

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**DESENVOLVIMENTO E APLICAÇÃO DO ELISA INDIRETO
COM A NUCLEOPROTEÍNA RECOMBINANTE (NPR) DO
VÍRUS DA DOENÇA DE NEWCASTLE**

Ketherson Rodrigues Silva
Médico Veterinário

2015

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**DESENVOLVIMENTO E APLICAÇÃO DO ELISA INDIRETO
COM A NUCLEOPROTEÍNA RECOMBINANTE (NPR) DO
VÍRUS DA DOENÇA DE NEWCASTLE**

Ketherson Rodrigues Silva

Orientador: Prof. Dr. Helio José Montassier

Tese apresentada à Faculdade de Ciências
Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de
Jaboticabal, como parte das exigências para a
obtenção do título de Doutor em Medicina
Veterinária, área de Patologia Animal

2015



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

CAMPUS DE JABOTICABAL

FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS DE JABOTICABAL

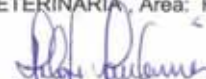
CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: DESENVOLVIMENTO E APLICAÇÃO DO ELISA INDIRETO COM A NUCLEOPROTEÍNA RECOMBINANTE (NPR) DO VÍRUS DA DOENÇA DE NEWCASTLE

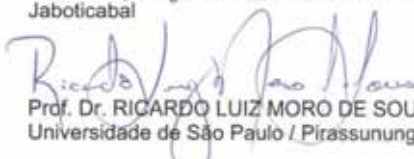
AUTOR: KETHERSON RODRIGUES SILVA

ORIENTADOR: Prof. Dr. HELIO JOSE MONTASSIER

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de DOUTOR EM MEDICINA VETERINÁRIA, Área: PATOLOGIA ANIMAL, pela Comissão Examinadora:

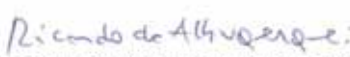

Prof. Dr. HELIO JOSE MONTASSIER

Departamento de Patologia Veterinária / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal

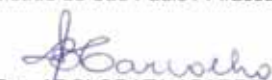

Prof. Dr. RICARDO LUIZ MORO DE SOUSA
Universidade de São Paulo / Pirassununga/SP


Prof. Dr. ANTONIO CARLOS PAULILLO

Departamento de Patologia Veterinária / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal


Prof. Dr. RICARDO DE ALBUQUERQUE

Universidade de São Paulo / Pirassununga/SP


Profa. Dra. ADOLORATA APARECIDA BIANCO CARVALHO

Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal

Data da realização: 15 de junho de 2015.

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

Ketherson Rodrigues Silva – Nascido em 25 de 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. Ingressou no mestrado em março de 2009, no Programa de Pós - graduação em Medicina Veterinária área de Patologia Animal na FCAV/UNESP/Jaboticabal, como bolsista CAPES, tendo obtido o título de Mestre em fevereiro de 2011. Ingressou no curso de doutorado em março de 2011, no mesmo programa e área como bolsista CAPES, na FCAV/UNESP/Jaboticabal.

*O Homem é o único animal que cospe na água onde bebe;
O Homem é o único animal que mata prá não comer;
O Homem é o único animal que corta a árvore que lhe dá sombra e frutos.
Por isso está se condenando à morte.*

(Palavras do Velho do Rio)

Benedito Ruy Barbosa.

ÀS 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.

Odorico (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 e Júlia Hellena, minhas afilhadas e sobrinhas...

Anjinhos que Deus colocou em nossas vidas.

Dedico...

AGRADECIMENTOS

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

Ao **Prof. Dr. Helio José Montassier**, que me orientou de forma pacienciosa e incentivadora, pela transmissão dos infinitos conhecimentos, pela amizade e pela confiança que me concedeu de realizar este trabalho, a quem serei agradecido até o fim de minha vida;

Aos Professores **Dr. Ângelo Berchieri Júnior, Dr. Antonio Carlos Paulillo, Dr. Fernando Antonio Ávila** e a **Dra Rosangela Zacarias Machado**, pela disponibilidade no uso dos equipamentos de seus laboratórios;

Aos membros da banca de qualificação, **Profa. Dra. Adolorata Aparecida Bianco Carvalho, Prof. Dr. Antonio Carlos Paulillo, Prof. Dr. Everlon Cid Rigobelo** e a **Dra. Daniela Gomes da Silva**, pela disponibilidade em participar do exame de qualificação;

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

Aos Mestres e Doutores **Aliandra Gibertoni Malaman, Cecília Maria Amaral, Camila Cesário Fernandes, Diego Felipe Alves Batista, Elisabete Schirato de Oliveira, Filipe Santos Fernando, Mariana Gonçalves, Priscila Diniz e Romeu Moreira**, pela amizade e pelos conhecimentos que contribuíram para a elaboração deste trabalho, jamais me esquecerei das contribuições de vocês

A **Maria de Lurdes Feres Tamanini “Lurdinha, ou ainda, Lulu”**, pessoa amiga que sempre me ajudou e incentivou nos momentos mais difíceis desse trabalho e na minha vida pessoal;

Aos amigos **Adriana, Bruno, Cecília, Clarissa, Elisa, Filipe, Henrique, Keila, Livia, Mariana, Marita, e Vitor**, pelo companheirismo e ajuda em muitos momentos difíceis e, também, pelas alegrias que dividimos;

Aos amigos e funcionários **Assis, Edna, João (*in memoriam*), Rosângela e Silvina**, excelentes profissionais e amigos do Departamento de Microbiologia;

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

Às unidades do **Instituto Biológico de Bastos e Descalvado-SP**, pelo auxílio na obtenção de amostras de sangue de aves de postura de granjas comerciais e, em especial, aos pesquisadores **Msc. Elisabete Ap. Lopes Guastali, Dra. Nilce Soares Gama e Msc. Renato Luis Luciano**, profissionais sempre muito prestativos e atenciosos;

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

À **CAPES** pela bolsa auxílio concedida;

