eles podem ser confundidos com infecções por outros microrganismos ou quando em condições adversas ambientais estão presentes (ALEXANDER, 2009).

Na verdade, foi relatado que os sinais clínicos em aves infectadas com o VDN variam amplamente e são dependentes de fatores, tais como patótipo viral, espécie hospedeira, idade das aves, infecções intercorrentes com outros microrganismos, estresse ambiental e competência imunológica do hospedeiro (BACK, 2004). Em algumas circunstâncias, infecções com vírus extremamente virulento em frangos podem possuir uma morbidade próxima de 100% e resultar em alta mortalidade, de até 90%, em aves sensíveis (BEARD, 2008). Ainda que os sinais clínicos não sejam considerados patognomônicos da DN, os sinais nervosos e/ou entéricos podem estar associados a estirpes velogênicas (BEARD & HANSON, 1984).

Caso a DN não seja endêmica em uma determinada área, os sinais clínicos e as lesões podem ser altamente significativos (ALEXANDER et al., 2004). Os sinais clínicos típicos são: estado de prostração e depressão com penas eriçadas, diarreia branco-esverdeada, e nas sobreviventes, a cabeça girada para um lado (torcicolo), paralisia dos membros pélvicos e/ou torácicos ou outros sinais neurológicos. Outras características típicas da doença incluem rápida propagação, morte em período de dois a três dias, mortalidade superior a 50%, e um período de incubação de dois a cinco dias, ou, em ocasiões raras, de dois a 15 dias. Na necropsia, os achados mais comuns são muco na traquéia, hemorragias no intestino e no proventrículo (BEARD & HANSON, 1984; NISHIZAWA, 2007).

Deve-se destacar que a maioria dos sinais clínicos descritos para a doença de Newcastle são muito parecidos ou idênticos a outras enfermidades infecciosas, como bronquite infecciosa, laringotraqueíte, coriza infecciosa, doença crônica respiratória, dentre outras que causam, principalmente, sintomas digestivos e respiratórios, indistinguíveis da Doença de Newcastle. Portanto, sinais clínicos isolados não

apresentam uma base confiável para o diagnóstico da doença (JORGE et al, 2002; ALEXANDER, 2009).

A infecção de algumas espécies de aves silvestres com estirpes mais virulentas do VDN pode não mostrar qualquer sinal clínico, porém essa espécie animal pode difundir o vírus da Doença de Newcastle para plantéis susceptíveis (SICK, 2001). A cura da DN, que é rara nas aves que sofreram distúrbios neurológicos graves, é acompanhada por sequelas, como crescimento retardado, queda de postura, ou ainda, com alterações nos ovos e com baixa de eclodibilidade (CORREA, 1970).

O período de incubação do VDN pode ser de até 15 dias pós infecção, entretanto a média é de cinco dias. Em galinhas susceptíveis, o surto pode ser extremamente severo e, nesse caso, 100% das aves afetadas podem morrer em até 72 horas sem apresentar qualquer sinal clínico. Pombos podem apresentar mortalidade de até 80%, enquanto que canários geralmente apresentam doença branda com baixa mortalidade. A perdiz não apresenta sinais clínicos, nem mortalidade, quando infectada experimentalmente com vírus patogênico. Entretanto, esta espécie, quando infectada experimentalmente, foi capaz de difundir o vírus da Doença de Newcastle para galinhas SPF. Psitacídeos podem desenvolver uma infecção crônica renal com potencial de eliminação de partículas virais por longo período (SICK, 2001; ALEXANDER, 2009).

O aparecimento da doença em uma criação, geralmente, verifica-se após cinco dias, em média, a partir da introdução do vírus. A mortalidade entre pintos vai de 10% a 50% nos casos crônicos e a quase 100% nos casos de infecção com estirpes de virulência alta (MALAVAZZI, 1999).

2.3 Epidemiologia

A DN é considerada uma doença de distribuição mundial, com áreas endêmicas e/ou áreas/países considerados livres da doença. O VDN possui a capacidade de se difundir por todo o mundo por meio de aves susceptíveis, pessoas, equipamentos, ar, ração e até por espécies não aviárias, entre as quais, pequenos roedores, insetos e artrópodes, que transitam entre as aves infectadas e as não infectadas susceptíveis

(LANCASTER, 1964; LANCASTER & ALEXANDER, 1975; ALEXANDER, 1991; ALEXANDER, 1997). Durante o curso da infecção por uma estirpe velogênica do VDN, a maioria das aves excretam grandes quantidades de vírus nas fezes, que se constituem no principal meio de disseminação do VDN entre as aves (NISHIZAWA et al., 2007).

No final do ano de 1960, uma panzootia de DN atingiu vários países no Oriente Médio, provavelmente devido ao intenso comércio de espécies de psitacídeos oriundos principalmente da América do Sul, da América Central e do Sudeste da Ásia, transportados por aviões até foi, consideravelmente, mais forte do que a primeira, atingindo todos os continentes e muitos países até o ano de 1973. Essa rápida difusão estava associada ao intenso comércio, por via aérea, de espécies de psitacídeos importados das Américas do Sul e Central e do Sudeste asiático (ALEXANDER, 1988). Uma terceira panzootia emergiu inicialmente do Oriente Médio, em 1970, onde a principal forma de difusão deu-se através da exposição, competição e comercialização de pombos e a sua presença foi confirmada em mais de vinte países, incluindo aqueles da Europa, do Canadá, dos EUA, de Hong Kong e do Sudão. Em alguns países, a doença acometeu outras aves silvestres, inclusive a avicultura comercial sob a forma de doença neurotrópica. (McNULTY et al., 1988).

Na Inglaterra, em 1984, uma amostra viral isolada de pombos foi responsável por vinte surtos da doença em frangos de corte, como resultado da ingestão de ração contaminada com VDN, o mesmo também ocorreu com um lote de faisões (ALEXANDER, 1988; ALEXANDER et al., 1984). A DN infecta mais de 241 espécies de aves domésticas e silvestres, compreendendo 27 das 50 ordens existentes da classe *Avis*, (KALETA & BALDAUF, 1988). São também infectadas várias espécies de répteis, principalmente serpentes, mamíferos como cães e gatos, (WHITE & JORDAN, 1963; MALAVAZZI, 1999) e seres humanos também são susceptíveis ao agente etiológico (BEARD & HANSON, 1984; HERNANDEZ et al., 1987).

Além disso, as aves silvestres são consideradas reservatório natural de estirpes do VDN, com capacidade de causar a doença e podem estar envolvidas nos surtos que ocorrem em aves domésticas (CAMENISCH et al., 2008). A alta densidade populacional

e a localização de plantéis em áreas de concentração de aves silvestres ou ainda, próximo a rotas de aves migratórias ou mesmo o tráfico de animais silvestres têm sido responsáveis pelo aumento significativo da DN (VERWOERD, 2000; SEAL et al., 1998; CLAVIJO et al., 2000).

No Brasil, há registros de detecção de anticorpos específicos e de isolamento do VDN em aves silvestres no estado do Rio de Janeiro e de Pernambuco, sendo que essas espécies de aves foram consideradas reservatórios desse vírus para as aves de produção comercial (OLIVEIRO JUNIOR et al., 2003; SILVA et al., 2006). Além disso, em outro estudo no município de Galinhos, estado do Rio Grande do Norte, foi detectada presença de estirpes do VDN de baixa patogenicidade do VDN em suabes cloacais de aves migratórias (ARAÚJO et al., 2004).

As principais vias de transmissão do VDN em criação de aves domésticas ocorrem por aerossóis provenientes de aves infectadas diretamente ou indiretamente através do contato com produtos contaminados por esses aerossóis. Quanto à infecção de seres humanos pelo VDN a transmissão ocorre a partir do contato com aves infectadas.

No Brasil não há relatos de infecção pelo o VDN em humanos, porém trabalhos relatam que vírus vacinais ou de campo podem infectar o homem e manifestar sinais clínicos como: cefaléia, lacrimejamento, edema de pálpebra e conseqüentemente conjuntivite (HERNÁNDEZ, 1987; BEARD E HANSON, 1984),

O VDN é capaz de sobreviver no meio ambiente, água e matéria orgânica, dependendo das condições de temperatura e umidade, por um longo período de tempo e quase indefinidamente em materiais congelados. As vias de eliminação do vírus se dá através de secreções exsudativas do trato respiratório e das fezes (ALEXANDER, 2003).

A transmissão do vírus através dos ovos é excepcional, pois ocorre a mortalidade embrionária, e poucos são os embriões infectados que alcançam a eclosão. Entretanto, esses poucos pintos que saem dos incubatórios constituem um importante fator na disseminação da doença (CORREA, 1970).

As vias naturais de infecção são essencialmente o aparelho respiratório e o tubo digestório; contudo, as mucosas conjuntival e cloacal também funcionam como vias de infecção (ALEXANDER, 2003).

2.4. Medidas de controle

Aliada às medidas de biossegurança que as granjas devem possuir, a vacinação é o instrumento mais eficiente no controle e prevenção da Doença de Newcastle (ALEXANDER, 2009). Usualmente, para aves de corte, recomenda-se uma vacinação na água de beber aos 10 a 12 dias e uma revacinação aos 30 a 35 dias de idade. Já no caso das galinhas poedeiras, além destas duas vacinações citadas, há necessidade de que se vacinem aos 90 ou 120 dias, através de via intramuscular profunda, no peito (MALAVAZZI, 1999).

No Brasil, até recentemente, os esforços para a profilaxia da DN estavam orientados para a imunização ativa, mediante o emprego convencional de vacinas vivas de caráter lentogênico, sendo empregadas, sobretudo as estirpes B1 e LaSota. No entanto, algumas estirpes vacinais não são indicadas para aves de um dia. Outras não são apropriadas para serem administradas pela via spray. Alternativamente, para a primeira vacinação, as estirpes B1, Ulster ou VG-GA, que são mais atenuadas, podem ser utilizadas. Por outro lado, a estirpe LaSota, por ser menos atenuada, deve ser utilizada para a segunda vacinação (JORGE et al., 2002; NUNES et al., 2002).

No geral, o calendário vacinal deve ser regulamentado e planejado pelo plano nacional de defesa sanitária de cada país. A avaliação de fatores como a presença da imunidade passiva; estado imune; via de aplicação; estado nutricional; tamanho dos lotes; presença ou não de outros agentes patogênicos; condições de instalação e clima; histórico e custo da vacina é inevitável para desenvolvimento do programa vacinal (ALEXANDER, 2009).

Em áreas onde não se utilizam programas de vacinação, e/ou, em área onde a DN está erradicada, os testes sorológicos podem ser utilizados como meio de

diagnóstico e prevenção. Porém, os resultados positivos podem não indicar a doença, mas sim, infecção com o vírus (THAYLER, 1986).

A redução gradual na ocorrência da enfermidade é devido a controles intensivos na criação comercial, por meio de programas de vacinação eficientes e além dos esforços do governo federal, através do PNSA. Entretanto, a DN continua endêmica no Brasil, bem como no restante da América do Sul (SEAL et al., 1998; CLAVIJO et al., 2000). A avaliação da resposta imune humoral é considerada um dos fatores mais importantes para monitoramento de programas vacinais para DN. BRETANO et al., (2000) afirmaram que o levantamento sorológico é de extrema importância na avaliação das condições sanitárias de plantéis, definindo a eficácia de programas de vacinação e a real situação do vírus no ambiente.

O Departamento de Saúde Animal (DSA) do MAPA tem desenvolvido ações para evitar o ingresso de doenças no Brasil. A introdução do VDN pode ocorrer por: trânsito de passageiros; importação de aves e material genético; produtos biológicos; lixo de bordo de aviões e navios; correspondência postal, além da transmissão por aves migratórias. O MAPA realiza vigilância sanitária sobre o material genético no ponto de ingresso (portos, aeroportos e fronteiras), bem como controle de importação de aves destinadas a reposição genética e vigilância ativa para IA e DN, em aves migratórias, plantéis avícolas comerciais e de subsistência. (BRASIL, 2007).

A vacinação e melhoria das condições zootécnicas, para criadores de aves caipiras, o isolamento sanitária de criações industriais das aves de vida livre e a vigilância sorológica constante poderiam contribuir para redução do problema (OLIVEIRA JUNIOR et al., 2005).

2.5. Diagnóstico Laboratorial

A DN é uma doença enquadrada na O.I.E. sendo de notificação compulsória. O laboratório de referência para diagnóstico do VDN é o Laboratório Nacional Agropecuário (LANAGRO), que é uma unidade do MAPA localizada em Campinas, São Paulo. A confirmação deve ser feita pelo isolamento e identificação do agente viral e

através de testes de patogenicidade como: Índice de Patogenicidade Intracerebral (IPIC), Índice de Patogenicidade Intravenosa (IPIV) e o Tempo Médio de morte Embrionária (TMME) (BRASIL, 2007). Reações sorológicas positivas servem para fazer o imunodiagnóstico e ainda detectam casos subclínicos da infecção por este vírus (THAYER, 1986)

Os sinais clínicos e as lesões causadas pela infecção não são caracterizados como patognomônicos para a DN, só o diagnóstico laboratorial é confirmatório. O isolamento e identificação viral são considerados o método de diagnóstico definitivo (ALEXANDER, 2003).

O isolamento viral é realizado em ovos embrionados livres de agentes infecciosos específicos – SPF com 9 a 11 dias de incubação, através da inoculação da amostra na cavidade córion-alantóide. O líquido córion-alantóide é colhido a partir de 48 hs. ou após a morte dos embriões, sendo armazenado e depois analisado pelo teste de hemaglutinação (HA). Com resultado positivo prossegue-se com o HI, positivo nesse teste também, realizar a técnica de neutralização viral e teste caracterização de patogenicidade, através de inoculação em ovos embrionados e aves (ALEXANDER, 2003; OIE, 2008).

Um outro meio de diagnóstico é a detecção e identificação do VDN por técnicas moleculares. Nesse sentido, ensaios para a detecção do genoma de VDN têm sido descritos na literatura como a hibridização de ácidos nucleicos, análise de RNA genômico viral, sendo empregados vários tipos de RT-PCR, tais como a PCR convencional e a PCR em tempo real, que podem ser seguidas pelas análises como a RFLP e o sequenciamento (GOHM et al., 2000; ALDOUS et al., 2001; KANT et al., 1997; PHAM et al., 2004; PHAM et al., 2005, YUSOFF & TAN, 2001).

As técnicas moleculares de diagnóstico têm despontado como uma alternativa interessante em comparação à metodologia convencional de caracterização viral, oferecendo vantagens em relação ao tempo de execução e ao custo (VIANNA et al., 2000). No capítulo da DN, do manual da O.I.E a partir de 2000 a técnica de PCR passou a ser aceita e considerada padrão para diagnóstico da DN, através da avaliação

da sequência de nucleotídeos codificadora da sequência de aminoácidos presentes na região de clivagem da proteína F0 do VDN (CREELAN et al., 2002).

Uma ampla variedade de testes sorológicos foi desenvolvida para detectar anticorpos contra o VDN, entre eles a imunodifusão radial, hemólise radial, neutralização em placa e inibição da hemaglutinação - HI (ALEXANDER & MANVELL, 2002). e mais recentemente os ensaios imunoenzimático em fase sólida – ELISA “Enzyme-Linked Immunosorbent Assay” (RICHTZENHAIN et al., 1993; CZIFRA et al., 1996; SOUSA et al., 1999; SILVA et al., 2009).

O teste de HI, entretanto, é tradicionalmente utilizado como prova padrão na detecção de anticorpos contra este vírus em aves (SOUSA et al., 1999), sendo muito utilizada no controle de diversas enfermidades aviárias, incluindo a DN, para a qual se revelou específico (THAYER, 1986; ALEXANDER, 1991). No entanto, o teste de HI tem valor limitado para detecção de anticorpos devido a sua baixa sensibilidade e reatividade cruzada de subtipos (THAYER, 1986; ROWE et al., 1999; PIEIRIS et al., 2007; PRABAKARAM et al., 2009). LU et al (1982) mostraram que o teste HI utilizando a subunidade HA do vírus influenza em substituição ao vírus inteiro pode detectar anticorpos para o vírus H2N2 aviário. Outros investigadores mostraram que o teste HI pode ter a sensibilidade aumentada com o uso da subunidade HA ao invés do vírus inteiro (ROWE et al., 1999).

Além desses testes sorológicos, o ELISA, através do método indireto, tem sido muito usado no lugar do teste de HI, para o monitoramento e estudos de soroprevalência da DN, principalmente devido a possibilidade no processamento de um grande número de amostras de soro (RICHTZENHAIN et al., 1993; SOUSA et al., 1999; YUSOFF & TAN, 2001; SILVA et al., 2009). Ainda a respeito do ELISA, é o teste sorológico mais utilizado na avicultura para outros agentes etiológicos por sua maior sensibilidade, especificidade, rapidez e maior facilidade de padronização (THAYER, 1986).

Nesse sentido, verifica-se que ensaios de ELISA com base no método indireto têm sido rotineiramente usados para a detecção de anticorpos contra o VDN. No entanto, nesse método, as microplacas de ELISA são adsorvidas com os antígenos virais

purificados ou semi-purificados, os quais requerem a propagação desses agentes em sistemas convencionais tais como ovos embrionados livres de patógenos específicos (SPF) ou em culturas celulares e em grandes volumes, adicionado, ainda, da necessidade de serem usados processos bastante complexos de purificação viral por técnicas de ultra-centrifugação em gradiente de sacarose (WILSON et al., 1984; RIVETZ et al., 1985; MIERS et al., 1994). Tudo isso, resulta em processos complexos e onerosos para a preparação das microplacas de ELISA

A nucleoproteína (NP) do VDN é composta de 489 aminoácidos com peso molecular de 53 kD, responsável pela regulação da transcrição e replicação do genoma viral, através de interação com a proteína P (PHAM et al., 2004; MEBATSION et al., 2002). A NP possui regiões que são altamente conservadas e bastante imunogênicas em todas as estirpes do VDN, podendo ser empregada com vantagens relevantes no imunodiagnóstico desse vírus (ERRINGTON et al., 1995; MAKKAY et al., 1998). PHAM et al., fizeram uma comparação com 15 estirpes do VDN, entre elas vacinais, mesogênicas e velogênicas e identificaram uma homologia de 89,9% a 96,1% com análise do gene NP, ainda nesse trabalho identificaram uma maior conservação da sequência de aminoácidos na porção N-terminal em contraste com a porção C-terminal. Portanto, a proteína NP possui atributos para ser um candidato em potencial a ser usado com vantagens como alvo antigênico em ensaios imunoenzimáticos, como o ELISA, para serem aplicados no imunodiagnóstico de aves infectadas e/ou vacinadas a campo com diferentes estirpes do VDN.