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

Às **aves**, que tiveram suas vidas solicitadas para esse projeto

.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE QUADROS.....	x
LISTA DE TABELAS	xi
LISTA DE FIGURAS	xii
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xv
CERTIFICADO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS - CEUA.....	xvii
RESUMO.....	xviii
ABSTRACT.....	xix
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	2
2.1 Doença de Newcastle – etiologia e aspectos estruturais	2
2.2 Resistência e patogenia	7
2.3 Epidemiologia da doença de Newcastle	10
2.4 Medidas de controle e prevenção para a Doença de Newcastle.....	13
2.5 Diagnóstico laboratorial	15
2.6 Produção de antígenos recombinantes	19
3. OBJETIVOS.....	23
3.1 Objetivo geral	23
3.2 Objetivos específicos.....	23
4. MATERIAL E MÉTODOS	24
4.1 Obtenção do antígeno recombinante (NPr-VDN)	24
4.2 Purificação e Caracterização da NPr-VDN.....	24
4.3. Amostras de soros e lágrimas para aplicação no teste de ELISA indireto para os isótipos de IgA, IgM e IgG	24
4.3.1 Amostras de soro de galinhas de postura	25
4.3.2 Amostras de soro e de lágrima de aves de postura infectadas experimentalmente com estirpe vacinal LaSota para a determinação da cinética da produção de anticorpos anti-VDN específicos dos isótipos IgA, IgM e IgG.....	26

4.3.3 Amostras de soro e lágrima negativos para o VDN	26
4.3.4 Preparo de soro de referência positivo contra o VDN	26
4.4 Método de ELISA indireto com NPr para a detecção de anticorpos anti-VDN dos isótipos IgA, IgM e IgG (ELISAI-NPr-IgA / IgM / IgG)	27
4.5 Teste de inibição da hemaglutinação (HI)	28
4.6 Análise dos resultados dos testes ELISAI-NPr-IgA / IgM / IgG	30
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	31
5.1 Purificação da NPr do VDN e análise pelas técnicas de SDS-PAGE e de Western blotting	31
5.2 Titulação em bloco da NPr do VDN frente aos soros e lágrimas de referências positivas e negativas	36
5.3 Aplicação do teste de ELISAI-NPr-IgA / IgM / IgG para a detecção de anticorpos específicos em aves experimentalmente infectadas	40
5.4 Aplicação do teste do ELISAI-NPr-IgA / IgG / IgM para a detecção de anticorpos anti-virais específicos em amostras de soro e lágrima de aves de postura comercial	42
5.5 Relações entre os resultados do ELISAI-NPr-IgM / IgG-Soro e do teste de HI usados na detecção de anticorpos contra o VDN	50
6. CONCLUSÃO	58
7. REFERÊNCIAS.....	59

LISTA DE QUADROS

Página

Quadro 1. Descrição dos diferentes parâmetros utilizados para titulação em bloco da NPr do VDN e das amostras de soro e de lágrima de referências positiva e negativa. 27

Quadro 2. Descrição dos parâmetros obtidos pela titulação em bloco da NPr do VDN, das amostras de soro e de lágrima de referências positiva e negativa e da diluição ideal de uso do conjugado imunoenzimático para cada isótipo pesquisado.39

Quadro 3. Descrição do ponto de corte em valor A/P (média do valor A/P + 3x desvio padrão) para cada um dos diferentes isótipos IgA, IgG e IgM, bem como para as diferentes amostras (soro e lágrima).39

LISTA DE TABELAS

Página

- Tabela 1.** Resultados do ELISAI-NPr-IgM / IgG para detecção de anticorpos anti-VDN dos isótipos IgG e IgM em amostras de soro de aves postura comercial.46
- Tabela 2.** Resultados do ELISAI-NPr-IgA / IgM / IgG para detecção de anticorpos anti-VDN dos isótipos IgA, IgG e IgM em amostras de lágrima de aves postura comercial.47
- Tabela 3.** Comparação dos resultados obtidos nas técnicas de HI e ELISA-NPr-IgG-SORO para a detecção de anticorpos para VDN em soros de aves de postura comercial e análises de validação do teste.57
- Tabela 4.** Comparação dos resultados obtidos nas técnicas de HI e ELISA-NPr-IgM-SORO para a detecção de anticorpos para VDN em soros de aves de postura comercial e análises de validação do teste.57

LISTA DE FIGURAS

Página

Figura 1. Esquema do genoma e organização das proteínas estruturais do VDN. Estão destacadas as seis proteínas: a proteína de nucleocapsídeo (NP); a fosfoproteína (P); a grande proteína polimerase (L); a proteína de matriz (M); a glicoproteína hemaglutinina-neuraminidase (HN) e a glicoproteína de fusão (F). Disponível em: http://viralzone.expasy.org/all_by_species/556.html. Acesso em 23/12/2014. 4

Figura 2. Representação esquemática do ciclo de replicação dos Paramyxovirus. Adaptado de Lamb e Parks (2007). 6

Figura 3. (A) Caracterização por SDS-PAGE da rNP expressa em *E. coli* do clone A1. Canaleta 1: 5 µL Marcador molecular (spectra multicolor broad range protein ladder de 10 – 260 kDa, Thermo Scientific, Rockford, IL); canaleta 2: fração da cultura não induzida com IPTG (controle negativo da expressão); canaleta 3: fração induzida do clone A1 e canaleta 4: fração do extrato da cultura de *E. coli* com apenas o vetor pET SUMO sem o inserto do gene NP do VDN (controle positivo da expressão da “etiqueta” SUMO-Poli-His). (B) Caracterização por Western blotting (membrana espelho do gel de poliácridamida/A) da NPr, onde foi usado Ac monoclonal anti-poli-histidina na diluição 1:2500. As setas destacam a produção da NPr. 32

Figura 4. (A) 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 de 10-260kDa, Thermo Scientific, Rockford, IL); canaleta 2: fração colhida do sobrenadante após a etapa de ligação da NPr à resina de níquel-agarose; canaletas 3 e 4: frações das etapas de lavagens (primeira e última) do lisado da resina de níquel-agarose após a etapa de ligação; canaletas 5, 6 e 7: extrato protéico purificado em resina de níquel-agarose do lisado da cultura de *E. coli* contendo a NPr após as etapas de lavagens. (B)

Caracterização por Western blotting (membrana espelho do gel de poliacrilamida - A) da NPr, onde foi usado Ac monoclonal anti-poli-histidina na diluição 1:2500. 34

Figura 5. Membrana de Western blotting com “pool” de soros de galinha contendo Acs policlonais, para observar a sua reatividade contra a NP recombinante. Canaleta 1: 5 µL Marcador de peso molecular (spectra multicolor broad range protein ladder de 10 – 260kDa, Thermo Scientific, Rockford, IL); canaleta 2: fração solúvel da purificação (primeira eluição) e canaleta 3: estirpe LaSota concentrada com PEG, indicado pela seta a NP própria do VDN. As setas da canaleta 2 indicam a NPr expressa em duas diferentes alturas, a superior indica no tamanho de 66kDa e inferior de 53KDa. 35

Figura 6. Titulação em bloco pelo método indireto de ELISA de diversas diluições de soros de galinha positivo e negativo de referência para o VDN, frente a diferentes concentrações da NPr do VDN produzida em *E. coli* para a detecção dos isótipos IgG (A) e IgM (B) de anticorpos contra o VDN. As setas indicam a concentração de uso para NPr e da diluição de uso para o soro. 37

Figura 7. Titulação em bloco pelo método indireto de ELISA de diferentes diluições de lágrimas de galinha positiva e negativa de referência para o VDN (diluídos de 1:25 até 1:800), frente a diferentes concentrações da NPr do VDN produzida em *E. coli* para a detecção dos isótipos IgA (A), IgG (B) e IgM (C) de anticorpos contra o VDN. As setas indicam a concentração de uso para NPr e da diluição de uso para a lágrima. 38

Figura 8. Cinética das respostas de anticorpos dos isótipos IgM ou IgG no soro de aves experimentalmente infectadas com a estirpe vacinal LaSota, do VDN, determinada pelo ELISAI-NPr-IgM / IgG usando a NPr produzida em *E. coli* da linhagem ER2566 e transformados com a construção plasmidial pETSUMO-NPr. Os níveis de anticorpos estão expressos como valores A/P médios. 41

Figura 9. Cinética das respostas de anticorpos dos isótipos IgA, IgM ou IgG na lágrima de aves experimentalmente infectadas com a estirpe vacinal LaSota do VDN

determinada pelo ELISAI-NPr-IgA / IgG / IgM usando a NPr produzida em *E. coli* da linhagem ER2566 e transformados com a construção plasmidial pETSUMO-NPr. Os níveis de anticorpos estão expressos como valores A/P médios..... 42

Figura 10. Frequência relativa entre a quantidade de amostras classificadas em IgG positiva, IgM positiva, individualmente, e IgG e IgM positiva, simultaneamente, no compartimento sistêmico (soro sanguíneo) de aves de postura comercial.48

Figura 11. Frequência relativa entre a quantidade de amostras classificadas em IgA positiva, individualmente, IgA e IgG positivas, IgA e IgM positivas, e IgA, IgG e IgM positivas simultaneamente, no compartimento de imunidade local (lágrima) de aves de postura comercial. 49

Figura 12. Correlação entre os níveis de anticorpos detectados pelo teste de HI (Log_{10} Título) e pelo ELISAI-NPr-IgG-SORO (Valor A/P)..... 54

Figura 13. Correlação entre os níveis de anticorpos detectados pelo teste de HI (Log_{10} Título) e pelo ELISAI-NPr-IgM-SORO (Valor A/P). 54

LISTA DE ABREVIATURAS

Ac: anticorpo

Acs: anticorpos

A/P: Amostra/Positivo

APMV: paramixovírus aviário

CNPq: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

DNA: ácido desoxirribonucléico

DN: doença de Newcastle

DO: densidade óptica

DOs: densidades ópticas

ELISA: “Enzyme-Linked Immunosorbent Assay”

EUA: Estados Unidos da América

HA: teste de hemaglutinação

HI: inibição da hemaglutinação

HN: hemaglutinina-neuraminidase

IA: influenza aviária

ICTV: International Committee for the Taxonomy of Virus

IgA: imunoglobulina A

IgM: imunoglobulina M

IgG: imunoglobulina G

IPIC: índice de patogenicidade intracerebral

IPIV: índice de patogenicidade intravenosa

IPTG: isopropylthio- β -galactoside

Kb: quilobase

kDa: quilo dalton

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
NPr: nucleoproteína recombinante
OIE: Organização Mundial de Saúde Animal
OPD: orto-fenileno-diamina
pB: pares de base
PBS: tampão fosfato salina
PBST: tampão fosfato salina Tween a 20%
PCR: reação em cadeia da polimerase
PEG: polietilenoglicol
p.i: pós infecção
PNSA: Plano Nacional de Sanidade Avícola
RFLP: “Restriction Fragment Length Polymorphism”
RNA: ácido ribonucléico
RT-PCR: transcriptase reversa - Reação em cadeia da polimerase
SARS: Síndrome respiratória aguda grave
SDS-PAGE: dodecil sulfato de sódio em gel de poliacrilamida
SNC: sistema nervoso central
SPF: “Specific Pathogen Free” - livre de patógeno específico
TA: temperatura ambiente
TCB: Tampão carbonato bicarbonato
TCF: tampão citrato fosfato
TMME: tempo médio de morte embrionária
UHA: unidade hemaglutinante
UV: ultravioleta
VDN: vírus da doença de Newcastle
VI: vírus da Influenza

CERTIFICADO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS - CEUA

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus de Jaboticabal

**CEUA – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS****CERTIFICADO**

Certificamos que o Protocolo nº 003171/13 do trabalho de pesquisa intitulado **"Desenvolvimento e aplicação do elisa competitivo com a nucleoproteína recombinante (rNP) do vírus da doença de Newcastle"**, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Hélio José Montassier de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal, adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação (COBEA) e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA), em reunião ordinária de 13 de março de 2013.

Jaboticabal, 13 de março de 2013.