Dentre os procedimentos de clonagem e expressão de gene da proteína NP do VDN, constata-se que existem várias abordagens que já foram exploradas, quer seja com o uso de sistemas de hospedeiros procariotos, como a *E. coli* (KHO et al., 2001), ou eucariotos, culturas de células transfectadas com vetores constituídos por baculovírus (ERRINGTON et al., 1995; MAKKAY et al., 1998). No entanto para a proteína N do VDN, embora a *E. coli* tenha sido usada para a expressão da forma recombinante dessa proteína, ela foi somente usada para estudos estruturais desse vírus, não tendo sido empregada como preparação antigênica de testes sorológicos.

Ainda, com respeito à utilização de proteínas de nucleocapsídeo (proteínas N), sabe-se também que várias preparações recombinantes desse tipo de antígeno estrutural derivadas do vírus da caxumba, vírus da raiva, vírus da estomatite vesicular, vírus da bronquite infecciosa e do próprio VDN, já foram usadas de forma bem sucedida para serem adsorvidas à superfície das cavidades de microplacas em diferentes ensaios imunoenzimáticos (LINDE et al., 1987; REID-SANDEN et al., 1990; HUMMEL et al., 1992; AHMAD et al., 1993; NDIFUNA et al., 1998; ERRINGTON et al., 1995; MAKKAY et al., 1998; CHEN et al., 2003 ; LOA et al., 2004 ; GIBERTONI et al., 2005 GIBERTONI et al., 2009; KHO et al., 2001).

As bactérias da espécie de *Escherichia coli* são os organismos hospedeiros mais comumente usados para a produção de uma variedade de proteínas recombinantes heterólogas. Essas células oferecem um conjunto considerável de vantagens em relação a outros sistemas de clonagem e expressão gênica, entre as vantagens se destacam sua maior simplicidade de manuseio, exigência para meios de crescimento relativamente mais simples e a grande capacidade de produção desses microorganismos. Outra importante vantagem é o processo de extração e purificação da proteína recombinante, demonstrando-se menos complexo. Atualmente são utilizadas comercialmente na produção de diversas proteínas, inclusive as de interesse terapêutico, tais como: a insulina, hormônio do crescimento humano entre outros com altos níveis de expressão gênica (WALSH, 1998).

Muitos são os estudos visando melhorar a sensibilidade e especificidade dos testes de diagnóstico da DN. As técnicas de clonagem e expressão de proteínas recombinantes permitem caracterizar e produzir antígenos em larga escala, buscando o desenvolvimento de testes de diagnóstico específicos e ainda possibilitando a produção de vacinas. Ainda nesse sentido, vetor Champion™ pET SUMO “Protein Expression System” (Invitrogen) que permite a clonagem e a expressão da proteína de interesse em *E. coli*, fusionada à proteína SUMO, que incrementa a expressão da proteína recombinante e aumenta a solubilidade de proteínas parcialmente insolúveis. Além disso, a estrutura terciária da partícula SUMO é reconhecida de forma específica e clivada pela enzima SUMO protease. Quando essa partícula está fusionada ao N-

terminal da proteína de interesse, na presença da SUMO protease, ocorre a clivagem dessa partícula, resultando na liberação da proteína.

Em vista de tudo o que foi descrito anteriormente e, sobretudo, da importância do agente etiológico e dos meios de diagnóstico da infecção por ele causada, podem se constituir em alternativas interessantes e eficientes para a geração de um importante antígeno, como é a proteína NP do VDN, com o objetivo principal de clonar e expressar o gene codificador dessa proteína em um sistema procarioto de expressão, constituído pela bactéria *Escherichia coli*, utilizando vetor Champion™ pET SUMO “Protein Expression System” (Invitrogen) de forma que as proteínas recombinantes obtidas, possam, depois de caracterizadas imunoquimicamente, ser utilizadas como antígeno em testes imuno-enzimáticos para serem empregadas ou no imunodiagnóstico da DN, ou no monitoramento da imunidade humoral pós-vacinal contra o VDN.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Contribuir com o aprimoramento do imunodiagnóstico e do controle da DN por meio da clonagem e expressão da proteína de nucleocapsídeo da estirpe LaSota do VDN em um sistema heterólogo de expressão constituído pelo vetor pET SUMO e as células hospedeiras procariotas da bactéria *Escherichia coli*, partindo-se do produto amplificado de toda a seqüência do gene codificador da nucleoproteína (NP) do VDN, a fim de que a proteína recombinante obtida seja utilizada como antígeno nas reações sorológicas recomendadas pelos organismos de referência para o imuno-diagnóstico desta doença.

3.2. Objetivos Específicos

1. Obter o DNAC do gene da proteína completa NP do VDN.
2. Clonar o DNAC do gene da proteína completa NP do VDN no vetor específico de clonagem e expressão para *E. coli*.
3. Transformar células hospedeiras procarióticas com o vetor contendo o gene da proteína NP.
4. Confirmar a obtenção de células hospedeiras transformadas contendo o gene da proteína NP do VDN.
5. Induzir a expressão e purificar a proteína recombinante NP produzida.
6. Caracterizar imunoquimicamente a proteína recombinante NP produzida.
7. Aplicar a proteína NP recombinante no imunodiagnóstico.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Propagação e titulação da infectividade viral

A amostra da estirpe vacinal La Sota do vírus da Doença de Newcastle (VDN) foi propagada na cavidade alantóide de ovos embrionados SPF ("specific pathogen free") com nove a onze dias de incubação através da inoculação inicial de 0,1 mL de vacina viva contra a DN. Após 24 horas de incubação a 37,5°C realizou-se exame de ovoscopia para a identificação e retirada de embriões mortos em decorrência de causas inespecíficas. Decorridas 40 horas de incubação e prévio resfriamento a 4°C, por 18 horas, a suspensão de líquido córion-alantóide infectado (LCAi) foi colhida e imediatamente centrifugada a 3000xg a 4 °C por 30 min, para a clarificação da suspensão viral. O título hemaglutinante dessa suspensão foi avaliado pelo teste de hemaglutinação (HA) (SOUSA et AL., 2000). O volume total obtido de LCAi foi armazenado a -70°C.

4.2. Oligonucleotídeos iniciadores

Foram construídos oligonucleotídeos iniciadores específicos, conforme descrito no quadro 1, de maneira a incluir toda a "open reading frame" do gene da NP do VDN, tomando-se como base a sequência de nucleotídeos desse mesmo gene da estirpe LaSota disponível no GeneBank sob o nº AY 845400 e utilizando-se o programa computacional para construção de oligonucleotídeos iniciadores denominado "Gene Runner" (versão 3.05).

Quadro 1. Descrição dos iniciadores utilizados na PCR para obtenção do gene da proteína NP do VDN.

Iniciadores	Sequência 5`- 3`	Posição no genoma (pb)
N+	5`- ATG TCT TCC GTA TTT GAT GAG-3`	122-143
N-	5`- TCA ATA CCC CCA GTC GGT-3`	1573-1591

4.3. Extração do RNA viral

O procedimento de extração do RNA viral foi realizada, a partir do líquido córion-alantóide infectado (LCAi) com estirpe La Sota com o auxílio do kit comercial Trizol LS Reagent (Invitrogen), seguindo-se as recomendações do fabricante, com algumas adaptações, abaixo explanadas.

A extração foi feita a partir de 500 µL de LCA infectado com a estirpe La Sota, adicionando-se 500 µL de Trizol LS Reagent (Invitrogen) e mais 100 µL de uma mistura de clorofórmio e álcool isoamílico, na proporção 24:1. Em seguida, a mistura foi homogeneizada com ajuda do vórtex e deixada em repouso em banho de gelo por 5 minutos e ao final desse passo, foram centrifugadas em 12 000 xg por 15 minutos a 4°C. A fase líquida, em volume de aproximadamente 500 µL, foi transferida para outro microtubo de 1,5 mL, onde se adicionou o mesmo volume de álcool isopropílico (500 µL). Essa mistura foi agitada, delicadamente, por inversão e depois deixada por 20 minutos a -70°C (precipitação do RNA).

No passo seguinte, centrifugou-se a 12 000 xg por 15 minutos a 4°C. Ao final dessa etapa, descartou-se o sobrenadante (álcool isopropílico) e adicionou-se 1 mL de etanol 75%, homogeneizando-se manualmente, e em seguida, as amostras foram centrifugadas a 7.500 xg por 5 minutos a temperatura de 4° C, descartando-se, ao final o sobrenadante. As amostras foram colocadas para secar a temperatura ambiente e ressuspensas em 12 µL de água ultra pura tratada com DEPC (dietil pirocarbonato 0,1% p/v) e mais 1 µL de inibidor de ribonuclease, por reação.

4.4. Amplificação do gene da proteína NP do VDN pela técnica de RT-PCR

A reação de transcrição reversa (RT) para obtenção do cDNA a partir do RNA genômico viral extraído conforme a descrição anterior, foi realizada, incubando-se, inicialmente, a 25⁰C por 10 min, a mistura inicial de reação, a qual foi constituída por dNTP (0,2mM), “Randon Primers” (0,15ug/L), 5μl da amostra de RNA viral extraído de LCAi e água tratada com DEPC (0,1%) em quantidade suficiente para completar um volume de 12μL. Em seguida, foi acrescentado 4μl do tampão 5x da enzima transcriptase reversa [Tris-HCl (50mM, pH 8,3), HCl (75mM), MgCl₂ (3mM) , 10mM DTT e incubada a reação a 42⁰C por 2 minutos, e depois adicionada 200U da enzima transcriptase reversa (Superscript / Invitrogen). A reação foi então incubada a 42⁰C por 1 hora e, no final, a 70⁰C por 10 min em termociclador MJ RESEARCH®.

4.5. Reação em cadeia da polimerase (PCR)

Para a amplificação de toda a região codificadora do gene da nucleoproteína do VDN, foi realizada a PCR para um volume final de 50μl. Para tanto, foram utilizados 0,2mM de dNTPs , 5 μL de tampão de PCR (10X), 20pmol de cada um dos oligonucleotídeos iniciadores, 1,5 mM de MgCl₂, 2,0 U da enzima Taq DNA polimerase (Invitrogen), completando-se o volume (q.s.p) com água tratada com DEPC e adicionando-se 5 μL de cDNA viral obtido na RT. As temperaturas e os passos da PCR foram previamente otimizados, em função, principalmente, das características físico-químicos dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados e utilizando-se um gradiente de temperaturas de anelamento. O programa que apresentou o melhor desempenho, foi aquele que foi constituído por um primeiro ciclo de 95⁰C por 5 min, seguindo para outros 35 ciclos, cada um constituído por três passos; 94⁰C por 1 min, para desnaturação da dupla hélice do cDNA, 57,5⁰C por 1 min e 30 seg, para o anelamento dos oligonucleotídeos iniciadores e 72⁰C por 2 min e 30 seg de extensão e a 72⁰C por 10 min de extensão final, em termociclador MJ RESEARCH®.

4.6. Análise eletroforética em gel de agarose dos produtos amplificados do gene NP da estirpe LaSota do VDN

A análise do gene da NP amplificado na PCR foi realizada através da eletroforese em cuba horizontal, em gel de agarose (1,0%) imerso em tampão TBE 0,5x Tris-Borato (0,045M), EDTA (1mM) e submetido a uma voltagem adequada às dimensões do gel (1 a 10V/cm).

A visualização dos produtos amplificados no gel de agarose foi realizada através da transiluminação do gel em luz ultravioleta, após corar em solução de brometo de etídeo (0,5µg/mL).

O produto do DNA alvo amplificado foi purificado através da utilização do kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-up System (Promega), de acordo com as especificações do fabricante.

4.7. Purificação do produto amplificado do gene NP da estirpe LaSota do VDN

O produto do DNA alvo amplificado foi purificado através da utilização do o kit comercial Wizard PCR[®] Gel and PCR clean-up Systems (Promega) seguido das recomendações do fabricante. A quantificação do DNA foi feita em gel de agarose com marcador de quantidades de DNA Low DNA Mass Ladder (Invitrogen) e também com o auxílio de leitura em espectrofotômetro, nos comprimentos de onda de 260 e 280 nm.

4.8. Metodologia para a clonagem e expressão da Proteína NP do VDN em *E. coli*

4.8.1. Vetor de clonagem do produto da RT- PCR

Para a clonagem e expressão do gene da nucleoproteína N do VDN em *E. coli* foi utilizado o vetor Champion™ pET SUMO “Protein Expression System” (Invitrogen), seguindo, em linhas gerais, as indicações do manual do fabricante (Figura 2). Esse

permite a clonagem e a expressão de uma proteína de interesse, fusionada à proteína SUMO, que incrementa a expressão da proteína recombinante e aumenta a solubilidade de proteínas parcialmente insolúveis. Além disso, a estrutura terciária do peptídeo SUMO é reconhecida de forma específica e clivada pela enzima SUMO protease. Quando essa partícula está fusionada ao N-terminal da proteína de interesse, na presença da SUMO protease, ocorre a clivagem dessa partícula, resultando na produção da proteína nativa.

A proteína SUMO é originária da *Saccharomyces cerevisiae*, que faz parte da família de proteínas “ubiquitina-like” responsável por regular vários processos celulares. No vetor pET SUMO, a expressão do gene de interesse é controlada por um promotor bacteriófago T7 forte que foi modificado para conter um “*lac operator*”. Para a expressão do gene, é necessário o suprimento com T7 RNA polimerase para as células, que é fornecida pela *E. coli* que, quando em quantidade suficiente, liga-se ao promotor T7 e transcreve o gene de interesse (STUDIER et al., 1990)



Figura. 2. Mapa do vetor de clonagem e expressão pET SUMO (Invitrogen).

Características do vetor pET SUMO

5643 pares de bases

Promotor T7: bases 209-225

Lac operator (*lacO*): bases 228-252

Sítio de ligação do ribossomo (RBS): bases 282-288

ATG iniciador: bases 297-299

Epítipo HisG: bases 309-329

ORF SUMO: bases 360-653

Sítio para o oligo SUMO forward: bases 549-571

Sítio de clonagem TA: bases 653-654

Sítio para o oligo T7 reverse: bases 783-802 (c)

Terminador T7: bases 744-872

Gene de resistência a kanamicina: bases 1431-2246 (c)

Origem pBR322: bases 2342-3015

ORF *ROP*: bases 3383-3574

ORF *lacI*: bases 4383-5474 (c)

(c) = fita complementar

4.8.2. Transformação de células competentes do vetor pET SUMO One Shot Mach 1 – T1

Em síntese, para a realização desse protocolo, um volume de 50 µL de células competentes de *E. coli* da linhagem one shot mach 1 – T1 foi removida do freezer -70°C e mantida em gelo para descongelamento lento, por 30 minutos em média, em seguida adicionou-se de 2 µL da reação de ligação ao tubo com as células descongeladas, enquanto a mistura de reação de controle (vetor sem inserto), foi adicionado a um outro tubo contendo células competentes da mesma linhagem, seguido de agitação suave e repouso em banho de gelo por 30 minutos.

Decorrido esse tempo, a suspensão de células foi submetida a choque térmico, fazendo-se a transferência do tubo contendo a mistura de reação para um banho Maria a 42°C por 30 segundos e, retornado para o gelo mantendo o assim por dois minutos. Em seguida foram adicionados em a cada tubo 250 µL de meio SOC a temperatura ambiente e incubou-se a mistura sob agitação (150 rpm) a 37°C por uma hora e meia. Após esse breve período de incubação, as células foram semeadas em meio LB sólido (10g de triptona, 10 g de NaCl, 5g de extrato de levedura, 1,5% de ágar bacteriológico, ajustar para pH 7,5 e água destilada q.s.p 1000 ml) com o antibiótico kanamicina a 50µg/mL e incubadas a 37° C durante 16-18 horas. Os clones transformantes que cresceram foram então selecionados e transferidos de forma organizada para a caixa de 96 poços, tipo “cluster”, contendo LB com antibiótico kanamicina a 50µg/mL, para crescimento a 37°C por 16 horas, seguido de estocagem em glicerol a 80% e manutenção -70°C.

4.8.3 Análise dos clones transformantes com o vetor pET SUMO – Gene NP

Cinco clones dos 64 obtidos na transformação de *E. coli* foram submetidos à extração de DNA plasmidial pela técnica de mini-preparação com o kit comercial GeneJET™ Plasmid Miniprep (Fermentas). Em seguida, por meio da realização das técnicas de PCR com combinações 2 a 2 dos oligonucleotídeos iniciadores do inserto do

gene NP e do vetor e por seqüenciamento de nucleotídeos do inserto gênico, dos clones transformantes. A análise da presença do inserto do gene NP foi feita com base no tamanho dos fragmentos amplificados nas PCRs com combinações 2 a 2 de cada um dos dois pares de oligonucleotídeos iniciadores, conforme descrito no quadro 1, específicos para a amplificação do gene da nucleoproteína N ou da seqüências que flanqueiam os sítios de clonagem no vetor pET-SUMO (Invitrogen), conforme descrito no quadro 2, usando-se para comparação um padrão de peso molecular 1kb Plus DNA Ladder (Invitrogen).

Quadro 2. Descrição dos oligonucleotídeos do vetor utilizados na PCR para a avaliação dos clones transformantes provenientes da clonagem do gene da NP do VDN em *E. coli*.

Iniciadores	Sequência 5` - 3`	Posição genoma vetor (bp)
SUMO forward	5`-AGATTCTTGTACGACGGTATTAG-3`	549-571
T7 reverse	5` - TAGTTATTGCTCAGCGGTGG-3`	744-872

Em suma para análise do DNA obtido a partir das mini-preparações e posterior seleção dos clones selecionados a partir da transformação foi feita uma PCR para a obtenção de toda a região codificadora do gene NP do VDN e também do vetor com o intuito de se identificar os clones que continham o inserto gênico. Para tanto, foram utilizados 0,2mM de dNTPs , 5 µL de tampão de PCR (10X), 20pmol de cada um dos oligonucleotídeos iniciadores, 1,5 mM de MgCl₂, 2,0 U da enzima Taq DNA polimerase (Invitrogen), completando-se o volume (q.s.p) com água tratada com DEPC para volume final de 48,5 µL e adicionando-se 1,5 µL de DNA plasmidial obtido na extração dos clones transformantes.

As temperaturas e os passos da PCR foram otimizados, em função das características físico-químicos dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados. Após a avaliação mencionada foi definido um programa ideal de incubação para a PCR, que

ficou constituído por um primeiro ciclo de 95°C por 5 min, seguindo para outros de 35 ciclos, cada um constituído por três passos: 94°C por 1 min, para desnaturação da dupla hélice do DNA plasmidial, 57,5°C por 1 min e 30 seg, para o anelamento dos oligonucleotídeos iniciadores e 72°C por 2 min e 30 seg de extensão, e para extensão final 72°C por 10 min, em termociclador TECHNE PROGENE® (Techne Incorporat, Duxford, CAMBRIDGE, UK). Esse perfil de incubação foi usado apenas para os oligonucleotídeos do gene da nucleoproteína do VDN e para os oligonucleotídeos do vetor foi alterado apenas a temperatura de anelamento de 57,5°C por 1 min e 30 seg para 55°C por 1 min e 30 seg.