Prof. Dr. Andriago Barboza De Nardi
Coordenador - CEUA

DESENVOLVIMENTO E APLICAÇÃO DO ELISA INDIRETO COM A NUCLEOPROTEÍNA RECOMBINANTE (NPR) DO VÍRUS DA DOENÇA DE NEWCASTLE

RESUMO - O vírus da doença de Newcastle (VDN) provoca uma das doenças infecciosas mais importantes para as aves domésticas, devido aos elevados impactos negativos para a saúde aviária e a interposição de barreiras comerciais para a indústria avícola. Isso requer a constante evolução de técnicas cada vez mais eficazes de diagnóstico para esse vírus. Neste contexto, a nucleoproteína (NP) de VDN é um dos componentes antigênicos ideais para uso no imunodiagnóstico, porque é mais conservada e tem uma elevada imunogenicidade, de modo que NP pode melhorar o desempenho de sorodiagnóstico do VDN. Assim, este estudo teve como objetivo determinar os perfis de produção de anticorpos (Acs) anti-VDN dos isótipos IgA, IgM e IgG, usando NP recombinante (NPr) do VDN como um antígeno alvo. Amostras de soro e de lágrima foram colhidas de plantéis comerciais de aves de postura e também de aves SPF infectadas experimentalmente com a estirpe vacinal LaSota do VDN. O método de ELISA indireto, usando a NPr do VDN como antígeno de revestimento, foi padronizado e utilizado de forma bem sucedida para a detecção de Acs de galinha anti-VDN dos isótipos IgG e IgM em amostras de soro, e de ambos os isotipos mais IgA para amostras de secreção lacrimal. Ainda, este método de ELISA com NPr foi capaz de diferenciar amostras positivas das negativas para o VDN de soro e de lágrima, e nas aves submetidas à infecção experimental com a estirpe vacinal LaSota, a soroconversão foi detectada mais precocemente para os anticorpos do isótipo IgA (lágrima) e IgM (lágrima e soro), que alcançaram uma concentração máxima no sétimo dia após a infecção (pi), enquanto que os níveis de anticorpos IgG anti-VDN começaram a ser detectados mais tardiamente e atingiram um pico aos 14 dias pi. Além disso, a aplicação do ELISA em amostras de soro e de lágrima colhidas a partir de plantéis comerciais de galinhas de postura, para detecção de dois (IgG e IgM para as amostras de soro) ou três isótipos (IgA, IgM e IgG para as amostras de lágrima) de Acs anti-VDN, resultou em frequências de detecção mais altas do que quando cada isótipo de Acs foi detectado individualmente. Ao comparar os resultados de amostras de soro para ELISAI-NPr/ IgM / IgG com os obtidos no método padrão-ouro de inibição da hemaglutinação (HI), os coeficientes de correlação entre estes métodos foram de $r=0,491$ (IgM-ELISAI-NPr) e $r=0,760$ (ELISAI-NPr/IgG), bem como foram obtidos elevados valores de sensibilidade (98,8% / 97,4%), especificidade (97,6% / 95,5%) e acurácia (98,5% / 95,5%) para IgM/IgG-ELISAI-NPr. Em conclusão, o bom desempenho do ELISAI-NPr/ IgA / IgM / IgG utilizado para a detecção de Acs anti-VDN observados neste estudo, tanto para as amostras de soro ou de lágrima, caracteriza o potencial de aplicação dessa metodologia para o diagnóstico sorológico do VDN e para monitorar as respostas imunes humorais contra este vírus.

Palavras-chave: anticorpos, isótipos, lágrima, soro, sorodiagnóstico, paramixovírus aviário

DEVELOPMENT AND APPLICATION OF INDIRECT ELISA WITH RECOMBINANT NUCLEOPROTEIN (RNP) OF NEWCASTLE DISEASE VIRUS

ABSTRACT - Newcastle disease virus (NDV) causes one of the most important infectious diseases for chickens, due to the high negative impacts for health and the demands of trade barriers to poultry industry. This requires the constant development of increasingly more effective diagnostic techniques. In this context, the nucleoprotein (NP) of VDN is one of the ideal antigenic components for immunodiagnosics, because it is more conserved and has a high immunogenicity, so that NP may improve the performance of serodiagnosis of NDV. Thus, this study aimed to determine the production profiles of anti-NDV antibodies of IgA, IgM and IgG isotypes, using recombinant NP (rNP) of VDN as a target antigen. Serum and tear samples were collected from commercial poultry flocks, and from SPF birds experimentally infected with the LaSota vaccine strain of NDV. The indirect ELISA method using the NPr VDN as coating antigen was standardized and used for the detection of anti-NDV chicken antibody isotypes IgG, IgM in serum samples and antibodies of both isotypes added of IgA isotype for lacrimal secretion samples. This ELISA method with NPr was effectively able to differentiate NDV-positive and NDV-negative serum and tear samples, and in the birds subjected to a experimental infection with vaccine strain, the seroconversion was detected earlier for the antibodies of the IgA (tear) and IgM (tear and serum) isotypes, which have reached maximum concentration on the 7th day post-infection (pi), while the IgG anti-NDV antibody levels began to be detected later and peaked at 14 days pi. Moreover, the application of ELISA in serum and lachrymal samples collected from commercial layer chickens, with the detection of two (IgG and IgM for serum samples) or three isotypes (IgG, IgM and IgA for lachrymal samples) of anti-NDV antibodies, resulted in the highest detection frequencies than each antibody isotype was individually detected. By comparing the results of serum samples for ELISAI-rNP/ IgM / IgG with those obtained in the gold-standard method of hemagglutination inhibition (HI), the correlation coefficients between these methods were of $r=0.491$ (ELISAI-rNP/IgM) and $r=0.760$ (ELISAI-rNP/IgG), as well as high values of sensitivity (98.8% / 97.4%), specificity (97.6% / 95.5%), and accuracy (98.5% / 95.5%) were obtained for IgM / IgG - ELISAI-NPr. In conclusion, the good performance of ELISAI-rNP/ IgA / IgM / IgG used for the detection of anti-NDV antibodies recorded in this study, either for serum or to lachrymal samples, characterizes the potential application of this methodology for the serodiagnosis of VDN and for monitoring the humoral immune responses against this virus.

Keywords: antibodies, avian paramyxovirus, isotypes, serodiagnosis, serum, tear

1. INTRODUÇÃO

A aplicação de meios rápidos para diagnosticar a doença Newcastle (DN) é de grande importância, ainda mais aliada a técnicas que determinam o estado imune pós-vacinação, a fim de se conseguir um controle efetivo da DN em aves comerciais. Assim, os ensaios imunoenzimáticos em fase sólida (ELISA) constituem-se em indicadores acurados dos níveis de anticorpos (Acs), facilitando o monitoramento da resposta imune humoral nos compartimentos sistêmico e local de aves infectadas ou vacinadas.

Atualmente, preparações antigênicas purificadas do VDN são usadas nos kits comerciais de ELISA para a detecção e mensuração de Acs. Os processos de purificação são complexos, demorados, onerosos e com baixo rendimento, uma vez que o vírus é propagado em larga escala em inúmeros ovos embrionados livres de patógenos específicos ("Specific Pathogen Free" - SPF).

Nas infecções naturais ou artificiais, a nucleoproteína (NP) do VDN tem demonstrado ser imunogênica, induzindo elevadas respostas de Acs em coelhos, camundongos e galinhas. Devido a sua abundância e alta imunogenicidade, a NP do VDN é frequentemente usada para monitorar os programas de vacinação, bem como testes de sorodiagnóstico para distinguir animais vacinados daqueles infectados, devido à existência de vacinas com deleção gênica.

De fato, as proteínas hemaglutinina-neuraminidase (HN) e NP do VDN já foram obtidas de diferentes sistemas de clonagem e expressão e utilizadas no método indireto de ELISA para mensuração de Acs. No entanto, até o momento, nenhum trabalho utilizando antígeno recombinante foi direcionado para a detecção/mensuração dos isótipos IgA, IgM e IgG de Acs anti-VDN específicos de galinhas.

Assim sendo, e já tendo-se disponível uma preparação da NP recombinante (NPr) do VDN, foi conduzido o presente estudo com o propósito de mensurar Acs anti-VDN de cada isótipo IgA, IgM e IgG - em aves de granjas de postura comercial, além de aves infectadas experimentalmente com estirpe vacinal atenuada LaSota do VDN, para avaliar a cinética de produção desses isótipos de Acs, objetivando, dessa forma, avaliar as respostas imunes humorais nos compartimentos sistêmico e local dessas aves.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Doença de Newcastle – etiologia e aspectos estruturais

A doença de Newcastle (DN), também conhecida internacionalmente como “Newcastle disease”, é um dos principais problemas sanitários da avicultura mundial. É uma doença viral de distribuição cosmopolita, com áreas onde é endêmica ou áreas e países classificados como livres da doença. Dessa forma a DN faz parte das enfermidades emergenciais listadas no Código Zoosanitário Internacional da “Organização Mundial de Saúde Animal - OIE”. Os problemas causados pela DN não são apenas devido às altas taxas de mortalidade e morbidade, mas também por causa dos impactos econômicos que surgem. Em áreas e países onde os surtos foram confirmados é obrigatória a notificação aos órgãos oficiais competentes, os quais acabam impondo restrições e embargos comerciais ao local (OIE, 2012; BRASIL, 2013).

O vírus da doença de Newcastle (VDN) pertence à ordem *Monegavirales*, família *Paramyxoviridae*, que é subdividida em duas subfamílias: a *Pneumovirinae*, composta por um único gênero (*Pneumovírus*), no qual estão incluídos os pneumovírus aviários; e a subfamília *Paramyxovirinae*, na qual estão incluídos três gêneros, dentre eles o *Avulavirus*, que inclui o vírus da DN - *Paramyxovirus* Aviário Tipo 1 (APMV1 – “Avian Paramyxovirus Type 1”). São vírus envelopados, pleomórficos, muitas vezes de forma esférica com aspecto rugoso e se apresentam com um diâmetro entre 100 e 500 nanômetros. O genoma do VDN é composto por RNA de fita simples, não segmentado, de polaridade negativa, contendo aproximadamente 15,2 Kilobases (Kb), equivalente 5×10^6 Daltons (Da). Os paramixovírus isolados a partir de espécies de aves foram classificados por testes sorológicos e análise filogenética em dez subtipos APMV-1 a APMV-10 - e o VDN vem sendo classificado como APMV-1 (SAMSON, 1988; ALEXANDER; SENNE, 2008a; ALEXANDER; SENNE, 2008b; MILLER et al., 2010).

Na realidade, para definir se um vírus da DN é patogênico, também denominado de estirpe virulenta, e, portanto, o que é capaz de causar surtos da DN, são seguidas as

normas internacionais da OIE, que define a metodologia e critérios para caracterização do grau de patogenicidade dos isolados de campo. De acordo com a OIE, da qual o Brasil é fiel seguidor, a DN é uma infecção causada por um *Paramyxovirus* aviário tipo 1 (PMV-1) que apresenta Índice de Patogenicidade Intracerebral (IPIC) maior que 0,7 em aves da espécie *Gallus gallus*, livres de agentes infecciosos específicos - SPF ("Specific Pathogen Free") de um dia de idade. Ou ainda, alternativamente ao IPIC, que demonstre, por meio de sequenciamento de nucleotídeos do genoma viral, uma sequência codificadora de múltiplos aminoácidos básicos na porção C-terminal da proteína F2 do vírus e um resíduo de fenilalanina na posição 117, a qual está na porção N-terminal da proteína F1. O termo "múltiplos aminoácidos" significa a presença de pelo menos três resíduos de arginina ou lisina entre as posições 113 e 116 da proteína F das estirpes mais virulentas do VDN (ALEXANDER; SENNE, 2008a; OIE, 2012; BRASIL, 2013).

O genoma deste vírus codifica seis proteínas (Figura 1), a proteína de nucleocapsídeo (NP); a fosfoproteína (P) e a grande proteína (L), que são associadas ao nucleocapsídeo; a proteína de matriz (M) e as glicoproteínas de superfície – a proteína de fusão (F) e a glicoproteína hemaglutinina-neuraminidase (HN), responsável pela atividade da hemaglutinina e neuraminidase, sendo que estas últimas formam os dois tipos de projeções na superfície da partícula viral (YUSOFF; TAN, 2001; MAST; DEMEESTERE, 2009).

As proteínas estruturais de envelope, como glicoproteína HN e a F, têm papéis importantes na infecção do hospedeiro, pois conferem a função de adesão e fusão da partícula viral à membrana celular do hospedeiro. 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 da HN para que ocorra a fusão (MERZ; SCHEID; CHOPPIN, 1981; LEEUW; PEETERS, 1999).