4.8.4. Eletroforese em gel de agarose para a identificação dos produtos amplificados a partir do DNA plasmidial dos clones transformantes

A análise do gene N amplificado na PCR foi realizada através da eletroforese em cuba horizontal, em gel de agarose (1,0%) imerso em tampão Tris-Borato (0,045M), EDTA (1mM) e submetido a uma voltagem adequada às dimensões do gel (1 a 10V/cm).

A visualização dos produtos amplificados se deu através da transiluminação do gel em luz ultravioleta, após corá-lo em solução de brometo de etídeo (5µg/mL). As dimensões dos fragmentos foram inferidas com base na comparação feita com o eletroferograma gerado pelo marcador de tamanho de DNA, denominado 1Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen), o qual foi aplicado no gel juntamente com as amostras que foram analisadas, a cada corrida eletroforética. A corrida se deu por cerca de 4 horas com uma voltagem de 60 Volts.

4.8.5. Sequenciamento de nucleotídeos do inserto do gene NP do VDN dos clones bacterianos transformantes

As amostras de DNA obtidas das extrações de cada dos clones bacterianos foram submetidas à reação de seqüenciamento utilizado-se o kit "DNA Sequencing-Big

Dye Terminator Cycle Sequencing Ready ABI Prism” versão 3.0. A sequência de nucleotídeos foi compilada e analisada inicialmente pelo programa BIOEDIT, usando-se o programa Clustal W e comparando a similaridade de cada um dos clones analisados com a estirpe LaSota do VDN, depositada no GenBank citada anteriormente, bem como uma avaliação das sequências de nucleotídeos presentes nas extremidades.

4.9. Expressão do gene NP do VDN em bactérias

Para expressar a nucleoproteína do VDN, foi utilizado o mesmo vetor usado para a clonagem, Champion™ pET SUMO “Protein Expression System”, seguindo, em linhas gerais, as indicações do manual do fabricante.

4.9.1 Preparação de células competentes da bactéria *E. coli* para transformação e expressão da proteína NP recombinante

Para os experimentos de transformação da linhagem de *E. coli* ER2566, foi necessária a obtenção de células competentes conforme descrito por HANAHAN et al.(1983), com a introdução de modificações que seguem detalhadas abaixo.

Foi semeada a linhagem acima identificada da bactéria em placas com meio 2xTY sólido, sem antibiótico e incubada por 16 horas a 37°C. Após o crescimento, foi preparado um pré-inóculo de 10mL das bactérias crescidas anteriormente, e incubado por 16 horas 37°C, sob agitação (250rpm), tendo-se inoculado um outro frasco contendo 100mL de meio 2xTY, 1mL de pré-inóculo o qual foi incubado a 37°C sob agitação e fazendo-se mensurações freqüentes da densidade óptica no comprimento de onda de 600 nm(D.O.₆₀₀), deixando-se prosseguir a incubação até obtenção de D.O.₆₀₀ entre 0,5 e 0,6.

Uma vez alcançado este valor de D.O., a cultura foi transferida para 2 tubos Falcon de 50mL, resfriada em gelo por 10 minutos e centrifugada a 4.000 rpm por 15 minutos a 4°C. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e os tubos mantidos invertidos por alguns minutos para eliminação do restante do sobrenadante.

Decorrido este tempo, a massa de células bacterianas foi ressuspensa em 1/3 do volume inicial do cultivo (33mL) em solução de cloreto de cálcio 100 mM. Os volumes dos dois tubos foram concentrados em um único tubo o qual foi incubado em gelo por 15 minutos e novamente centrifugado a 4000 rpm a 4°C, tendo sido o sobrenadante desprezado.

Em seguida, as células foram ressuspensas em 4 mL de cloreto de cálcio 100mM e 1mL glicerol 80%; sendo então, incubadas em gelo por 15 minutos.

A suspensão de células foi distribuída em alíquotas de 200 µL em tubos de microcentrífuga identificados. Estas alíquotas foram em seguida armazenadas à - 70°C.

4.9.2 Transformação de células competentes da bactéria *E. coli* por choque térmico

O procedimento de transformação bacteriana foi realizado conforme o protocolo descrito pelo manual do vetor pET SUMO (Invitrogen), sendo que para a expressão foi utilizada a linhagem de bactérias ER2566 competente, seguido em linhas gerais o protocolo descrito anteriormente.

Tubos contendo células da linhagem de *E. coli* ER2566 competentes foram removidos do freezer e mantidos em gelo para descongelamento lento, em média por 30 minutos, em seguida adicionou-se um volume contendo 40 ng de DNA plasmidial, extraído do clone identificado com portador do gene NP do VDN, seguindo-se de agitação suave e repouso em banho de gelo por 30 minutos.

Após este tempo, a suspensão de células foi submetida ao choque térmico pela imersão do tubo em banho-maria a 42°C por 60 segundos, transferindo-se novamente para gelo e mantendo-se assim por 2 minutos. Em seguida, foram adicionados a cada tubo 800 µL de meio SOC à temperatura ambiente, seguido de incubação a 37 °C sob agitação a 150 rpm por 1 hora e 30 minutos. Decorrido esse tempo, uma alíquota de 50 µL e 100 µL da cultura respectivamente, foram semeadas em placas contendo meio 2xTY sólido (1,5% de ágar bacteriológico) com 50 µg/mL de kanamicina. As placas foram incubadas em estufa a 37°C por 16 horas. Os clones transformantes foram

selecionados e estas colônias foram transferidas de forma organizada para uma caixa de 96 tubos ("cluster"), contendo meio 2xTY com 50 µg/mL de kanamicina, para crescimento a 37°C, posterior estocagem em glicerol (80%) e manutenção a -70°C.

4.9.3 Indução da expressão da NP recombinante do VDN

Para a indução da expressão da nucleoproteína recombinante os clones transformantes de *E. coli* da linhagem ER2566 foram selecionados e, em seguida, semeados em placas com 2xTY sólido (1,5g de ágar bacteriológico) acrescido de kanamicina 50 µg/mL incubados a 37°C por 16 horas e, em seguida repassadas em 10mL de meio 2xTY com agitação e incubadas 250rpm a 37°C por 16 horas. Após a incubação foi transferido 1mL da cultura em 50mL de meio 2xTY e incubados a 37°C com agitação de 200rpm até atingir DO₆₀₀ entre 0.6-0.8, nesse momento 0,4mM de IPTG ("Isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside) foi adicionado, sendo a cultura incubada a 37°C durante 16h com agitação de 200rpm. Após incubação as células foram centrifugadas 12000rpm por 10 min a temperatura ambiente, o sobrenadante descartado e as células ressuspensas em 3mL de tampão de lise (50 mM fosfato potássio, 400 mM NaCl, 100 mM KCl, 10% glicerol, 0.5% triton X-100, 1 mM de PMSF e 10mM imidazol, pH 7.8). A lise celular foi realizada em sonificador de células (Sonics Vibra Cell, Sonics & Materials, VCX 500), permanecendo 4 ciclos de 30 segundos cada, com os tubos contendo o extrato celular em banho de gelo. Em seguida o material foi centrifugado a 12000rpm por 10 min a 4°C, sendo o sobrenadante guardado para análise imunoquímica a -20 °C, pois o sobrenadante contém as proteínas solúveis, enquanto o sedimento contém as proteínas insolúveis.

Para a expressão da proteína NP recombinante em média escala, 1000µL do pré-inóculo foram adicionados a 500mL de 2xTY 50 µg/ mL de kanamicina e com adição de glicose a 1 %. O protocolo foi realizado em conformidade com o que foi descrito acima e a indução foi feita com a adição de IPTG a 0,4 mM por 16 horas e o sedimento de bactérias foi guardado a -70°C para posterior purificação da proteína recombinante.

4.10. Análise da expressão da proteína recombinante NP produzida pelos clones transformantes por SDS-PAGE e “Western blotting”

4.10.1 Dosagem de proteína total e purificada

Para a análise da expressão dos clones por SDS-PAGE e Western blotting, foi determinada a quantidade de proteína total presente no extrato celular bacteriano, obtido após a expressão e também após a purificação com a resina de níquel - agarose por meio do kit “Protein Assay” (BIO-RAD), baseado no método descrito por BRADFORD (1976), seguindo as instruções do fabricante e usando-se uma solução padrão de soroalbumina bovina com a concentração proteica a 1 mg/mL.

4.10.2. Concentração do VDN com polietileno-glicol para uso nas técnicas de SDS-PAGE e de “Western-Blotting”

O vírus foi concentrado conforme a técnica descrita por LANCER e HOWARD (1980) e a partir do LCA infectado colhido dos ovos SPF onde foi feita a propagação do VDN.

4.10.3. Preparo de soros de referência contra o VDN

Antissoros contra a estirpe LaSota de referência do VDN foram preparados em 10 galinhas SPF adultas alojadas em isoladores de pressão negativa, seguindo-se o método de ADAIR et al. (1989). As aves foram inoculadas por via oral e nasal com 0,1 mL de líquido córion-alantóide contendo aproximadamente 256 unidades Hemaglutinantes do VDN. Decorridos 3 a 4 semanas as aves receberam uma dose adicional de reforço por via nasal e, depois de mais 1 a 2 semanas, foi feita a coleta de sangue sem anticoagulante, para que pudesse separar o soro de cada uma das aves,

os quais foram testados na técnica de HI contra a estirpe homóloga do VDN e aqueles com altos títulos de HI foram reunidos em um pool e separados em pequenas alíquotas e depois armazenados a -20°C.

4.10.4. Análise de proteínas em gel de poliacrilamida na presença de dodecilsulfato de sódio (PAGE-SDS)

As amostras a serem analisadas foram diluídas em tampão para amostra contendo 62,5mM Tris-HCl, pH 6,8, 1% SDS, 10% de glicerol, 0,001% de azul de bromofenol e 1% de 2-mercaptoetanol. Após fervura por 2 min as amostras foram aplicadas em 2 géis de poliacrilamida com concentração de 12% no gel de separação. A separação eletroforética foi realizada pela técnica de eletroforese de gel de poliacrilamida com PAGE-SDS, usando-se um sistema de tampão descontínuo, conforme recomendado na técnica descrita por LAEMMLI (1970). As bandas polipeptídicas foram, ao final, detectadas, em um dos géis, através da coloração com “Coomassie Brilliant blue R-250”, enquanto que o outro gel foi usado para a eletrotransferência para a membrana de nitrocelulose, seguindo-se a realização da técnica de Western-blotting.

4.10.5. Análise imunológica da NP recombinante do VDN expressas em *E. coli* pela técnica de “Western-blotting”

Foi realizada a técnica de “Western-blotting”, sendo em geral, adotado o protocolo de TOWBIN et al, (1979), buscando-se fazer a detecção da proteína NP recombinante, tanto com o anticorpo monoclonal contra a etiqueta de poli-histidina (Sigma, St. Louis, MO), como com anticorpos policlonais anti-VDN presentes no soro de referência positivo para esse vírus. Após realizada a separação eletroforética pela técnica de poliacrilamida gel eletroforese com PAGE-SDS, os polipeptídeos foram transferidos para uma membrana de HPVDF (GE Healthcare, USA), a qual foi em seguida bloqueada com leite em pó desnatado a 5% em tampão PBS. A diluição do

anticorpo monoclonal foi de 1:2500 e a do soro hiperimune de galinhas contra o VDN foi de 1:100, ambas preparadas em PBS acrescido de 10% de LPD, para detecção da NP recombinante do VDN, sendo esta fase da reação incubada sob agitação por 1 h a temperatura ambiente. Os conjugados anti-IgG de camundongo ou anti-IgG de galinha com a peroxidase (SIGMA) foram utilizados na diluição de 1:500 em PBS acrescido de 10% de LPD e incubado por 1 h sob agitação, para revelar a ligação antígeno-anticorpo. Em seguida a membrana foi lavada com PBS-Tween 20 (PBST) e PBS, sendo a revelação de cor da reação feita após a adição do substrato cromógeno específico – DAB mais uréia (Sigma).

4.11. Purificação da NP recombinante do VDN

Purificação da proteína recombinante N do VDN foi feita por interação com a resina de afinidade composta por níquel – agarose, (Ni Sepharose High Performance/Amersham Biosciense, Piscataway, NJ, USA) de acordo com as recomendações do fabricante da resina. Em resumo, o extrato bruto de bactéria transformada contendo a proteína N recombinante do VDN foi clarificado por meio de centrifugação a 10,000 x g por 10 min a 4°C, e 1 mL do sobrenadante obtido foi misturado com 1ml da resina de níquel-agarose. A mistura foi deixada em contato por 1 h e depois, tratada com os tampões de lavagem e o tampão de eluição, sendo eluída a proteína N recombinante da matriz da resina após a aplicação do tampão de eluição contendo 500 mM de Imidazol (Sigma). Frações de 1 ml foram colhidas da coluna. Após o procedimento de purificação, as preparações dessa proteína recombinante foram estocadas a -20°C, sendo determinadas as concentrações protéicas pelo método de BRADFORD (1976), bem como as características imunoquímicas através das técnicas de PAGE-SDS e de Western-blotting dessas mesmas frações da proteína NP recombinante purificada.

4.12. Amostras de soros para aplicação em teste de imunodiagnóstico da proteína NP recombinante do VDN

A idéia central foi que pudesse ser analisado um painel de amostras mais representativo, tendo sido colhidas amostras de sangue por punção da veia ulnar, de maneira que fosse obtido um painel de amostras de soro sanguíneo mais abrangente contendo amostras com títulos de anticorpos mais elevados, moderados, ou mais reduzidos, ou ainda, negativas quanto à reatividade com o VDN. Desta forma, foram colhidas amostras de soro de galinhas de postura e de frangos de corte submetidos a esquema usual de vacinação para esses tipos de criações de aves, bem como de galinhas SPF da linhagem Leghorn white, como fornecedoras de amostras negativas para o VDN.

4.12.1 Amostras de soros de galinhas de postura

Foram colhidas 80 amostras de sangue de galinhas de postura (linhagens White Leghorn e Lohmann Brown) de granjas da região de Bastos-SP, as quais foram divididas conforme a idade em quatro grupos (I, II, III e IV). Todas as aves receberam de três a quatro doses de vacina “viva” atenuada contra o VDN (via ocular e spray), nas idades de 7 dias, 28 dias, 63 dias e 95 dias, além de oito outras vacinas contra outros diferentes patógenos bacterianos e virais aviários. Quando a colheita de sangue foi realizada, as aves estavam no 94° (grupo I), 151° (grupo II), 182° (grupo III) ou 237° (grupo IV) dia de idade.

4.12.2. Soros de frangos de corte

Foram colhidas 21 amostras de um lote de 960 de aves da linhagem COBB (corte), os quais foram divididos em 2 grupos (A e B). Todas as aves receberam vacina contra o VDN aos 7 dias de idade. A colheita foi realizada quando as aves estavam com

17 dias de idade, ou seja, 10 dias após vacinação, no grupo A, e com 47 dias de idade, ou seja, 40 dias após vacinação, no grupo B.

4.12.3. Amostras de soros negativos para o VDN

Amostras sanguíneas de 24 aves da linhagem White Leghorn livres de patógenos específicos (SPF) foram usadas para a avaliação de parâmetros do teste de ELISA, como sensibilidade, especificidade e ponto de corte de cada teste sorológico.

4.13. Aplicação da NP recombinante do VDN no teste de ELISA indireto / NP-VDN-ELISA

Em linhas gerais foi adotado o protocolo descrito por Gibertoni et al. (2005). Inicialmente foi realizada uma titulação em bloco, adsorvendo-se a placa de 96 poços, 4 concentrações diferentes do antígeno NP recombinante – de 2 µg/mL a 16 µg/mL e com 6 diluições seriadas de razão 2 dos soros de controle positivo e negativo para o VDN (1:100 até 1:3200). Ao fim, determinou-se a concentração ideal do antígeno para uso e também da diluição única para os soros de galinhas (detector). Em resumo, placas com 96 cavidades (Costar) foram adsorvidas com 50 µL de uma solução com a NP recombinantes do VDN em concentração ideal para uso - 4 µg/mL, preparada em tampão carbonato/bicarbonato (0.05M, pH 9.6). As placas foram incubadas a 4°C, durante 16 h, depois lavadas três vezes com PBS-Tween-20 e bloqueadas por 45 min com 100 µL por cavidade de tampão de bloqueio (10% de leite em pó desnatado, tampão carbonato/bicarbonato - 0.05M, pH 9.6). As placas foram a seguir, lavadas com PBS Tween 20 quatro vezes e adicionados 50µL por cavidade das amostras de soro de galinha (anticorpo primário), diluídas no tampão de bloqueio na diluição final de 1:400, sendo feita, em seguida a incubação à temperatura de 37°C por 1 h. As placas foram então novamente lavadas com PBS-Tween 20 por quatro vezes e depois adicionado, em sua diluição ideal de uso (1:1.000) o conjugado imunoenzimático constituído por IgG de coelho anti-IgG de galinha com a peroxidase, o qual também foi

diluído no tampão de bloqueio. As placas foram, a seguir, incubadas a 37°C por 2h e, ao final desta etapa foram lavadas por quatro vezes, tal como se descreveu anteriormente. Em seguida foi feita a adição, em volumes de 50µL/cavidade, da mistura substrato-cromógeno (peróxido de hidrogênio - H₂O₂ / Orto-fenileno-diamina-OPD), preparada em tampão citrato-fosfato pH 5.0, deixando-se a reação se desenvolver por 15 min à temperatura ambiente, ao abrigo da luz, em seguida adicionando-se HCl 2M em volume de 50µL/cavidade para bloquear a atividade enzimática. As densidades ópticas (DOs) obtidas foram mensuradas em leitor de placas de ELISA (BIO-RAD - Modelo 550) e no comprimento de onda de 492 nm, sendo assim as D.Os obtidas foram transformadas em valores da relação amostra / positivo (A/P), tal como descrito e recomendado por GIBERTONI et al. (2005) e SILVA et al. (2009). Para cada amostra de soro teste a DO média das duplicatas (DO_{MTS}) foi expressa em relação à DO média das duplicatas do soro de referência positiva (DO_{MPRS}) e das duplicatas de soro de referência negativa (DO_{MNRS}), como a denominada relação amostra/positivo e de acordo com a fórmula $A/P = (DO_{MTS} - DO_{MPRS}) / (DO_{MPRS} - DO_{MNRS})$.

Para comparar o desempenho do NP-VDN-ELISA, foram realizados testes de HI, conforme estabelece a OIE (2008), com as mesmas amostras séricas utilizadas no ELISA indireto.

4.14. Teste de inibição da hemaglutinação (HI)

Em linhas gerais foi adotado o protocolo descrito pela OIE (2008) para a realização do teste de HI.

Para tanto, inicialmente foram colhidos aproximadamente 5 ml de sangue de aves com anticoagulante (solução Alsever). Em seguida, a quantidade colhida (hemácias + anticoagulante) foi filtrada, utilizando-se funil e algodão; lavada três vezes em PBS pH 7,2; e centrifugada à baixa rotação por 4 minutos. O sedimento resultante foi diluído a 0,5% em PBS pH 7,2 + 0,1% de albumina e em seguida, foi feita a lise das hemácias utilizando-se 4,5 mL de água destilada e 0,5 mL da suspensão anterior. A

densidade óptica desejada ($DO_{desejada} = 0,30$ a $0,33$) foi mensurada em espectrofotômetro, no comprimento de onda de 545 nm.

Em segundo lugar foi feita a titulação do vírus pela reação de hemaglutinação (HA), que foi realizada em microplacas com fundo em “U”. Em suma, nesse procedimento, foi adicionado 25 μ L por cavidade de diluente (PBS pH 7,2 + 0,1% de albumina) e em seguida, foi realizada diluição seriada na razão 2 de suspensão viral (VDN). A seguir foi adicionada a suspensão de hemácias em todas as cavidades, no volume de 25 μ L/cavidade, e após 30-40 minutos procedeu-se a leitura do título do HA, que foi expresso como a recíproca da maior diluição do vírus, onde se verificou o fenômeno da hemaglutinação por completo.

Uma vez determinado o título hemaglutinate do vírus, a próxima etapa foi submeter as amostras de soro ao teste de HI. Para tanto, foi colocado 25 μ L de PBS pH 7,2 + albumina em todas as cavidades e, foi adicionado soro de aves utilizando-se diluição seriada de razão 2. Em seguida, adicionou-se quatro unidades hemaglutinantes (UHA) do antígeno viral padronizado e incubou-se por 30 minutos, a temperatura ambiente. Terminada esta etapa, a suspensão de hemácias de galinhas lavadas a 0,5% em PBS pH 7,2 + albumina foi adicionada as cavidades como sistema revelador da reação e incubou-se por mais 30 minutos, a temperatura ambiente. O título foi definido como o inverso da maior diluição de soro capaz de inibir completamente a atividade hemaglutinante viral. O ponto de corte utilizado para o teste de HI foi de 8 (2^3 ou Log_{10}), de acordo com o preconizado pela OIE (2008).

4.15. Análise dos resultados do NP-VDN-ELISA

Os níveis de anticorpos (valores A/P) anti-VDN mensurados pelo NP-VDN-ELISA foram analisados por regressão linear com os títulos de anticorpos HI mensurados como Log_{10} Título-HI obtidos para cada um dos 125 soros de galinha testados obtendo-se o coeficiente de correlação (r de Pearson) entre ambos testes sorológicos e usando-se o programa EXCELL.

O ponto de corte foi estabelecido com base, nos resultados do NP-VDN-ELISA, na análise de 24 soros de galinha negativos para o VDN. Sendo assim, os parâmetros foram determinados a partir da média do valor A/P +/- 3x desvio padrão dessas mesmas amostras séricas negativas.

Os cálculos da sensibilidade, especificidade, valores preditivos positivos e negativos foram feitos de acordo com as seguintes fórmulas:

- Sensibilidade = Positivos verdadeiros / Positivos verdadeiros + Falsos negativos
- Especificidade = Negativos verdadeiros / Falsos positivos + Negativos verdadeiros
- Valor preditivo positivo = Positivos verdadeiros / Positivos verdadeiros + Falsos positivos
- Valor preditivo negativo = Negativos verdadeiros / Falsos negativos + Negativos verdadeiros
- Acurácia = Positivos verdadeiros + Negativos verdadeiros / Valor total de soros

A concordância foi estabelecida pelo índice kappa, determinado pelo programa de Cálculos estatísticos básicos para testes diagnósticos versão 1999 (BRAILE, & GODOY, 1999).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Propagação e titulação da infectividade viral

No procedimento de propagação da estirpe LaSota do VDN em ovos embrionados SPF de galinha, obteve-se um rendimento em termos de massa viral relativamente elevado, caracterizado nesse caso, pelo título hemaglutinante (HA) que foi de 256 e, portanto, suficiente para se empreender, de forma apropriada a execução das etapas subsequentes do desenvolvimento experimental do presente trabalho. A suspensão de LCAi obtida serviu como fonte para a extração de RNA genômico viral que foi submetido à reação de transcrição reversa (RT) para obtenção do cDNA do gene da NP do VDN e também foi usada como antígeno viral nas técnicas de hemaglutinação (HA), inibição da hemaglutinação (HI), SDS-PAGE e de “Western-Blotting” sendo, no caso dessas últimas duas técnicas, ela foi antes submetida ao procedimento concentração de partículas virais com polietileno-glicol.

5.2. Extração de RNA viral e amplificação pela técnica de RT-PCR do gene N do VDN

A aplicação sobre o RNA extraído do LCA colhido dos ovos inoculados com a estirpe LaSota do VDN na técnica de RT-PCR com os oligonucleotídeos iniciadores construídos para este estudo (N+ e N-), permitiu a amplificação de um produto com o tamanho esperado, isto é, 1470 pb, conforme ilustra a figura 3.

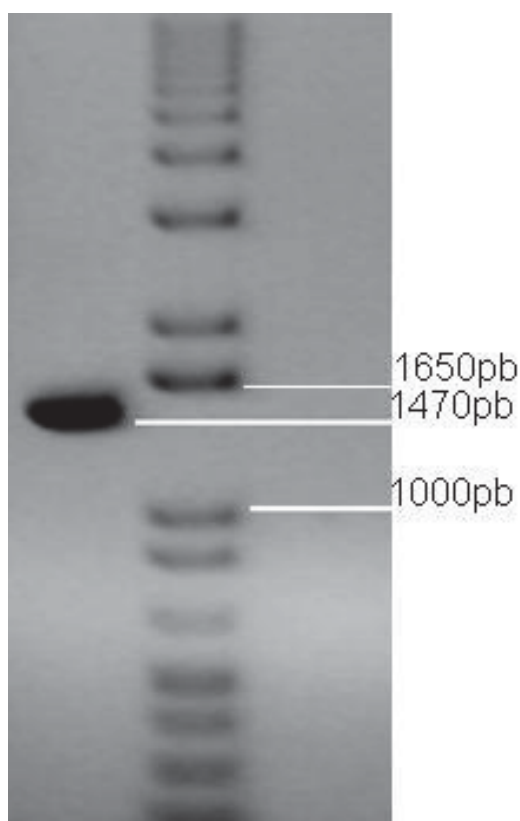


Figura 3. Eletroforese em gel de agarose a 1% contendo o fragmento gênico amplificado da NP do VDN. Canaleta (1) fragmento amplificado do gene NP com os iniciadores específicos N+ e N-, (2) marcador de tamanho molecular 1kb Plus DNA Ladder (3) controle negativo da reação (LCA-SPF).

5.3. Otimização da temperatura de anelamento dos oligonucleotídeos iniciadores do gene NP do VDN para a PCR

Para se obter um melhor resultado e confirmar a temperatura adequada para o anelamento dos oligonucleotídeos, foi feito através do Termociclador MJ RESEARCH®, um gradiente com as seguintes temperaturas: 40,0°C; 41,2°C; 42,8 °C; 43,5°C; 49,6°C; 50,2°C; 51,0°C; 52,3,1°C; 53,3 °C; 54,3°C; 56,0°C e 57,5°C, sendo que dessas temperaturas, verificou-se que as duas melhores foram as de 50,2°C e 57,5°C, que proporcionaram a obtenção de produtos amplificados em maior quantidade e isentos da presença de produtos inespecíficos. Dessa forma foi escolhida determinada a

temperatura de pareamento, e equivalente a 57,5°C, o que proporcionou a amplificação do produto do gene N do VDN com o tamanho esperado de 1470 pb (Figura 4).

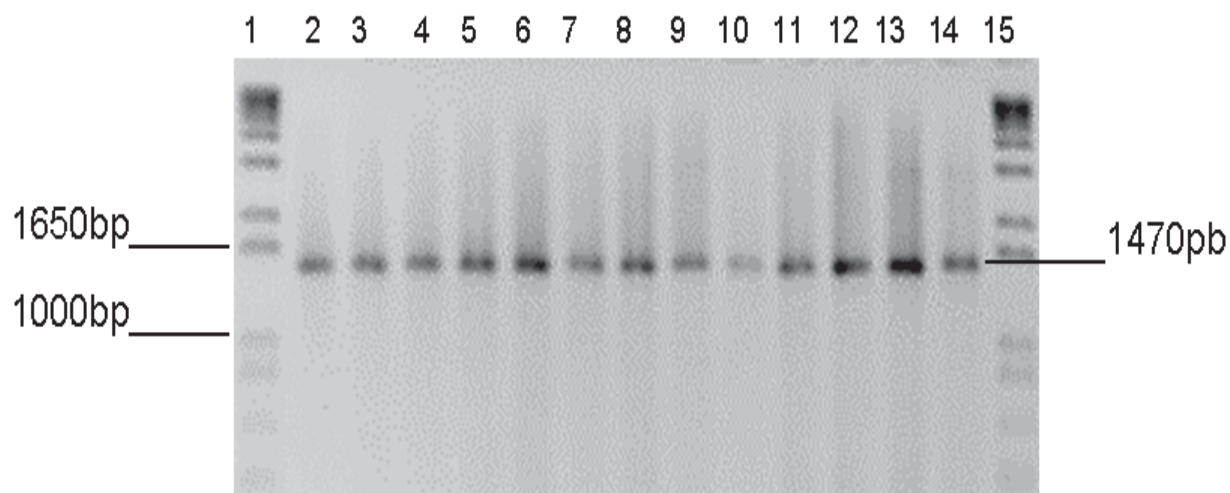


Figura 4. Visualização do eletroforograma em gel de agarose (1% tampão TAE), dos resultados da amplificação na técnica de RT-PCR realizada com gradiente de temperatura de anelamento dos primers N+ e N-. Nas canaletas 1 e 15, 5 µL Marcador molecular 1Kb plus DNA Ladder (Invitrogen). Nas canaletas de 2 a 13, os produtos de RT-PCR 5 µl provenientes das seguintes temperaturas 40,0°C; 41,2°C; 42,8 °C; 43,5°C; 49,6°C; 50,2°C; 51,0°C; 52,3,1°C; 53,3 °C; 54,3°C; 56,0°C e 57.5°C, respectivamente. Melhores temperaturas correspondem as canaletas 6 e 13; na canaleta 14 controle positivo.

5.4. Purificação e quantificação do DNA amplificado do gene NP do VDN

Foi obtido o DNA do gene NP de forma mais purificada após passagem do produto amplificado na técnica de purificação do kit comercial “Wizard PCR[®] Gel and PCR clean-up Systems” (Promega), tal como revela a eletroforese em gel de agarose a 1% (Figura 5). Nessa mesma separação eletroforética foi usado um padrão de massa de ácido nucléico, o “Low DNA Mass Ladder” (Invitrogen) tendo-se obtido um valor de 68,7 ng/µl (Figura 5) e também esse material de DNA purificado foi quantificado em espectrofotômetro no comprimento de onda de 260 nm, tendo-se obtido o valor de 60 ng/µl da concentração de DNA.

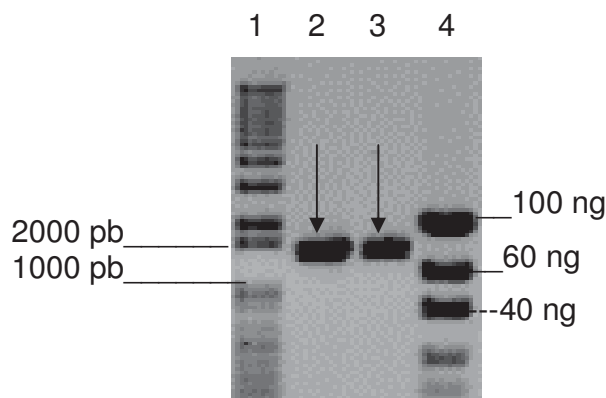


Figura 5. Visualização do eletroforograma em gel de agarose (1% tampão TAE), para analisar a pureza e quantificar o DNA purificado do gene NP previamente amplificado na técnica de RT-PCR. Na canaleta 1, 7 μ l Marcador molecular 1Kb plus DNA Ladder (Invitrogen), Canaleta 2 e 3 produto de RT-PCR indicados pelas setas na altura de 1470 pb e na canaleta 4, 2 μ l Low DNA Mass Ladder (Invitrogen).

5.5. Identificação dos clones bacterianos portadores do gene N do VDN após sua inserção no vetor Champion™ pET SUMO Protein Expression System®

Com produto obtido, após reação de ligação do gene da NP do VDN ao vetor pET SUMO (Invitrogen), foi realizada a transformação de *E. coli* da linhagem_one shot mach 1 – t1.

Foram obtidos 64 clones transformantes, que cresceram no meio seletivo usado. Cinco desses clones transformantes (A3, A6, B1, C6 e D1) foram então selecionados para se pesquisar a presença do vetor contendo o inserto do gene NP, por meio da detecção dos produtos amplificados na PCR com a combinação de iniciadores específicos para o gene de interesse ou para o vetor pET SUMO (Invitrogen) em amostras do DNA plasmidial extraídas desses mesmos clones. Inicialmente, foi verificado que, na reação de PCR realizada com os oligonucleotídeos iniciadores N+ e N- sobre as amostras de DNA plasmidial colhidas dos clones bacterianos transformantes, houve a amplificação de toda a região gênica codificadora do gene N do VDN, gerando um fragmento com o tamanho esperado, isto é, de 1470 pb, porém apenas o clone C6 teve todos os produtos amplificados cada uma das combinações

dois a dois dos oligonucleotídeos iniciadores, nos tamanhos esperados, conforme demonstrado na figura 6; na canaleta 2 o gene N do VDN no tamanho de 1470 pb. Na canaleta 3, está demonstrado o produto da amplificação da reação realizada com o oligonucleotídeo iniciador sense do vetor juntamente com o oligonucleotídeo iniciador anti-sense do gene N (N-) do VDN, sendo que o tamanho esperado para esse produto amplificado era de 1575 pb. Na canaleta 4 está apresentado o resultado da amplificação do produto amplificado com a utilização dos oligonucleotídeos iniciadores, sense para o gene N (N+) do VDN juntamente com o oligonucleotídeo iniciador anti-sense do vetor, com um tamanho esperado de 1617 pb. Por fim, na canaleta 5 está demonstrado o resultado da amplificação quando a PCR foi realizada com os oligonucleotídeos iniciadores sense e anti-sense específicos para o vetor, sendo que o tamanho esperado para esse produto amplificado era de 2061pb.

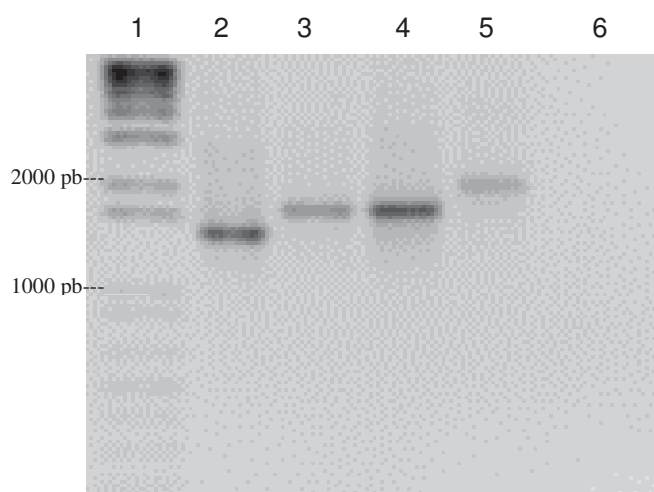


Figura 6. Combinação de oligonucleotídeos iniciadores visualizado em gel de agarose (1% tampão TAE), canaleta 1, 7 µl Marcador molecular 1Kb plus DNA Ladder (Invitrogen). Nas canaletas de 2 a 5 os resultados do clone C6 submetido a combinação dos oligonucleotídeos e na canaleta 6 o controle negativo da reação.

5.6. Sequenciamento de nucleotídeos do inserto do gene NP do VDN nos clones bacterianos transformantes selecionados

Com o produto obtido a partir da extração do DNA plasmidial dos clones transformantes de *E.coli*_one shot mach 1 – T1, realizou-se também o seqüenciamento de nucleotídeos do inserto do gene NP do VDN, sendo que a análise das sequências foi feita utilizando o programa "BLAST 2 sequences" <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/bl2seq/wblast2.cgi>, onde foi possível constatar a homologia de 100% existente entre a seqüência de nucleotídeos da nucleoproteína da estirpe LaSota disponível no "GeneBank" identificada pelo nº de acesso AY 845400 com o do inserto do gene NP presente no clone bacteriano C6 preparado nesse estudo (Figura 7). Na verdade essa análise demonstrou que a identidade da seqüência de nucleotídeos desse clone transformante variou de um máximo de 100%, obtida com relação ao gene N de uma das estirpes LaSota do VDN cadastradas no GenBank, a um mínimo de 87% de identidade, que foi obtido na comparação com algumas seqüências do gene NP oriundas de isolados de aves silvestres.

Foram também encontradas escores de 99% de identidade com relação a duas outras seqüências da estirpe LaSota que estão depositadas no GenBank sob números EF442113 e AF077761, indicando que, embora o gene NP seja bastante conservado, pode haver algumas trocas de nucleotídeos de seqüências codificadoras do gene N dentre diferentes isolados da mesma estirpe do VDN. Ainda, para efeito de comparação, foram verificadas identidades de 98% e 90% da seqüência do gene NP clonada em nosso estudo, com relação, respectivamente, às seqüências do gene NP das estirpes B1 e Ulster 2C, depositadas no GenBank e que são estirpes vacinais atenuadas do VDN.