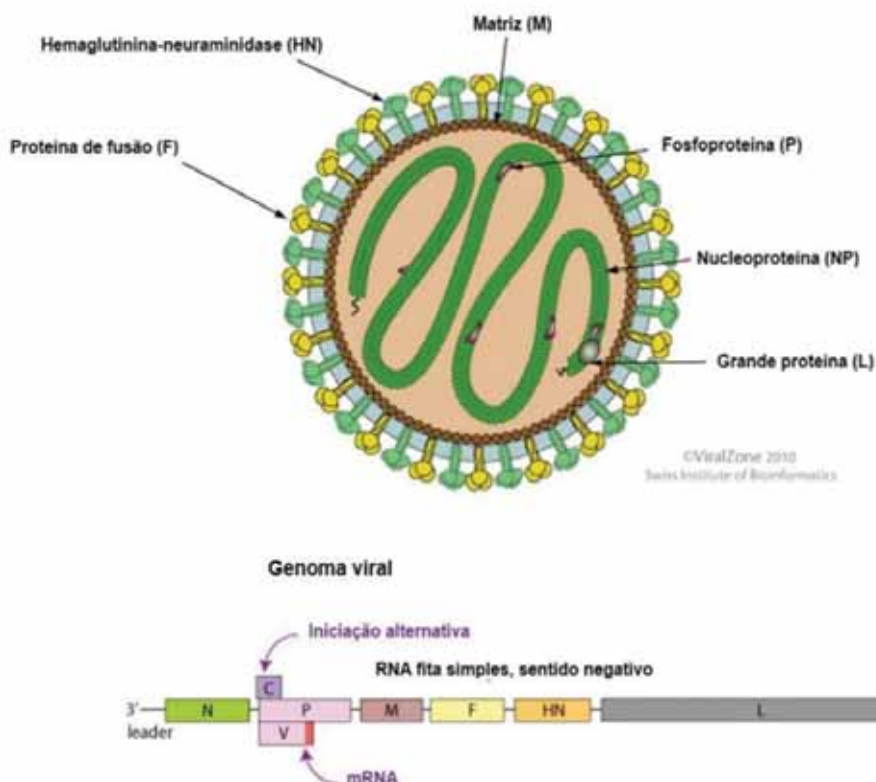


Figura 1. Esquema do genoma e organização das proteínas estruturais do VDN. Estão destacadas as seis proteínas: a proteína de nucleocapsídeo (NP); a fosfoproteína (P); a grande proteína polimerase (L); a proteína de matriz (M); a glicoproteína hemaglutinina-neuraminidase (HN) e a glicoproteína de fusão (F). Disponível em: http://viralzone.expasy.org/all_by_species/556.html. Acesso em 23/12/2014.

A hemaglutinina tem a capacidade de aglutinar eritrócitos de aves, enquanto a neuraminidase promove a separação gradual dos virions associados aos eritrócitos que estavam constituindo as porções aglutinadas (LEEuw; PEETERS, 1999). A proteína HN desempenha papel importante na infecção da célula hospedeira pelo vírus. Esta proteína é responsável pelo reconhecimento dos receptores que contêm ácido siálico na superfície das células alvos, promovendo o 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 VDN é de múltiplos genes (HUANG et al., 2004).

A proteína de nucleocapsídeo ou também chamada de nucleoproteína (NP) é uma das mais importantes proteínas estruturais do VDN. A NP mantém uma relação estreita com o genoma viral durante a replicação do vírus, por meio da síntese de nucleocapsídeo RNase resistente e em ação conjunta com as proteínas P e L, proporcionando proteção aos novos vírus sintetizados. Quanto à proteína M, a qual está presente em maior quantidade no interior do vírus, tem como função organizar a morfogênese da estrutura da partícula viral (KHO; TAN; YUSOFF, 2001).

O RNA genômico de todos os vírus de RNA fita negativa tem de servir a duas funções: primeiro como substrato para a síntese de RNA mensageiros (mRNA), e segundo como substrato para a síntese da fita positiva antígenômica para que haja a replicação do genoma viral. Vírus de RNA fita negativa codificam e carregam a própria enzima RNA polimerase, porém os mRNAs só são sintetizados depois que os vírus infectam as suas células alvos (LAMB; LOLAKOFSKY, 1996).

A replicação do VDN ocorre no citoplasma da célula infectada (Figura 2). A transcrição ocorre por meio da atuação da enzima RNA polimerase, que produzirá moléculas com capacidade de atuar com o RNA mensageiro e utilizar mecanismos da própria célula infectada para tradução das proteínas virais as quais serão transportadas até a membrana plasmática da célula do hospedeiro, resultando, desse modo, na liberação de novos virions (PEEPLES, 1988).

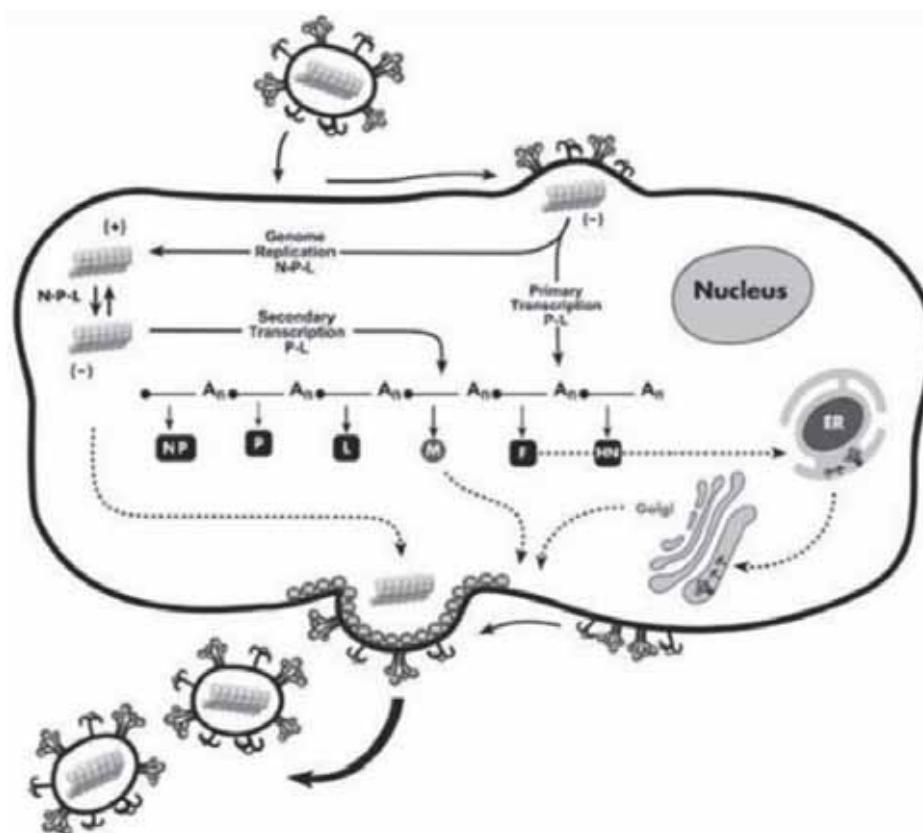


Figura 2. Representação esquemática do ciclo de replicação dos Paramyxovirus. Adaptado de Lamb e Parks (2007).

Ainda no que diz respeito à replicação do VDN, Domingo (2002) demonstrou que devido à baixa fidelidade da enzima RNA polimerase, há certamente a possibilidade de formação de novos genomas e, conseqüentemente, de novas partículas virais, 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 simultaneamente pela ocorrência de mutações no genoma e a capacidade de adaptação do vírus às pressões seletivas, especialmente provenientes do sistema imune do hospedeiro, gerando assim variação no genoma viral, por mutação espontânea, complementada por mecanismos de fuga da resposta imune (PERALES et al., 2005; SNOECK et al., 2009).

2.2 Resistência e patogenia

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 (ALEXANDER; SENNE, 2008a).

O APMV-1 possui envelope viral formado a partir do brotamento do vírus da membrana da célula infectada do hospedeiro. Esta importante característica dos paramixovírus aviários acaba favorecendo a atuação de alguns fatores inativantes para os vírus, tais como: aquecimento, oxidação, luz solar, luz ultravioleta (UV), pH e agentes químicos. Esse microrganismo pode ser inativado a temperatura ambiente (TA) com os seguintes agentes químicos: hipoclorito de sódio ou hipoclorito de cálcio 2-3%, monopersulfato de potássio 2%, amônia quaternária 2%, hidróxido de sódio (soda cáustica) 2%, ácido hidrocloreídrico 2% e formaldeído (formalina) 5-10%. Temperaturas altas e radiação solar facilitam a inativação do vírus pelos compostos químicos, enquanto baixas temperaturas interrompem a sua inativação. Algumas estirpes são inativadas a 56°C em 5 minutos, porém outras estirpes podem levar até 6 horas para serem eliminadas. Já a 100°C são inativados em poucos segundos. O cozimento da carne a 80°C destrói o vírus. Em penas e penugens de aves conservadas a 37°C, o VDN permanece viável por 87 dias e na casca de ovos persiste viável por até 126 dias. Em granjas, o VDN permanece ativo por até 235 dias e quando exposto à radiação solar direta é destruído de forma rápida. Em órgãos de aves infectadas e conservados a 37°C, o vírus pode permanecer ativo por até 125 dias (PAULILLO; DORETTO JÚNIOR, 2009; OIE, 2012; BRASIL, 2013).

As infecções pelo VDN entre aves domésticas ou confinadas têm sido associadas com uma variedade de sinais que vão desde uma doença subclínica com problemas respiratórios leves e diminuição da produção de ovos até uma infecção respiratória aguda (tosse, espirro e estertores pulmonares), frequentemente seguida por manifestações neurológicas, diarreia e edema da cabeça (ALDOUS; ALEXANDER, 2001). Mortalidades causadas por estirpes patogênicas podem rapidamente exceder

90% em galinhas e perus, porém em aves silvestres como perdiz, codorna, avestruz e psitacídeos, e em aves domésticas como patos, marrecos e gansos, a infecção pode não apresentar nenhum sinal clínico e nem alteração patológica (ALEXANDER; SENNE, 2008a).

Uma das características mais importantes das diversas estirpes do VDN tem sido a grande variação da patogenicidade para aves. As estirpes do VDN foram agrupadas em cinco patótipos a partir da virulência e manifestação clínica da doença observada em aves infectadas - velogênico viscerotrópico, velogênico neurotrópico, mesogênico, lentogênico ou vacinal e entérico assintomático (BEARD; HANSON, 1984; OIE, 2012).

Assim, estirpes 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 problemas respiratórios e, ocasionalmente, sinais clínicos neurológicos, 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 acometidas (ALEXANDER; SENNE, 2008a; OIE, 2012).

A classificação desses patótipos raramente é observada no campo, uma vez que essas descrições referem-se a observações feitas em aves SPF inoculadas com os respectivos patótipos ao nível de infecção experimental. Ainda no campo, pode-se observar que sinais clínicos em aves infectadas com estirpes lentogênicas podem ser confundidos com infecções por outros microrganismos causadores de problemas intestinais e/ou respiratórios (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 imune do hospedeiro (BACK, 2004). Em algumas circunstâncias, infecções com vírus extremamente virulento em frangos podem levar uma morbidade próxima a 100% e resultar em alta mortalidade, de até 90%, em aves

sensíveis (BEARD, 2008). Ainda que os sinais clínicos de modo geral, 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 ou país, os sinais clínicos e as lesões podem ser empregados no diagnóstico da doença (ALEXANDER; BELL; ALDERS, 2004). Os sinais clínicos típicos são: estado de prostração e depressão com penas eriçadas, diarreia branco-esverdeada, opistótono, torcicolo, paralisia dos membros pélvicos e/ou torácicos ou outros sinais neurológicos. Outras características típicas da DN 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. À necropsia, os achados mais comuns são muco na traquéia, hemorragias no proventrículo e intestino (BEARD; HANSON, 1984; NISHIZAWA et al., 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 problemas intestinais e respiratórios, indistinguíveis da doença de Newcastle. Portanto, sinais clínicos isolados não apresentam uma base confiável para o diagnóstico definitivo da DN (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 essas aves podem difundir o VDN para outras aves susceptíveis (SICK, 2001).

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. Psitacídeos podem desenvolver uma infecção crônica renal com potencial de eliminação do agente por longo período (SICK, 2001; ALEXANDER, 2009).

O aparecimento da doença em uma criação, geralmente, ocorre após cinco dias, em média, a partir da entrada do vírus na propriedade. A mortalidade entre pintos vai de

10% a 50% nos casos crônicos e a quase 100% nos casos de infecção com estirpes de alta virulência (MALAVAZZI, 1999).

2.3 Epidemiologia da doença de Newcastle

O VDN possui a capacidade de se difundir mundialmente por meio de aves susceptíveis, seres humanos, 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; ALEXANDER, 1991; ALEXANDER et al., 1997; ALEXANDER; SENNE, 2008a;). Durante o curso da infecção por uma estirpe velogênica do VDN, a maioria das aves excreta grandes quantidades de vírus nas fezes, que se constituem no principal meio de disseminação do VDN entre as aves (NISHIZAWA et al., 2007).