Sequences producing significant alignments:

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
gil259563643 GQ994433.1	Newcastle disease virus strain XD/Shandong/08, complete genome	2652	2652	100%	0.0	100%
gil237861376 FJ938171.1	Newcastle disease virus strain sparrow/Guangxi/NN10/07 nucleocaps	2652	2652	100%	0.0	100%
gil112253721 DQ839549.1	Newcastle disease virus isolate D58 nucleoprotein (NP) gene, compl	2652	2652	100%	0.0	100%
gil5578883 Y18898.1	Newcastle disease virus cDNA to complete genomic RNA, clone 30	2652	2652	100%	0.0	100%
gil61621428 AY845400.2	Newcastle disease virus strain LaSota, complete genome	2652	2652	100%	0.0	100%
gil116488731 DQ995224.1	Newcastle disease virus strain SP13 from China nucleoprotein (NP) g	2646	2646	100%	0.0	99%
gil199588909 EU546165.2	Newcastle disease virus strain JL-1, complete genome	2643	2643	100%	0.0	99%
gil130775725 EF442113.1	Newcastle disease virus strain LaSota nucleoprotein (NP) gene, com	2625	2625	100%	0.0	99%
gil28824865 AY225110.1	Newcastle disease virus strain HB92 isolate V4, complete genome	2625	2625	100%	0.0	99%
gil157674520 EU140955.1	Newcastle disease virus strain KBNP-C4152R2L, complete genome	2619	2619	100%	0.0	99%
gil3386504 AF077761.1	Newcastle disease virus strain LaSota, complete genome	2619	2619	100%	0.0	99%
gil167427515 EU289029.1	Newcastle disease virus strain VG/GA clone 5, complete genome	2589	2589	100%	0.0	99%
gil167427508 EU289028.1	Newcastle disease virus strain VG/GA, complete genome	2589	2589	100%	0.0	99%
gil166210306 EU249349.1	Synthetic construct isolate rNDV/F3aa/2seq NP protein (NP), P prot	2589	2589	100%	0.0	99%
gil14190062 AF375823.1	Newcastle disease virus strain B1 isolate Takaaki, complete genome	2589	2589	100%	0.0	99%
gil28268506 AJ306301.1	Newcastle disease virus NP gene for nucleoprotein, genomic RNA, st	2589	2589	100%	0.0	99%
gil11527326 AF309418.1	Newcastle disease virus B1, complete genome	2583	2583	100%	0.0	98%
gil4587776 AF060483.1	Newcastle disease virus nucleocapsid protein gene, complete cds	2583	2583	100%	0.0	98%
gil301333029 HM357251.1	Newcastle disease virus isolate NDV-4/chicken/Namakkal/Tamil Nadu	2580	2580	100%	0.0	98%
gil15811689 AF419411.1	Newcastle disease virus turkey/U.S./VGGA/87 nucleocapsid protein	2560	2560	99%	0.0	98%
gil130775752 EF442114.1	Newcastle disease virus strain F nucleoprotein (NP) gene, complete	2516	2516	100%	0.0	97%
gil3139149 AF064091.1	Newcastle disease virus nucleocapsid protein (NP) gene, complete c	2516	2516	100%	0.0	97%
gil15811673 AF419403.1	Newcastle disease virus chicken/U.S./Kimber/47 nucleocapsid protei	2515	2515	99%	0.0	98%
gil255709963 FJ939313.1	Newcastle disease virus strain NDV/Chicken/Egypt/1/2005, complete	2507	2507	100%	0.0	97%
gil454977 Z30084.1	Newcastle disease virus (Ulster 2C) RNA for nucleocapsid protein	2024	2024	100%	0.0	90%
gil253317757 GQ288378.1	Newcastle disease virus strain northern pintail/US(OH)/87-486/1987,	2021	2021	100%	0.0	90%
gil254847481 FJ705473.1	Newcastle disease virus isolate northern pintail/US(OH)/87-486/198;	2019	2019	99%	0.0	90%
gil46409038 AB124607.1	Newcastle disease virus NP gene for nucleocapsid protein, complete	1867	1867	100%	0.0	88%
gil46409036 AB124606.1	Newcastle disease virus NP gene for nucleocapsid protein, complete	1862	1862	100%	0.0	88%
gil46409014 AB124595.1	Newcastle disease virus NP gene for nucleocapsid protein, complete	1840	1840	100%	0.0	87%
gil315614515 HQ011508.1	Newcastle disease virus strain NDV/2K36/peacock/Chennai, partial q	1831	1831	100%	0.0	87%

Figura 7. Visualização dos “scores” dos parâmetros determinados para as ssequências de nucleotídeos seqüenciados do clone C6 de *E.coli* transformado pelo vetor pET SUMO – Gene NP da Estirpe LaSota do VDN produzido nesse trabalho, que foram obtidos através da análise pelo programa BLASTn no site <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/bl2seq/wblast2.cgi>, com destaque para os escores de “E-value” e os de identidade máxima com relação às seqüências do gene NP de diversas estirpes do VDN. As caixas retangulares destacam os escores obtidos com as seqüências do gene NP das estirpes vacinais atenuadas mais relevantes do VDN [Estirpe LaSota (1 delas com 100% de identidade e duas outras com 99%, caixas de cor vermelha e cor azul, respectivamente); Estirpe B1 (98% de identidade, caixa de cor lilás) e Estirpe Ulster 2C (90% de identidade, caixa de cor lilás)].

Além disso, esse sequenciamento mostrou que o ATG encontra-se na fase correta de leitura (“in frame”) e na posição “downstream” em relação as seqüências do gene promotor e da etiqueta SUMO-Poli-Histidina. O “e-value” obtido no Blast foi de 0.0 (Figura 7) e o alinhamento da seqüência de nucleotídeos da NP recombinante com a seqüência de referencial, descrita anteriormente, revelou uma homologia de 100% (Figura 8).

A propósito, deve-se ressaltar que é uma característica da proteína N do VDN apresentar uma elevada conservação e homologia da seqüência nucleotídica completa desse gene entre as diferentes estirpes desse vírus (PHAM et al., 2004), a despeito dos achados não esperados com relação às seqüências de nucleotídeos de dois outros isolados da estirpe LaSota, para os quais foram encontradas identidades ligeiramente menores e correspondentes a 99%.

Dentro desse contexto de análise de seqüências de nucleotídeos do gene N do VDN, deve-se salientar que na literatura consta que o gene da NP do VDN já foi clonado e expresso, com sucesso em células de insetos transfectadas, nesse caso por um vetor constituído de baculovírus recombinante, isto é, contendo o inserto do gene NP da estirpe “Hitchner” B1 do VDN (ERRIGTON et al., 1995, MAKKAY et al., 1998), como também em *E. coli* com o uso de um outro vetor diferente do pET-SUMO (KHO et al., 2001). As preparações de proteínas recombinantes NP do VDN expressas em baculobvírus foram usadas para montagem de técnicas de imunodiagnóstico (ELISA), tal como se configura a proposta desse nosso estudo, enquanto que a proteína NP que foi obtida de *E. coli* foi utilizada somente para estudos de estrutura viral, especialmente aqueles relacionados à montagem de capsídeo do VDN a partir das proteínas NP recombinantes expressas nessa bactéria.

Entretanto, a produção de altos níveis de proteínas recombinantes depende de muitos fatores. Os principais estão relacionados com a escolha do sistema de expressão, que afeta tanto o processo de produção, quanto o rendimento do produto, além de questões relacionadas ao custo e tempo de produção (MAKRIDES, 1996).

Figura 8. Alinhamento entre a sequência de nucleotídeos completa do gene NP da estirpe LaSota do VDN (clone C6) clonado no vetor pET SUMO (Invitrogen) com o mesmo gene da estirpe de referência LaSota do VDN depositado no “Gene Bank” sob o número de acesso AY 845400.

O sistema para a produção de proteínas heterólogas recombinantes em *Escherichia coli*, tem sido o mais utilizado para essa finalidade, em razão desse microrganismo depois de transformado, continuar apresentando um rápido crescimento em cultura, e por se adequar à uma manipulação relativamente mais simples do que ocorre com outros sistemas de clonagem e expressão (TSUMOTO *et al.*, 2003; SINGH & PANDA, 2005). Em adição a isso, a genética da *E. coli* é bem conhecida, e há disponibilidade de um número cada vez maior de vetores de clonagem e linhagens mutantes para esse microrganismo (BANEYX, 1999). Todas essas características tornam o sistema de expressão em *E. coli* um dos mais utilizados para a produção de proteínas recombinantes, que não necessitam de modificações pós-traducionais, tais como glicosilação, para que a proteína exerça sua função biológica específica (SINGH & PANDA, 2005).

Dessa forma, ao se reunir todas as informações das análises dos clones transformantes pela técnica de PCR realizada com a combinação de oligonucleotídeos iniciadores do inserto e do vetor, com o resultado do seqüenciamento de nucleotídeos do DNA plasmidial desses mesmos clones, constatou-se que o clone C6 dentre os 5 testados é o único que contém o inserto do gene da NP do VDN. Já, os demais clones analisados apresentam o gene NP do VDN na orientação inversa e, portanto, não são capazes de gerar a proteína recombinante de interesse. Assim, para transformação bacteriana na linhagem de expressão (*E. coli* ER2566) foi selecionado apenas o clone C6, cuja concentração do DNA plasmidial é de aproximadamente 54.6 ng/μl.

O protocolo de transformação da cepa de *E. coli* especializada para a expressão de proteínas com o vetor pET SUMO – gene NP da estirpe LaSota resultou em 96 clones transformantes, dos quais foram selecionados, aleatoriamente, dois clones da linhagem ER2566 – A1 e B12 para serem submetidos ao processo de indução de expressão do gene da proteína N do VDN. Os extratos protéicos brutos obtidos da primeira seleção, para escolha do clone para indução em média escala, no sobrenadante após a ruptura das células de *E. coli* dos clones A1 e B12, revelaram pelo

método de BRADFORD, concentrações proteicas, respectivamente, de 14,37 mg/ml e 11,58 mg/ml.

5.7. Indução da expressão e purificação da proteína recombinante NP do VDN e análise pelas técnicas de SDS-PAGE e de “Western-blotting”

Os dois clones (A1 e B12) que foram selecionados e cultivados para a indução da expressão, após a adição de IPTG, nas concentrações de 0,4 mM e 1mM, produziram em seus extratos solúveis a proteína NP recombinante, no tamanho esperado, que é de aproximadamente 66 KDa; correspondente a 53 KDa da proteína NP do VDN propriamente dita e um acréscimo de 13 KDa correspondente ao polipeptídeo SUMO junto com a Poli-Histidinas (Figura 9).

Em adição a isso, a análise pela técnica de “Western-blotting” do extrato bruto da *E.coli* submetida ao processo de indução da expressão com as concentrações de 0,4mM e de 1mM de IPTG, revelou a presença da banda com peso molecular estimado em aproximadamente 66 kDa, fusionada com a etiqueta SUMO-histidina (Figura 9) em um ensaio para melhor definir a cinética produção e do tempo ideal de indução da expressão da NP recombinante de um dos clones bacterianos selecionados (A1).

Os resultados da análise por meio de eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), demonstraram a presença de um banda cuja massa molecular correspondeu a aproximadamente 66 kDa (Figura 10).O mesmo ocorreu quando a mesma amostra proteica foi utilizada na reação de “Western blotting” (Figura 11), e ainda verificou-se que além da marcação da banda protéica de 66 kDa, com o anticorpo monoclonal anti-Histidina, também houve a marcação de bandas de tamanhos menores do que a da NP recombinante. Esses achados levam a suposição de que se tratam de fragmentos menores da proteína N, ainda fusionados a etiqueta de histidina que provavelmente tenham sido gerados pela degradação por proteases e, por essa razão, são de menor peso molecular. Resultados semelhantes a esses foram observados na expressão da proteína NP do VDN por KHO et al. (2001) no sistema – vetor pTrcHis2 (Invitrogen) – *E. coli* e também da proteína N do coronavírus da SARS, no sistema –

vetor pET SUMO (Invitrogen) - *E. coli* (ZUO et al., 2005) e do coronavírus da bronquite infecciosa em leveduras da espécie *Saccharomyces cerevisiae* transformadas pelo vetor pYES-TOPO TA (Invitrogen), por GIBERTONI et al. (2005).

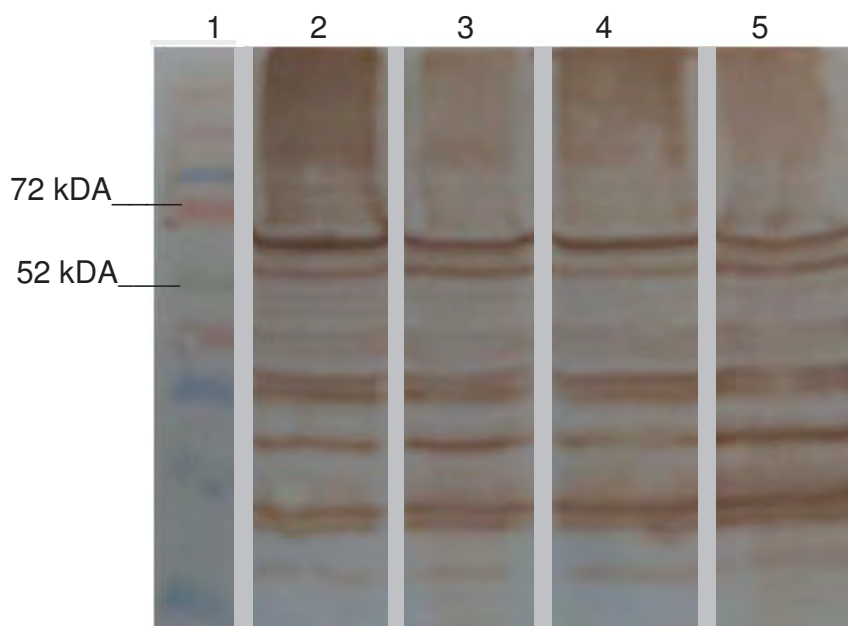


Figura 9. Caracterização por Western Blotting da NP recombinante expressa em *E. coli* dos clones A1 e B12. Na Canaleta 1, 5 µL Marcador de peso molecular (Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder Fermentas); nas canaletas 2 e 3 frações solúveis do clone A1 a 0,4 e 1,0mM de IPTG e nas canaletas 4 e 5 frações solúveis da cultura de bactéria do clone B12 a 0,4 e 1,0mM de IPTG.

Ainda, com o objetivo de dirimir dúvidas e de permitir que fosse identificada com mais certeza a expressão da proteína N recombinante pelo sistema pET SUMO – *E.coli*, (Figura 11) foi examinado na canaleta 6, uma fração do extrato da cultura de *E. coli* não submetida à indução da expressão de proteínas com IPTG; na canaleta 5, fração do extrato da cultura de *E. coli* contendo apenas o vetor pET SUMO sem o inserto do gene N do VDN (controle positivo da expressão da “etiqueta” SUMO-Poli-His); nas canaletas 2, 3 e 4 frações solúveis da cinética de 24 h, 16 h e 4 h do clone A1 (~66 kDa). O

anticorpo monoclonal anti-poli-histina foi usado neste método como anticorpo detector, juntamente com o conjugado imunoenzimático de cabra anti-IgG de camundongo com a peroxidase, o que revelou a presença de proteína recombinante nos extratos de proteína bruta derivados do clone A1, enquanto que não houve nenhuma marcação com relação ao extrato preparado com as células da bactéria não submetidas ao processo de indução de expressão de proteínas (Figura 11).

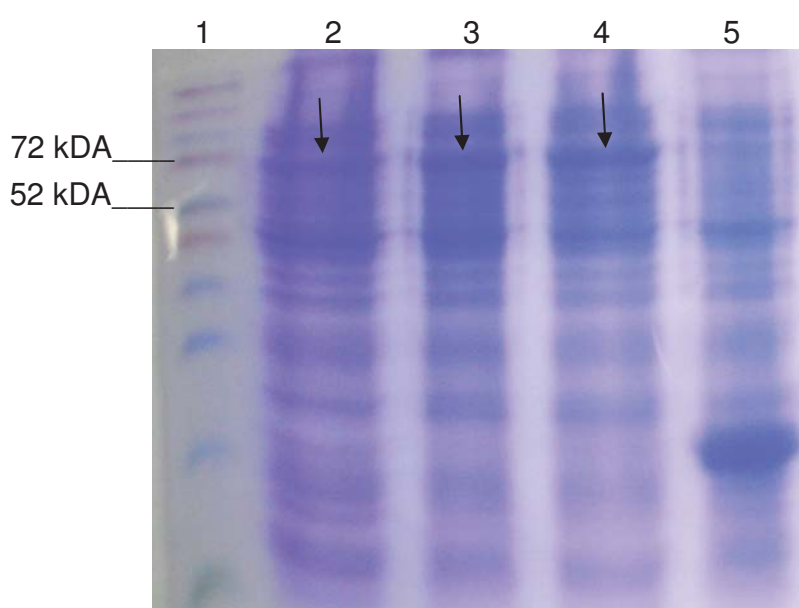


Figura 10. Caracterização SDS-PAGE da Proteína N recombinante expressa em *E. coli*. Canaleta 1, 5 μ L Marcador de peso molecular (Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder Fermentas); nas canaletas 2, 3, e 4 frações solúveis da cinética de 24 h, 16 h e 4 h do clone A1 respectivamente, e as setas indicam a proteína N recombinante do VDN (~66 kDa); na canaleta 5, fração do extrato da cultura de *E. coli* contendo apenas o vetor pET SUMO sem o inserto do gene N do VDN (controle positivo da “etiqueta” SUMO-Poli-His).

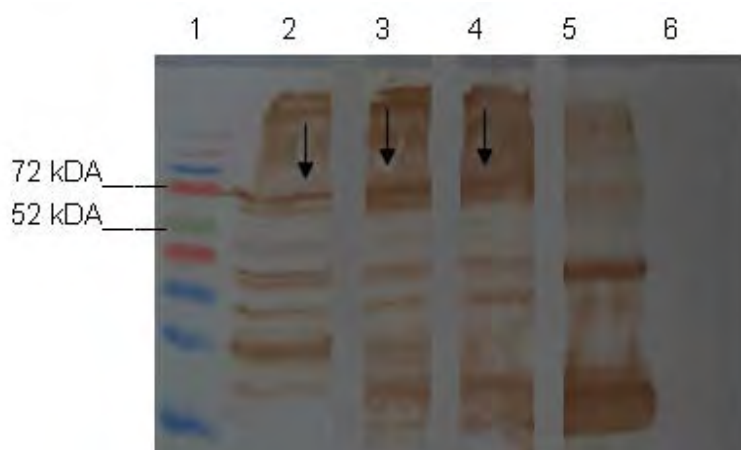


Figura 11. Caracterização por Western Blotting da Proteína NP recombinante expressa em *E. coli*. Canaleta 1, 5 μ L Marcador de peso molecular (Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder Fermentas); canaletas 2, 3 e 4 frações solúveis da cinética de 24 h, 16 h e 4 h do clone A1 respectivamente, e as setas indicam a proteína N recombinante do VDN (~ 66 kDa); na canaleta 5, fração do extrato da cultura de *E. coli* contendo apenas o vetor pET SUMO sem o inserto do gene N do VDN (controle positivo da expressão da “etiqueta” SUMO-Poli-His); nas na canaleta 6, fração do extrato da cultura de *E. coli* não induzida com IPTG. Foi usado anticorpo monoclonal anti-poli-histidina na diluição 1:2500

Após ter sido selecionado o clone A12 e estabelecido como melhor tempo para indução da proteína N de 16 horas, foi realizado outro protocolo de expressão, em média escala, a fim de se obter uma quantidade maior de proteína N recombinante da cultura de bactérias transformadas, a ser destinada a um protocolo posterior de purificação dessa mesma proteína em resina de Níquel-Agarose. Os extratos protéicos brutos obtidos da indução em média escala do clone A1, revelaram pelo método de BRADFORD, concentrações protéicas semelhantes, de 22,59 mg/ml na fração solúvel e 21,52 mg/ml na fração insolúvel. No entanto, a principal característica para o vetor pET SUMO (Invitrogen) é aumentar a solubilidade de proteínas recombinantes produzidas, propriedade esta que foi também verificada por ZUO et al., (2005) que obtiveram maior quantidade de proteínas na fração solúvel do que na fração insolúvel para o mesmo sistema hospedeiro de clonagem e expressão da NP de um coronavírus.

Os produtos obtidos da purificação em resina de Níquel-Agarose também foram quantificados pelo método de BRADFORD, de onde obteve-se uma concentração de proteína purificada de 1,076 mg/mL (canaletas 5 Figuras 12 e 13), em média, de litro de

cultura induzida obtem-se 10,8 mg de proteína purificada. A análise pela técnica de “Western-blotting” revelou que todas as frações eluídas da resina de níquel-agarose, incluindo aquelas eluídas com o tampão de lavagem, apresentavam duas bandas protéicas que se destacavam pela sua maior intensidade, uma com cerca de 66 kDa e a outra menor com cerca de 53 kDa, sendo que a intensidade delas foi maior naquelas frações eluídas com o tampão de eluição. Esses resultados revelam, em princípio, que uma parte da proteína NP recombinante não está se ligando a quantidade de resina níquel-agarose que foi usada no protocolo de purificação (1 mL de resina). Em segundo lugar, a eluição de duas frações protéicas, uma com o peso molecular esperado para a proteína recombinante NP do VDN e a outra com menor peso molecular que o esperado, sendo que ambas reagiram com o anticorpo monoclonal anti-poli-histidina indica que se trata provavelmente de um fragmento da proteína recombinante gerada por proteólise, mas que conserva a etiqueta SUMO – Poli-Histidina, que fica na extremidade amino-terminal da proteína recombinante gerada pelo sistema pET SUMO.

Os resultados da análise desse produto de purificação pela técnica de Western-blotting estão apresentados na Figura 13, onde podem ser comparados os perfis de separação eletroforética no gel de poliacrilamida (Figura 12) e de reatividade com os anticorpos específicos das frações de lavagem da resina de Níquel-Agarose (canaletas 3 e 4) com aquelas das etapas de eluição da proteína purificada (canaletas 5, 6, 7 e 8). Nessa membrana (Figura 13), verificou-se que ainda havia um contaminante sendo eluído em conjunto com a proteína N recombinante, o qual possivelmente seja produto de uma proteólise ou ainda, podem se tratar de proteínas próprias da bactéria *E. coli*. Na canaleta 8 fração do extrato da cultura de *E. coli* contendo apenas o vetor pET SUMO sem o inserto do gene N do VDN, que serviu como controle positivo da expressão da “etiqueta” SUMO-Poli-His.

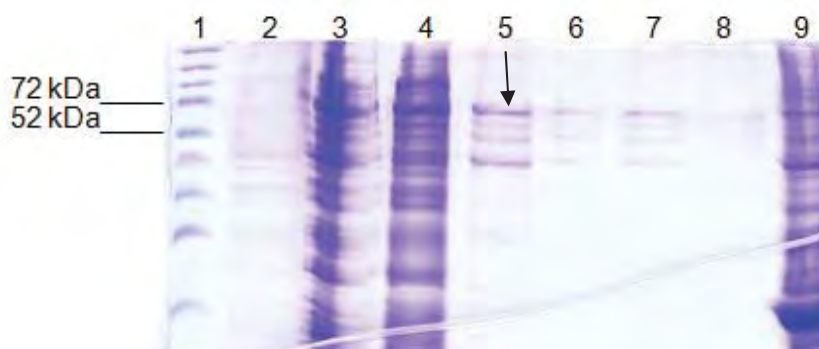


Figura 12. Análise pela técnica de SDS-PAGE das frações de lavagem e eluição da resina de Níquel-Agarose nas diferentes etapas de purificação. Canaleta 1, 5 μ L de Marcador de peso molecular (Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder Fermentas); na canaleta 2, cultura de *E.coli* não induzida (controle negativo da expressão); nas canaletas 3 e 4, frações das etapas de lavagens do lisado em resina de Níquel-Agarose; nas canaletas 5, 6, 7 e 8 extrato protéico purificado em resina de Níquel-Agarose do lisado da cultura de *E. coli* recombinante após as etapas de lavagens, e na canaleta 9, fração do extrato da cultura de *E. coli* contendo apenas o vetor pET SUMO (controle positivo da “etiqueta” SUMO-Poli-His).

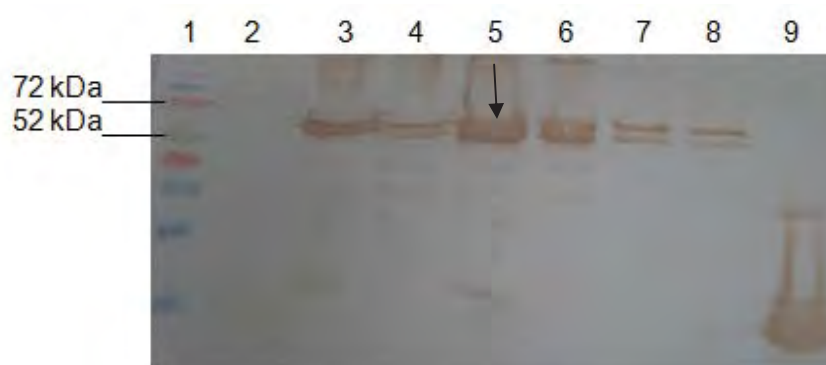


Figura 13. Análise pela técnica de Western-blotting, usando-se o anticorpo Monoclonal anti-Poli-Histidina como anticorpo revelador, das frações de lavagem e eluição da resina de Níquel-Agarose nas diferentes etapas de purificação. Canaleta 1, 5 μ L de Marcador de peso molecular (Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder Fermentas); na canaleta 2 cultura de *E.coli* não induzida (controle negativo da expressão); nas canaletas 3 e 4, frações das etapas de lavagens do lisado em resina de Níquel-Agarose; nas canaletas 5, 6, 7 e 8 extrato protéico purificado em resina de Níquel-Agarose do lisado da cultura de *E. coli* recombinante após as etapas de lavagens, na canaleta 9, fração do extrato da cultura de *E. coli* contendo apenas o vetor pET SUMO sem o inserto do gene N do VDN (controle positivo da expressão da “etiqueta” SUMO-Poli-His).

Para eliminar esse contaminante e evitar a sua presença e possível interferência na elaboração do teste de ELISA destinado à detecção de anticorpos contra o VDN, foi necessário fazer um bloqueio com extrato de *E. coli* a 15% no tampão diluente tanto para as amostras de soro quanto na diluição do conjugado imunoenzimático.

A análise pela técnica de “Western blotting” dos produtos da purificação da proteína recombinante NP em resina de Níquel-Agarose, tanto com o anticorpo monoclonal anti-His, como os anticorpos policlonais do soro de galinhas hiperimunizadas contra o VDN, revelou a presença de uma banda de proteína com peso molecular de cerca de 66 kDa, que é similar ao tamanho esperado da proteína N fusionada a etiqueta de poli-histidina e de uma segunda banda com peso molecular de aproximadamente 53 kDa que corresponde ao tamanho da proteína N do VDN sem a presença da etiqueta SUMO-poli-Histidina (vide setas Figura 14).

Além disso, a técnica de “Western blotting” (Figura 14) evidenciou que a proteína recombinante N do VDN expressa nesse trabalho apresenta elevado grau de homologia antigênica com relação à proteína N derivada de preparação concentrada de LCA contendo esse mesmo vírus, já que o soro policlonal de aves hiperimunizadas com a estirpe LaSota do VDN reagiu com a fração da proteína N fusionada com a etiqueta SUMO-Poli-His e também com a proteína N recombinante sem esta mesma etiqueta (canaleta 2) e ainda com a proteína N proveniente da suspensão concentrada do VDN (canaleta 3) Na canaleta 4, verifica-se que houve a marcação de bandas na fração não induzida da cultura devido muito provavelmente a presença de anticorpos contra antígenos de *E. coli* no soro de aves hiperimunizadas com o VDN, o qual foi usado, na técnica de “Western-blotting”, como fonte de anticorpos policlonais contra os principais componentes antigênicos desse mesmo vírus.

Resultados semelhantes da análise de antigenicidade da proteína NP recombinante do VDN, pela técnica de “Western blotting”, sobretudo no que se refere à avaliação de tamanho molecular feita pela técnica de SDS-PAGE foram descritos por ERRINGTON et al. (1995); KHO et al.(2001); YUSOFF & TAN, (2001); MEBATSION et al. (2002) e por HOMHUAN, 2004.

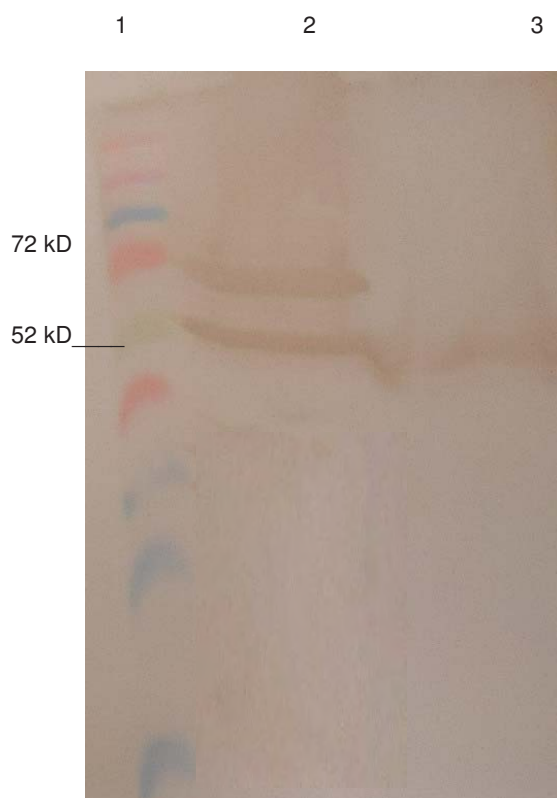


Figura 14. Membrana de Western com “pool” soro de galinha, anticorpos policlonais, para observar a sua reatividade contra a NP recombinante. Na canaleta 1, 5 μ L Marcador de peso molecular (Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder Fermentas); na canaleta 2, fração solúvel da purificação e na canaleta 3, estirpe LaSota concentrada com PEG, indicando a NP própria do VDN.

A proteína NP recombinante obtida em nosso estudo, por meio de clonagem e expressão no sistema pET SUMO - *E. coli* e que foi purificada em resina de Níquel-Agarose, demonstrou a sua capacidade de se combinar de forma específica com anticorpos de aves hiperimunizadas com a estirpe LaSota do VDN, sugerindo que a integridade antigênica foi mantida nessa proteína recombinante e ainda que ela preservou os principais epítomos demonstrados pela proteína nativa do VDN. Dessa forma, pode-se considerar que a proteína NP recombinante do VDN aqui produzida, tem atributos satisfatórios para ser produzida em larga escala a fim de ser aplicada em técnicas de imunodiagnóstico para o VDN.

5.8. Desenvolvimento de um método indireto de ELISA com a proteína NP recombinante do VDN expressa em *E. coli* (NP-VDN-ELISA)

Os resultados da mensuração de anticorpos contra o VDN obtidos no teste de HI e no teste de ELISA têm sido constantemente avaliados e correlacionados no sorodiagnóstico da DN em aves, tendo ficado evidenciado, na maioria dos estudos, valores moderados a elevados de correlação, sensibilidade e especificidade (BROWN, 1990; CZIFRA et al., 1998). No presente trabalho buscou-se desenvolver um método alternativo de ELISA indireto para detecção de anticorpos anti-VDN, utilizando como antígeno a proteína NP recombinante do VDN expressa em *E. coli*, e compará-lo com o teste padrão de sorodiagnóstico HI. Sabe-se que outros pesquisadores já utilizaram, com bons resultados, as proteínas de nucleocapsídeo de outros vírus como o vírus da caxumba, o vírus do sarampo, o vírus da estomatite vesicular, o vírus da peste bovina, vírus da bronquite infecciosa das galinhas, o vírus da raiva e do próprio VDN em adsorção a superfície de microplacas de ensaios imunoenzimáticos (LINDE et al., 1987; REID-SANDEN et al., 1990; HUMMEL et al., 1992; AHAMAD et al., 1993; KAMATA et al., 1993; ERRINGTON et al., 1995; NDIFUNA et al., 1998; CHEN et al., 2003 e LOA et al., 2004).

Assim, em nosso estudo, foram determinados os níveis de sensibilidade, especificidade, acurácia e correlação, bem como os valores preditivos positivos e negativos e a concordância do NP-VDN-ELISA em relação ao teste de HI, parâmetros esses que não foram discriminados de forma clara e objetiva no trabalho de clonagem e expressão NP do VDN em células de insetos infectadas por baculovírus.

O teste NP-VDN-ELISA foi padronizado, a partir de uma titulação em bloco, colocando-se para reagir várias concentrações da proteína NP recombinante, previamente adsorvidas às cavidades da microplaca com diferentes diluições dos soros de galinha positivo e negativo de referência para o VDN, abrangendo desde a diluição 1:100 até 1:3200. Verifica-se que os resultados, mensurados como densidades ópticas (D.O.s) apresentaram uma variação do tipo dose-resposta, isso significa que foram maiores, para as maiores concentrações da NP recombinante, usadas como antígeno e

também com as menores diluições do soro positivo de referência para o VDN (Figura 15), sendo que este ensaio imunoenzimático permitiu de forma clara e segura a distinção entre os soros de referência positivo e negativo.

Em face desses resultados foram definidas as condições ideais para serem aplicadas no teste NP-VDN-ELISA, as quais corresponderam a 4 µg/mL da proteína recombinante NP, como antígeno a ser adsorvido a fase sólida da reação e a diluição única de 1:400 dos soros de galinhas. Observações muito semelhantes as nossas de padronização do teste de ELISA para a detecção de anticorpos de galinhas contra o VDN, foram relatadas com a proteína N recombinante do VDN expressa em células de inseto infectadas por baculovírus (ERRINGTON et al., 1995, MAKKAY et al., 1998).

Ainda, a análise de 24 amostras de soros de aves do controle negativo (não vacinadas e não infectadas) revelou ponto de corte em valor A/P de 0.112 (média do valor A/P +/- 3x desvio padrão).

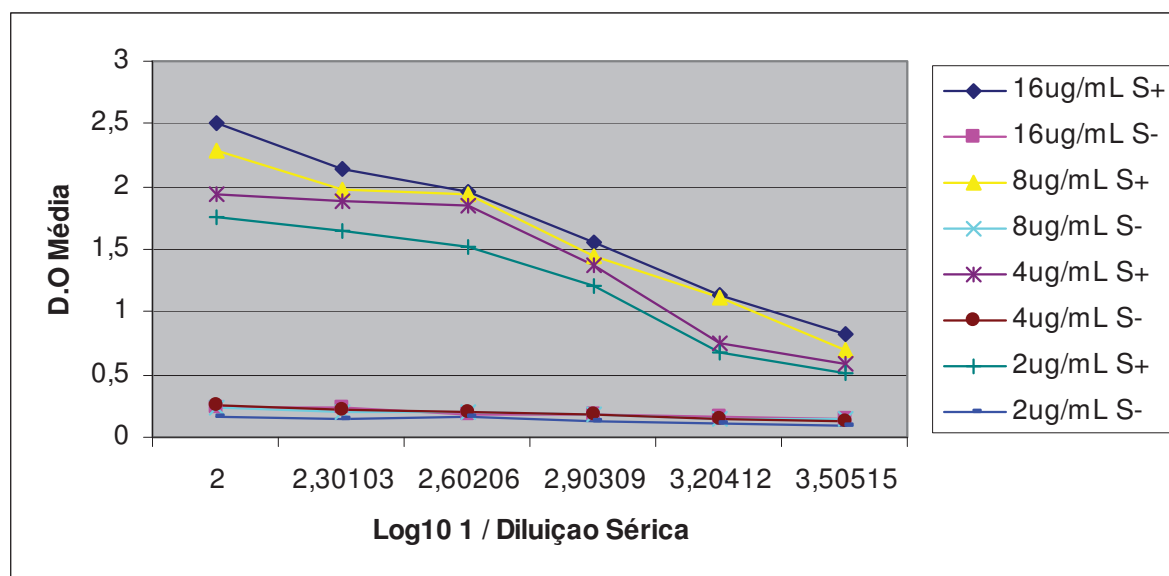


Figura 15. Titulação em bloco pelo método indireto de ELISA realizado com diferentes concentrações da proteína recombinante da estirpe LaSota do VDN expressa em *E. coli*, ensaiando-se amostras de soro positivo e soro negativo de galinha, em diluições de 1:100 a 1:3200.

5.9. Relações entre os resultados do NP-VDN-ELISA e do teste de HI usados na detecção de anticorpos contra o VDN

Na literatura, existem vários estudos de comparação de diferentes métodos de ELISA (indireto, competitivo, dentre outros) com o teste de HI para a mensuração de anticorpos contra o VDN, nos quais foram obtidos coeficientes de correlação significantes entre essas duas técnicas. Em relação a análise comparativa dos testes de ELISA e de HI com o grupo de 125 amostras séricas de aves de postura ou de corte, proporcionaram um coeficiente de correlação significativa ($r = 0,8345$) e uma concordância entre os testes de NP-VDN-ELISA e de HI ($k = 0,72$).

Na literatura, verifica que foram observados tanto valores de correlação superiores aos encontrados nesse estudo ($r = 0,8345$) em soros de galinhas vacinadas contra o VDN por THAYER et al. (1986) ($r = 0,98 / r = 0,95$); WITT et al. (1992) ($r = 0,95$) e RICHTZENHAIN et al. (1993) ($r = 0,96$), como valor semelhante ao nosso estudo, BROWN et al. (1990) observou ($r = 0,85$) e CVELICCABRILO et al. (1992) encontraram ($r = 0,85$) enquanto CZIFRA et al. (1998) demonstraram valores inferiores de ($r = 0,72$). Enquanto que, para ADAIR et al. (1989), obtiveram valores de correlação de ($r = 0,75$), ao testarem soros de galinhas e perus; KOCH et al. (1998) encontrou ($r = 0,71$) ao comparar o ELISA e HI com amostras de soros de avestruzes e HAUSLAIGNER et al. (2009) com ($r = 0,652$) de amostras de soros de patos e gansos vacinados e não-vacinados. De qualquer sorte, pode-se antever a ocorrência de alguns resultados desencontrados entre o NP-VDN-ELISA desenvolvido nesse estudo e o teste de HI, já que se tratam de alvos antigênicos bem distintos, ou seja, a proteína NP e a glicoproteína HN, respectivamente. A respeito disso, o coeficiente de correlação encontrado entre o NP-VDN-ELISA e o HI pode ser classificado como de moderado a elevado ($r = 0,8345$), sugerindo que as amostras de soro de galinhas submetidas à imunização com o VDN, no geral, contêm anticorpos para esses dois tipos de antígenos.

Verifica-se também que os títulos de anticorpos HI variaram de 0,301 a 4,612 (Log10 título), enquanto que os níveis de anticorpos do NP-VDN-ELISA variaram de -

0,004 a 1,565 (valor A/P), conforme ilustra a Figura 15. Por mais que os resultados mencionados anteriormente sejam semelhantes, deve-se salientar que no HI a reação antígeno-anticorpo ocorre devido a presença das glicoproteínas de superfície HN e em nosso teste (NP-VDN-ELISA), apenas a proteína NP recombinante do VDN está adsorvida à superfície das microplacas,

Além disso, os resultados obtidos no teste HI, tido como padrão-ouro para a detecção e/ou mensuração de anticorpos contra o VDN, e no NP-VDN-ELISA, mostraram que as aves de postura produziram quantidades relevantes de anticorpos após as imunizações contra o VDN. Ambos os testes realizados detectaram no soro sanguíneo das aves de postura níveis de anticorpos (Ac) anti-VDN variando de moderado a elevado. Isso ocorreu, principalmente, devido ao fato de terem sido testadas amostras obtidas de aves que haviam recebido quatro doses de vacinas atenuadas contra o VDN o que pode ser considerado um protocolo de indução de hiperimunização, a qual em condições experimentais levou a produção de altos títulos de anticorpos contra o VDN o que é importante para a indústria avícola por garantir altos títulos de anticorpos maternos nos pintinhos (VILLEGAS & AVELLANEDA,1992).

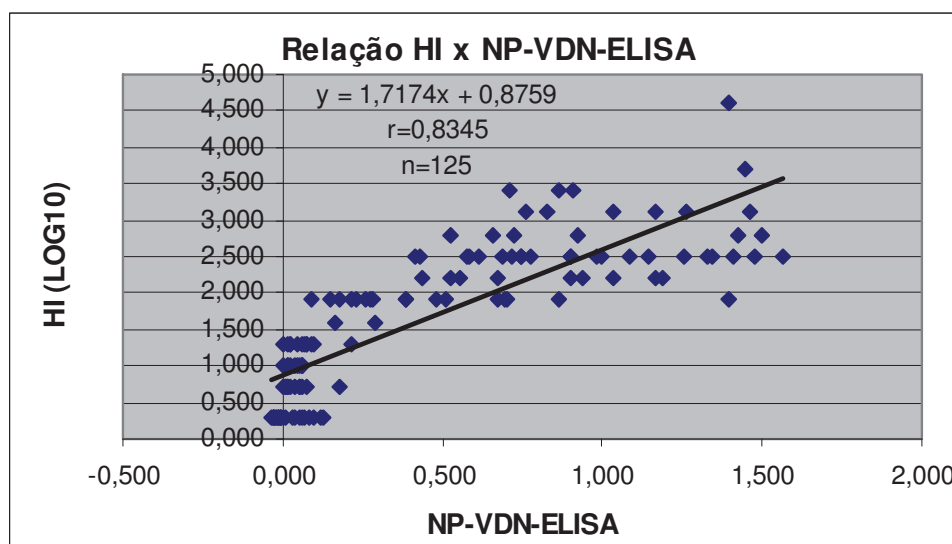


Figura 16. Correlação entre os níveis de anticorpos detectados pelo teste de HI (Log10 Título) e pelo NP-VDN-ELISA (Valor A/P).

Em contrapartida, os anticorpos induzidos por vacinas recombinantes construídas a partir das glicoproteínas de membrana (HN e F) do VDN expressas células eucariontes infectadas por poxvírus ou em *Pichia pastoris* (BOURSNELL et al., 1990; OGAWA et al., 1990; TAYLOR et al., 1990; PEETERS et al., 2000) não apresentariam reações com a proteína NP no ELISA aqui desenvolvido, mas esses soros poderiam ser mais facilmente diferenciados daqueles provenientes de aves infectadas com o VDN, pois os anticorpos induzidos pela infecção com esse mesmo vírus acarretariam a produção de anticorpos contra a proteína NP, em adição aos anticorpos contra as demais proteínas do VDN. Embora não tenham sido testados em nosso estudo um grupo de soros de aves imunizadas com vacinas recombinantes e portadoras de marcadores de distinção da estirpe viral infectante, pode-se supor que o NP-VDN-ELISA poderia distinguir tais tipos de respostas imunes humorais, da mesma forma que foi demonstrado nos estudos envolvendo a análise de amostras séricas de aves imunizadas com vacinas recombinantes constituídas pelo gene completo HN ou de porções das seqüências desse mesmo gene que são codificadoras de importantes sítios antigênicos da glicoproteína HN (PEETERS et al., 2000; MEBATSION et al., 2002).

Além disso, para validação do teste de NP-VDN-ELISA, os seus resultados foram comparados com os do teste de HI (Tabela 1). Dos 125 soros analisados, 92 e 21 foram concordantes nesses dois métodos sorológicos e classificados como positivos e negativos, respectivamente, sendo que 11 soros apresentaram reação de falso-negativa no teste de ELISA e um soro apresentou essa reação no teste de HI (Tabela 1). Paralelamente à aplicação dos ensaios imunoenzimáticos na sorologia da DN, torna-se fundamental a determinação de pontos de corte adequados para o estabelecimento de índices de sensibilidade e especificidade do teste (GREINER et al., 1995), sendo mais recomendado a utilização do cálculo desse parâmetro por meio da análise por TG-ROC, diferentemente do que foi feito no presente estudo. Porém a determinação do ponto de corte baseou-se na média acrescida de três desvios padrão, similar ao que foi realizado por SOUSA et al. (2000). De posse desses dados foi determinada a sensibilidade relativa do NP-VDN-ELISA, que correspondeu a 89,3%. Em relação a reações falso-

positivas, o ELISA apresentou um soro, o que corresponde a uma especificidade relativa de 95,5%. Os valores preditivos negativos e preditivos positivos foram respectivamente, 65,6% e 98,9%, enquanto que a acurácia foi de 90,4% (Tabela 1.).

SOUSA et al. (1999) testarem soros de aves de corte vacinadas contra o VDN e ao comparar os resultados entre o Sandwich ELISA com Duplo Anticorpo (DAS-ELISA) e HI, verificaram uma acurácia para o DAS-ELISA relativa ao teste de HI foi de 88,8%, ligeiramente inferior a verificada no presente estudo, porém uma especificidade de 100% foi constatada enquanto que a sensibilidade foi de 88,80%, que é ligeiramente inferior a sensibilidade obtida para o nosso teste em relação ao HI.

Ademais, em um outro trabalho de SOUSA et al. (2000), quando o ponto de corte do ELISA foi determinado por análise do programa TGROC e não se baseou na média acrescida de três desvios padrão, tal como foi realizado no presente estudo, foram observados resultados um pouco melhores de sensibilidade relativa do ELISA frente ao HI (90,91%), mas a especificidade relativa sofreu um ligeiro decréscimo para 91,18% e, ainda, o nível de acurácia entre os dois testes foi de 91,02%, e os valores preditivos positivo e negativo foram de 93,02% e 88,57%, respectivamente.

Ainda em relação aos resultados da análise comparativa entre os testes sorológicos de NP-VDN-ELISA com o HI, verifica-se que o ELISA desenvolvido nesse estudo demonstrou uma boa concordância ($k = 0,72$) com o teste de HI. (Tabela 1). A propósito, CZIFRA et al. (1998) relataram uma menor concordância ($k = 0,67$) entre o método competitivo de bloqueio de ELISA e o HI, enquanto que BROWN et al.(1990), KOCH et al. (1998), na análise de soros de galinhas e SOUSA et al. (2000), na análise de soros de ratitas, encontraram um valores maiores ($k = 0,84$; $k = 0,85$ e $k = 0,82$).

Tabela 1. Comparação dos resultados obtidos nas técnicas de HI e ELISA para a detecção de anticorpos para VDN em soros de aves de postura e de corte e análises de validação do teste.

NP-VDN-ELISA	Resultados HI – Padrão ouro		
	Positivos	Negativos	Total
Positivos	92 (a)	1 (b)	93 (a+b)
Negativos	11 (c)	21(d)	32 (c+d)
Total	103 (a+c)	22(b+d)	125(a+b+c+d)

Sensibilidade relativa: $(a) / (a+c) \times 100 = 92/103 \times 100 = 89,3\%$

Especificidade relativa: $(d) / (b+d) \times 100 = 21/22 \times 100 = 95,5\%$

Valor preditivo positivo: $(a) / (a+b) \times 100 = 92/93 \times 100 = 98,9\%$

Valor preditivo negativo: $(d) / (c+d) \times 100 = 21/32 \times 100 = 65,6\%$

Acurácia: $(a) + (d) / (a+b+c+d) \times 100 = (92+21)/125 \times 100 = 90,4\%$

Índice kappa (grau de concordância corrigido): 0,72 (<0,2=pobre; 0,21 a 0,40=fraca; 0,41 a 0,6=moderada; 0,61 a 0,80=boa; >0,80=muito boa)

Concluindo, deve ser ressaltado um aspecto interessante sobre a antigenicidade da proteína NP recombinante produzida pelo sistema pET-SUMO – *E. coli* é que ao se demonstrar a capacidade de interação da proteína NP recombinante com os anticorpos policlonais do soro de galinhas hiperimunizada com o VDN na técnica de “Western-blotting”, pode-se inferir que houve conservação da maior parte dos epítomos lineares nessa proteína, que parecem ser nesse caso os mais importantes nesse tipo de interação antígeno-anticorpo, tal como foi relatado por AHMAD-RAUS (2009). Apesar disso, não se pode descartar a eventual participação de epítomos conformacionais nessa reatividade, se for também levado em conta a reatividade dessa proteína recombinante no ELISA, no qual essa proteína recombinante não sofreu nenhum processo denaturante.

6. CONCLUSÕES

6.1. Os procedimentos de clonagem no vetor pET SUMO do gene codificador da NP do VDN permitiram a inserção na posição e orientação correta do gene de interesse, bem como a transformação em bactérias da espécie *Escherichia coli* com o vetor pET SUMO contendo o inserto do gene da proteína N do VDN foi obtida.

6.2. O sistema de expressão constituído pelo vetor pET-SUMO e *Escherichia coli* demonstrou sua eficiência para a clonagem e a expressão de níveis relevantes da proteína de nucleocapsídeo da estirpe LaSota do VDN fusionada a etiqueta SUMO-Poli-Histidina, facilitando assim a solubilização dessa proteína recombinante, bem como a sua purificação em resina de afinidade.

6.3. A proteína recombinante N expressa pelo sistema pET SUMO – *E. coli* apresenta tamanho molecular e antigenicidade similares aos da proteína N oriunda da estirpe LaSota do próprio VDN.

6.4. O teste NP-VDN-ELISA desenvolvido com a proteína N recombinante e expressa pela bactéria *Escherichia coli* foi capaz de detectar e mensurar com eficiência os anticorpos contra o vírus da doença de Newcastle em soros de galinhas de postura ou de frangos de corte, obtidos em diferentes faixas etárias e frequências de vacinação contra esse vírus, o que ficou caracterizado pelo coeficiente de correlação, e pelos níveis de sensibilidade, especificidade, acurácia e concordância, em relação ao teste padrão de inibição da hemaglutinação (HI), levando a inferir também sobre o bom potencial de utilização do teste de NP-VDN-ELISA para o sorodiagnóstico ou para o monitoramento da infecção com o VDN nos plantéis avícolas, considerando sua maior especificidade e possibilidade de avaliar, de forma mais rápida e prática, um maior número de amostras séricas, do que o teste de HI.

7. REFERÊNCIAS

ADAIR, B. M.; et al. Quantitative estimation of Newcastle disease virus antibody levels in chickens and turkeys by ELISA. **Avian Pathol.**, Huntingdon, v. **18**, p. 175-92, 1989.

AHMAD, D. S.; et al. Immunological characterization of the VSV nucleocapsid (N) protein expressed by recombinant in *Spodoptera exigua* larva: use in differential diagnosis between vaccinated and infected animals. **Virology**, New York, v. 192, n. 1, p. 207-216, 1993.

AHMAD-RAUS R.; et al. Localization of the antigenic sites of newcastle disease virus nucleocapsid using a panel of monoclonal antibodies. **Research in Vet. Sci.**, v. 86, p. 174–182 2009.

ALDOUS E.W.; ALEXANDER D.J. Technical Review: Detection and differentiation of Newcastle disease virus (avian paramyxovirus type 1) **Avian Pathol.**, Huntingdon, v. 30, p. 117–128, 2001.

ALDOUS E.W.; et al. Rapid pathotyping of Newcastle disease virus (NDV) using fluorogenic probes in a PCR assay. **Vet. Microbiol.**, v. 80, p. 201–212, 2000.

ALEXANDER, D. J.; PARSONS, G; MARSHALL, R. Infection of fowls with Newcastle Disease Virus by food contaminated with pigeons faeces. **Vet. Record.**, Huntingdon, v. 115, p. 601-602, 1984.

ALEXANDER, D. J.; PARSONS, G. Pathogenicity for chickens of avian paramyxovirus type 1 isolates obtained from pigeons in Great Britain during 1983-1985. **Avian Pathol.**, Huntingdon, v. 15, p. 487-493, 1986.

ALEXANDER, D. J. Newcastle disease vírus – an avian paramyxovirus. In: ALEXANDER, D. J. **Newcastle disease**. Boston: Kluwer Academic. p. 11- 22, 1988

ALEXANDER, D. J. Newcastle disease and other paramyxovirus infections. In: Hofstad, M. S.; Barnes, H. J.; Calnek, B. W.; Reid, W. M.; Yoder, H. N. **Diseases of Poultry**. 9th ed. Ames: Iowa State University Press, p. 496-519, 1991.

ALEXANDER, D.J. HOFSTAD, M.S.; BARNES, H.J.; CALNEK, B.W.; REID, W.M.; YODER, H.N, Newcastle disease and other paramyxovirus infections. In: **Diseases of Poultry**. 10th ed. Ames: Iowa State University Press, p. 541-569, 1997.

ALEXANDER, D.J.; MANVELL, R.J.; In: ALEXANDER, D.J. Proceedings of the joint eighth annual meetings of the national Newcastle disease and avian influenza laboratories of countries of the European union. Italy, 2002.

ALEXANDER D.J. Newcastle disease, other avian Paramyxoviruses and pneumovirus infections: Newcastle disease. In: **Dis. of Poultry**, Saif Y.M., ed. Iowa State University Press, USA, 64–87, 2003.

ARAÚJO F. A. A. et al. Inquérito sorológico em aves migratórias and residentes de Galinhos/RN para detecção do vírus da Febre do Nilo Ocidental and outros vírus. **Bol. Elet. Epid.** 2004. Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/Boletim_eletronico_02_ano04.pdf Acesso em dezembro de 2010.

ALEXANDER, D.J., BELL, J.G., ALDERS, R.G. **Thecnol. Review: Newcastle Disease**. Roma, FAO. p161, 2004

ALEXANDER, D.J. Doença de Newcastle. In REVOLLEDO, L.; FERREIRA, A. J. P

(Orgs). **Patol. Aviária**, São Paulo: Editora Manole Ltda. P. 219-228, 2009.

ARNS, C. W. et. al Paramyxoviridae. In: FLORES, E. F. **Virologia Veterinária**. Santa Maria, Ed UFSM, p 659-687, 2007

BACK, A. **Manual de doenças das aves**. Ed. Coluna do saber, Cascavel, PR, p. 222, 2004.

BANEYX, F. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*. **Curr. Opin. Biotechnol.**, v. 10, p. 411-421, 1999.

BEARD, C. W. Velogenic Newcastle disease. **USDA, ARS, Southeast Poultry Research Laboratory**. Athens, GA. 2008. Disponível em http://www.vet.uga.edu/VPP_gray_book_02/fod/vnd.php Acesso em maio de 2010.

BEARD, C.W., HANSON, R.P. Newcastle disease. In: HOTSTAD, M.S.; et al (ed.), **Dis. of Poultry**, 8^o ed Ames: Iowa State University Press, Ames, p. 452–470, 1984.

BOURSNELL, M. E. G. et al. Insertion of de fusion gene from NDV into a non-essential region in the terminal repeats of fowpox virus and demonstration of protective immunity induced by the recombinant. **J. Gen. Virol.**, v. 71, p. 621-628, 1990

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein of protein-dye binding. **Anal. Biochem.**, v. 72, p. 248-254, 1976.

BRAILE, D. M.; GODOY, M. F. Programas para cálculos estatísticos S diagnostico. For Windows v. 1.8, 1999. Disponível em <http://www.braile.com.br/testscientific.htm#braile> Acesso em Dezembro de 2010.

BRASIL. Ministério da Agricultura e do Abastecimento - MAPA. **Programa Nacional de Sanidade Avícola**. Plano de Contingência para Influenza Aviária e Doença de Newcastle. Brasília, 52p, 2007.

BRETANO, L.; et al. Anticorpos para o vírus da anemia das galinhas em matrizes de corte no Brasil. **Rev. Bras. De Ciên. Avícola**, v.2, n.2, p. 157-179, 2000.

BROWN, J; RESURRECCION, R. S.; DICKSON, T.G. The relationship between the hemagglutination inhibition test and enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of antibody to Newcastle disease. **Avian Dis.** v .34, p.585-587, 1990.

CAMENISCH, G.; BANDLI, R.; HOOP, R. Monitoring of wild birds for Newcastle disease virus in Switzerland using real time RT-PCR. **J. Wildlife Disease**, V. 44, n. 3, p. 772-776, 2008.

CHEN, H.; COOTE, B.; HISCOX, J. A. Evaluation of a nucleoprotein-based enzymelinked immunosorbent assay for the detection of antibodies against infectious bronchitis virus. **Avian Pathol.**, Huntingdon v. 32, n. 5, p. 519-526, 2003.

CLAVIJO, A.; ROBINSON, Y.; BOOTH, T.; MUNROE, F. Velogenic Newcastle disease in imported caged birds. **Canadian Veterinary Journal**, Ottawa. v.41, p.404-406, 2000.

CORREA, O. Doenças Infecciosas dos Animais Domésticos. **Viroses dos Animais**. Rio de Janeiro. v.3, p.88-99, 1970

CREELAN J.L., GRAHAM D.A.; MCCULLOUGH S.J. Detection and differentiation of pathogenicity of avian paramyxovirus serotype 1 from field cases using one-step reverse transcriptase-polymerase chain reaction. **Avian Pathol.**, Huntingdon, v. **31**, p. 493–499, 2002.

CUNHA, R. G.; SILVA, R. A. Isolamento e identificação do vírus da doença de Newcastle no Brasil. **Boletim da Sociedade Brasileira de Med. Vet.**, Rio de Janeiro. v.23, p.17-33, 1955.

CZIFRA, G.; et al. Detection of PMV-1 specific antibodies with a monoclonal antibody blocking enzyme-linked immunosorbent assay. **Avian Pathol.**, Huntingdon, v. **25**, p. 691-703, 1996.

CZIFRA, G. et al. Detection of NDV- specific antibodies and the level of protection provided by a single vaccination in young chickens. **Avian Pathology**. Huntingdon, v. 27, p. 526-565, 1998.

DOMINGO, E. Quasispecies Theory in Virology. **J. of Virology**. v.76, p 463-465, 2002

ERRINGTON, W.; STEWARD, M.; EMMERSON, P.T. A diagnostic immunoassay for Newcastle disease vírus base don the nucleocapsid protein expressed by a recombinant baculovirus. **J. of Virol. Methods**, Amsterdam, v.55, n.3 p. 357-365, 1995.

GIBERTONI, A.M. et al. Deveolpment and Application of a Saccharomyces cerevisiae- Expressed Nucleocapsid Protein-Based Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Detection of Antibodies against Infectious Bronchitis Virus. **J. of Clin. Microb.**, Washington, v. 43, n.4, p. 1982-1984, 2005.

GOHM, D.S.; THUR, B.; HOFMANN, M.A. Detection of Newcastle disease virus in organs and faeces of experimentally infected chickens using RT-PCR. **Avian Pathol.**, Huntingdon, v. 29, p. 143-152, 2000.

GREINER, M; SOHR, D.; GOBEL, P. A.modified ROC analysis for the selection of cut-off values and the definition of intermediate results of sero-diagnostic tests. **J. of Immunol. Methods**, v.185, p.123-132, 1995.

HANAHAN, D. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. **J. Mol. Biol.**, v.166, p. 557-580, 1983.

HANSON, R. P.; BRANDLY, C. A. Identification of vaccine strain of Newcastle disease virus. **Science**, vol 122, p. 156-157, 1955.

HAUSLAIGNER, R.; et al. Evaluation of an indirect enzyme-linked immunosorbent assay to study the specific humoral immune response of Muscovy ducks (*Cairina moschata*) and domestic geese (*Anser anser var. domestica*) after vaccination against Newcastle disease virus. **Avian Pathol**, Huntingdon, v. 32, n. 2, pag 89-95, 2009

HERNÁNDEZ, M. S.; et al. Pesquisa serologica sobre o vírus de la enfermedad de Newcastle em obreros avícolas y um grupo control. **Rev. Cubana de Hig. e Epid.**, v.25, n.1, p. 77-84, 1987.

HOMHUAN, A.; et al. Virosome and ISCOM vaccines against Newcastle disease: preparation, characterization and immunogenicity. **Europ. J. of Pharmaceutical Sciences**. V. 22, p. 459-468, 2004.

HUANG, Z.; et al. The hemagglutinin-neuraminidase protein of Newcastle disease virus determines tropism and virulence. **J. of Virology**. v.78, n.8, p.4176-4184, 2004.

HUMMEL, K.B.; ERDMAN, D.; HEATH, J.; BELLINI, W. J. Baculovirus expression of the nucleoprotein gene of measles virus and utility of the recombinant protein in diagnostic enzyme immunoassays. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v. 30, n. 11, p. 2874-2880, 1992.

ICTV – The International Committee on Taxonomy of viruses. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTV/>>. Acesso em janeiro de 2011.

JORGE, M. A.; et al. Reação respiratória forte não é indicação de melhor resposta imune na vacinação contra a Doença de Newcastle. **Rev. Brasileira de Ciência Avícola**. v.3, p.95, 2002.

KALETA, E. F.; BALDAUF, C. Newcastle disease in free-living and pet birds. In: ALEXANDER, D. J., ed. **Newcastle Disease**. Boston, Mass: Kluwer Academic Publishers, p.197-256, 1988.

KAMATA, H.; et al. Expression in baculovirus expression system of the nucleocapsid gene of rinderpest virus. **J. Virol. Methods**, Amsterdam, v.43, p. 1599-1666, 1993.

KANT, A.; et al. Differentiation of virulent and non-virulent strains of Newcastle disease virus within 24 hours by polymerase chain reaction. **Avian Pathol.**, Huntingdon, v. 26, n. 4, p. 837-849, 1997.

KHO, C. L.; TAN, W, S; YUSOFF, K. Production of the nucleocapsid protein of Newcastle disease virus in *Escherichia coli* and its assembly into Ring- and nucleocapsid-like particles. **J. Microbiol.**, Korea, v. 39, n. 4, p. 293-299, 2001.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during assembly of the head of T₄ bacteriophage. **Nature**, v. 227, p. 680-681, 1970.

LANCASTER, H. J. E. Newcastle disease control by vaccination. **Veterinary Bulletin**, Oxon, v. 34, n. 2, p. 57-76, 1964.

LANCASTER, J. E.; ALEXANDER, D. J. **Newcastle disease: virus and spread: a review of some of the literature**. Ottawa: Departament of Agriculture, 1975.

LANCER, J.A, HOWARD, C.R.The polypeptides of infectious Bronchitis Virus (IBV-41 strain). **J. Gen Virol. Reading**, v.46, p. 349-361,1980.

LEEuw, O.; PEETERS, B; Complete nucleotide sequence of Newcastle disease virus: evidence for the existence of a new genus within the subfamily *Paramyxovirinae*. **J. of General Virol.**, v.80, n.131-139, 1999

LINDE, G. A.; GRANSTROM, M.; ORVELL, C. Immunoglobulin class and Immunoglobulin G subclass enzymelinked immunosorbent assays compared with microneutralization assay for serodiagnosis of mumps infection and determination of immunity. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v. 25, n. 9, p. 1653-1658, 1987.

LOA, C. C. et al., Expression and purification of turkey coronavirus nucleocapsid protein in *Escherichia coli*. **J. Virol. Methods**, Amsterdam, v. 116, n. 2, p. 161-167, 2004.

LU, B.; WEBSTER, R.G.; HINSHAW, V.S. Failure to detect hemagglutination-inhibiting antibodies with intact avian influenza virions. **Infect. Immun.**, v. 38, p. 530-535, 1982.

MAKKAY, A. M.; KRELL P.J.; NAGY E. Antibody detection-based differential ELISA for NDV-infected or vaccinated chickens versus NDV HN-subunit vaccinated chickens. **Vet Microbiol.**, v. 66, p. 209-222, 1998.

MAKRIDES, S.C. Strategies for achieving high-level expression of genes in *Escherichia coli*. **American Society of Microbiol.** V. 60(3), p. 512-538, 1996.

MALAVAZZI, G. **Avicultura: Manual Prático**. São Paulo. p.132-133, 1999.

McNULTY, M. S.; ADAÍR, B. M.; O'LOAN, C. J.; ALLAN, G. M. Isolation of an antigenically unusual paramyxovirus type 1 from chickens. **Avian Pathology**, n. 17, p. 509-513, 1988.

MEBATSION, T.; et al. Newcastle Disease Virus (NDV) Marker Vaccine: an immunodominant epitope on the nucleoprotein gene of NDB can be deleted or replaced by a foreign epitope. **J. of Virology**, v. 76, n. 20, p. 10138-10146, 2002.

MERZ, D. V.; SCHEID, A. S.; CHOPPIN, P.W. Immunological Studies of the Functions of Paramyxovirus Glycoproteins. **Virology**, V. 109, p 94-96, 1981.

MIERS, L.A.; BANKOWSKI, R.A.; ZEE, Y.C. Optimizing the Enzyme-linked Immunosorbent Assay for evaluating immunity of chickens to Newcastle disease. **Avian Dis.**, v.27, p.1112-1125, 1994.

NDIFUNA, A.; WATERS, A. K.; ZHOU, M.; COLLISSON, E. W. Recombinant nucleocapsid protein is potentially an inexpensive, effective serodiagnostic reagent for infectious bronchitis virus. **J. Virol. Methods**, Amsterdam, v. 70, n. 1, p. 37-44, 1998.

NISHIZAWA, M.; et al. Newcastle disease in pekin ducks : response to experimental vaccination and challenge. **Rev. Brasileira de Ciên. Avícola/ Brazilian J. of Poultry Science**, v.09, p.123-125, 2007.

NUNES, J. E. S.; et al. Estudo comparativo da virulência de amostras de vacina do vírus da Doença de Newcastle em galinhas SPF por meio da análise morfométrica da espessura traqueal. **Arq. Bras. de Med. Vet. e Zootec.**, v.54, 2002.

OFFICE INTERNATIONAL EPIZOOTIES DISEASE INFORMATION. (OIE). Newcastle Disease, In: Manual of standarts for diagnostic tests and vaccines. 2008. Disponível em: http://www.oie.int/eng/info/hebdo/AIS_59.HTM#Sec8 Acesso em novembro de 2009.

OGAWA, R.; et al. Recombinant fowpox viruses inducing protetive immunity against Newcastle disease and fowlpox virusus. **Vaccine**, v. 8, p 486-490, 1999.

OLIVEIRA JUNIOR, J.G. et al. Vírus da doença de Newcastle em aves não vacinadas no estado do Rio de Janeiro. **Ciê. Rural**, Santa Maria, v. 33, n.2, 2003.

OLIVEIRA JUNIOR, J.G. et al. Isolamento e caracterização biológica da amostra JAP99 do vírus da doença de Newcastle isolada de patos domésticos (Neta SP) no Rio de Janeiro. **Ciê. Rural**, Santa Maria, v. 35, n.4, 2005.

ORSI, M. A. L. et al. Prevalence of NDV in broiler chickens (*Gallus gallus*) in Brazil. **Brazilian J. of Microbiol.** 41:349-357, 2010.

PHAM, H. M.; et al. Molecular characterization of the nucleocapsid protein gene of Newcastle disease virus strain in Japan and development of a restriction enzyme-based rapid identifying method. **Arch. of Virology**, Austria, v. 149, p. 1559-1569, 2004.

PHAM, H. M.; et al. Loop-mediated isothermal amplification for rapid detection of Newcastle disease virus. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v. 43, p. 1646-1650, 2005.

PRABAKARAN, M.; et al. Development of epitope-clocking ELISA for universal detection of antibodies to human H5N1 influenza viruses. **Plos One**, v. 4, n. 2, 2009.

PEEPLES, M. E. Newcastle disease virus replication. In: ALEXANDER, D. J. **Newcastle Disease**, Ed Baston: Kluwer Academic Publishers, p 45-78, 1988.

PEETERS, B. P. H.; et al. Geration of a recombinat chimeric Newcastle disease virus vaccine that allows serological differentiation between vaccinated and infected animals. **Vaccine**. V. 19, 1616-1627, 2001

PEIRIS, J.S.M.; JONG, M.D.; GUAN, Y. Avian Influenza virus (H5N1): a threat to human health. **Clin. Microbiol. Reviews**, v. 20, n. 2, p. 243-267, 2007.

PERALES, C. Monitoring sequence space as test for the target of selection viruses. **J. Mol. Bio.**, V. 345, p. 451-459, 2005.

REID-SANDEN, F.L.; et al. Rabies diagnostic reagentes prepared from a rabies N gene recombinant expressed in baculovirus (published erratum appears in) **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v. 28, n. 5, p. 858-863, 1990.

RICHTZENHAIN, J. L.; et al. Relation between the hemagglutination inhibition test and indirect ELISA in serologic monitoring of laying Hens submitted to different sytems of vaccination against Newcastle disease. **Rev. Microbiol.**, Sao Paulo, v.24, p.187-91, 1993.

RIVETZ, B.; et al. Evaluation of a novel rapid kit for the visual detection of Newcastle disease virus antibodies. **Avian Dis.** Kennet Square, v 29, p.929-942, 1985.

ROWE, T.; ABERNATHY, R.A.; PRIMMER, J.H.; THOMPSON, W.W.; LU, X.; LIM, W.; FUKUDA, K.; COX, N.J.; KATZ, J.M. Detection of antibody to avian influenza A (H5N1) virus in human serum by using a combination of serologic assays. **J. of Clin. Microbiol.**, Washington, v. 37, n. 4, p. 937-943, 1999.

SAMSON, A. C. R. Virus structure. In: ALEXANDER, D. J., ed. **Newcastle Disease**. Boston: Kluwer Academic, p.23-44, 1988.

SANTOS, J. A. A ocorrência da doença de Newcastle no Brasil (nota prévia). **Rev. de Prod. Animal**, v. 1, n. 1, p. 5 -12, 1954.

SEAL, B.; et al. Phylogenic relationships among highly virulent Newcastle disease virus isolates obtained from exotic birds and poultry from 1989 to 1996. **J. Clin. Microbiol.**, Washington v. 36, p.1141-5, 1998.

SEAL, B. S; KING, D. J; SELLERS, H.S. The avian response to Newcastle disease virus. **Developmental & Immunology**, v. 24, p. 257-268, 2000.

SICK, H. **Ornitol. Brasileira**. 4 ed. Rio de Janeiro: Editora Nova Fronteira. p.118, 2001.

SILVA, R. A. Isolamento do vírus da Doença de Newcastle em faisão. Veterinária (D. A. da Escola Nacional de Veterinária), Rio de Janeiro. v. 8, n. 4, p. 41-43, 1954.

SILVA, J. S. A. et al. Newcastle disease virus infection in sparrows (*Passer domesticus*, Linneaus, 1758) captured in poultry farms of agreste region of the State of Pernambuco. **Rev. Bras. de Ciên. Avícolas**, Campinas, v. 8, n. 2, p. 125-129, 2006.

SILVA, K.R., et al. Estudo comparativo entre os testes de HI e o ELISA-lectina para a detecção de anticorpos contra o VDN em frangos de corte vacinados. **Rev. Biológico**, São Paulo, v.71, n.2, p.88, 2009.

SHAFER, A. L.; KATZ, J. B.; EERNISSE, K. A. Development and validation of a competitive enzyme-linked immunosorbent assay for detection of type A influenza antibodies in avian sera. **Avian Dis.**, Kennet Square, v. 42, p. 28–34, 1998.

SINGH, S.M., PANDA, A.K. Solubilization and refolding of bacterial inclusion body proteins. **J. of Biosc.and Bioengineering** 99(4): 303-310, 2005.

SNOECK C. J., et al. Newcastle disease virus in West Africa: new virulent strain Identified in non-commercial farms. **Arch. Virol.**, DOI: 10.1007/s00705-008-0269-5, 2008.

SNYDER, D. B., et al. Rapid serological profiling by enzyme – linked immunosorbent assay III. Simultaneous measurements of antibody titers to infectious bronchitis ,

infectious bursal disease, and Newcastle disease viruses in a single serum dilution. **Avian Dis.**, Kennet Square, v. 25, p. 213-222, 1983.

SOUSA, R. L. M., et al. Comparison between the Indirect ELISA, Sandwich ELISA and Hemagglutination Inhibition Test for the detection of antibodies against Newcastle disease virus. **Rev. Bras. de Ciênc. Avícolas / Brazilian J. of Poultry Science**, Brasil, v. 01, n. 01, p. 43-47, 1999.

SOUSA, R. L. M., MONTASSIER, H. J., PINTO, A. A. Detection and Quantification of Antibodies to Newcastle Disease Virus in Ostrich and Rhea Sera Using a Liquid Phase Blocking Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. **Clin. and Diag. Laboratory Immunology**, v.7, n.6, p.940 - 944, 2000.

SOUSA, R. L. M. Avaliação do estado imune humoral de emas (*Rhea americana*) e avestruzes (*Struthio camelus*) frente ao vírus da doença de Newcastle através do método de bloqueio em fase líquida do ELISA. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – **Universidade de São Paulo**, São Paulo, SP. 78 p, 2000.

STUDIER, F.W. et al. Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes. **Methods Enzymol.**, v.185 p.60-89, 1990.

TAYLOR, J.; et al. Newcastle disease virus fusion protein expressed in a fowpox virus recombinant confers protection in chickens. **J. Virol.**, v. 64, 1990

THAYER, S. G.; VILLEGAS, P.; FLETCHER, O. J. Comparasion of two commercial Enzyme-Likeed Assays and conventional methods for avian serology. **Avian Dis**, v. 31, n. 1, p. 120-124, 1986.

TOWBIN, H.T. et al. Eletrophoretic transfer of protein from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Produce and some applications. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, USA, Washington, v. 76, n. 1, p. 4350-4354, 1979.

TSUMOTO, K., UMETSU, M., KUMAGAI, I., EJIMA, D., ARAKAWA, T. Solubilization of active green fluorescent protein from insoluble particles by guanidine and arginine. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 312:1383-1386, 2003.

YUSOFF, K.; TAN, W.S. Newcastle disease virus: macromolecules and opportunities. **Avian Pathol.**, Huntingdon, v. 30, p. 439-455, 2001.

VERNOERD, D. J. Ostrich diseases. **Rev. Sci. Tech. Off Int. Epiz.**, v. 19, n.2, p. 638-661, 2000.

VIANNA, J. S. M.; et al. Identificação e caracterização biomolecular do vírus da doença de Newcastle pela técnica de RT-PCR. **Rev. Bras. Med. Vet.**, v. 22, n. 4, 2000.

VILLEGAS, P.; AVELLANEDA, G. Interpretacion de resultados serológicos em bronquitis infecciosa. **Avicultura Professional**, v.10, n.1, 1992.

WALSH, G. **Biopharmaceuticals**: biochemistry and biotechnology. London: Wiley, p. 94, 1998.

WARNER, O. Newcastle disease. In: Blaha, T. (ed.), *Appl. Vet. Epidemiol.*, **Elseveir**, Amsterdam, p. 73–76, 1989.

WILSON, R.A., et al. **An enzyme-linked immunosorbent assay that measures protective antibody levels to Newcastle disease virus in chickens**, 1984.

WHITE, E.G., JORDAN, F.T.W. **Newcastle Disease: Vet Prev Med.** Baillaire, Tindall & Cox Ltd, London, p. 128–137, 1963.

ZUO, X., et al. Expression and purification of SARS coronavirus proteins using SUMO-fusions. Elsevier. **Prot. Expr. & Purif.** Amsterdam, v. 42, p. 100-110, 2005