A história da DN é marcada por três panzootias. A primeira iniciou com emergência da DN em 1926 e estendeu-se até por volta de 1950, atingindo regiões ou países como a Inglaterra, primeiramente, depois notificada em outros países europeus; Oriente Médio; Ásia; África e América (PAULILLO; DORETTO JÚNIOR, 2009). No final do ano de 1960, a segunda panzootia da DN atingiu vários países no Oriente Médio, provavelmente devido ao intenso comércio de espécies de psitacídeos oriundos principalmente das Américas do Sul e Central e do Sudeste Asiático, transportados por aviões; sendo consideravelmente mais forte do que a primeira, atingindo todos os continentes e muitos países, até o ano de 1973 (ALEXANDER, 1988; PAULILLO; DORETTO JÚNIOR, 2009). Uma terceira panzootia emergiu inicialmente do Oriente Médio, em 1970, onde a principal forma de difusão deu-se por meio da exposição, competição e comercialização de pombos, e a sua presença foi confirmada em mais de vinte países, incluindo aqueles da Europa, Canadá, EUA, Hong Kong e Sudão. Em alguns países, a doença acometeu outras aves silvestres e aves de criação industrial, sob a forma neurotrópica da doença (McNULTY et al., 1988; PAULILLO; DORETTO JÚNIOR, 2009). Na Inglaterra, em 1984, um isolado viral de pombos foi responsável por 20 surtos da doença em frangos de corte, como resultado da ingestão de ração

contaminada com fezes dessas aves infectadas com VDN; o mesmo também ocorreu com um lote de faisões (ALEXANDER; PARSONS; MARSHALL, 1984; ALEXANDER, 1988).

A DN infecta com maior frequência galinhas (*Gallus gallus*) e perus (*Meleagris gallopavo*), principalmente nos meses mais frios do ano. A susceptibilidade diminui na proporção em que as aves ficam mais velhas. Os palmípedes – pato e ganso (*Anas platyrinchus* e *Anser* sp) (FRANZO et al., 2004) e os pombos domésticos (*Columba livia*) são susceptíveis ao VDN. Além das espécies já citadas, o VDN pode infectar outras aves, como cisnes (*Cygnus olor*), pardais (*Passer domesticus*), perdizes (*Rhynchotus rufescens*), codornas (*Coturnix coturnix japonica*), corvos (*Corvus corax*), pomba-rôla (*Streptopelia turtur*), corujas (*Tyto alba*), mergulhões (*Mergus octosetaceus*), faisões (*Crossoptilon mantchuricum*), avestruzes (*Struthio camelus*), entre outras (PAULILLO et al., 1999; LIMA et al., 2004b; NISHIZAWA et al., 2007; PAULILLO; DORETTO JÚNIOR, 2009).

Lima (2005) demonstrou experimentalmente que as galinhas d'angola (*Numida meleagris galeata*) não manifestaram sinais clínicos quando desafiadas com uma amostra patogênica do VDN. Contudo, essas aves se infectaram e permaneceram no estado de portadoras decorridos 30 dias do desafio experimental com o VDN.

A DN infecta aproximadamente 250 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 caninos e felinos (WHITE; JORDAN, 1963; MALAVAZZI, 1999; PAULILLO; DORETTO JÚNIOR, 2009); seres humanos também são susceptíveis ao VDN (BEARD; HANSON, 1984; HERNÁNDEZ et al., 1987; GOEBEL et al., 2007; PAULILLO; DORETTO JÚNIOR, 2009).

As infecções em seres humanos, descritas pela literatura, não foram fatais, e normalmente, não debilitantes por mais de um ou dois dias (CHANG, 1981; SWAYNE; KING, 2003). Os sinais clínicos mais frequentemente relatados e melhor caracterizados em humanos foram problemas oculares, que consiste em: vermelhidão unilateral ou bilateral, lacrimejamento excessivo, edema das pálpebras, conjuntivite, hemorragia

subconjuntival e cefaléia (BEARD; HANSON, 1984; HERNÁNDEZ et al., 1987). Não há evidências científicas da infecção de humano para humano. Goebel et al. (2007) relatam um isolamento de APMV-1 de pombos em amostras de tecido pulmonar, urina e fezes de um paciente imunocomprometido que morreu de pneumonia.

As aves silvestres são consideradas reservatório natural de estirpes patogênicas do VDN, com capacidade de causar a doença, e podem estar envolvidas nos surtos que ocorrem em aves domésticas (CAMENISCH; BANDLI; HOOP, 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, e até mesmo o tráfico de animais silvestres, têm sido responsáveis pelo aumento significativo da DN (SEAL et al., 1998; CLAVIJO et al., 2000; VERNOERD, 2000).

Em um estudo sobre a prevalência do VDN em frangos de corte no Brasil Orsi et al. (2010) demonstraram a circulação de estirpes não virulentas do VDN - IPIC (0,51 - 0,66), em regiões do país onde não há vacinação. A soropositividade e o isolamento do vírus nas áreas onde não é feita a vacinação pode ser explicada pela presença de outras espécies de aves que se encontram ao redor de granjas e a possível proximidade entre criação de diferentes tipos de aves ou até mesmo por falhas no manejo sanitário das propriedades (ORSI et al., 2010).

Ainda no Brasil, há registros de detecção de anticorpos específicos e de isolamento do VDN em aves silvestres nos Estados do Rio de Janeiro e de Pernambuco, sendo que essas espécies de aves foram consideradas reservatórios desse vírus para as aves de criação industrial (OLIVEIRA JUNIOR et al., 2003; SILVA et al., 2006). Além disso, em outro estudo no município de Galinhos, Estado do Rio Grande do Norte, detectou a presença de isolados do VDN de baixa patogenicidade a partir de amostras de suabes de cloaca de aves migratórias (ARAÚJO et al., 2004).

As principais vias de transmissão do VDN em criação de aves domésticas ocorrem por aerossóis de aves infectadas diretamente ou indiretamente por meio 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 ou por manipulação

errada durante a vacinação das aves. No Brasil, não há relatos de infecção pelo VDN em seres humanos (HERNÁNDEZ, 1987; BEARD; HANSON, 1984).

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 DN. 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. As vias de eliminação do vírus são secreções exsudativas do trato respiratório e das fezes das aves infectadas (ALEXANDER, 2008a).

2.4 Medidas de controle e prevenção para a Doença de Newcastle

A vacinação é o instrumento mais eficiente no controle e prevenção da DN, ainda mais quando aliada às medidas de biossegurança que os aviários devem seguir (ALEXANDER, 2009). Usualmente, para aves de corte, recomenda-se uma vacinação na água de beber aos 7 a 10 dias e duas revacinações aos 21 e 35 dias de idade. Já no caso das galinhas poedeiras, além destas três vacinações citadas, há a necessidade de que as mesmas sejam revacinadas entre os 70 e/ou 90 dias, com vacina viva atenuada ou ainda com vacinas inativadas, via subcutânea (PAULILLO et al., 1996).

No Brasil, até algum tempo atrás, 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 de aspersão. 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; OIE, 2012).

Em áreas onde não se utilizam programas de vacinação e/ou em áreas onde a DN está erradicada, os testes sorológicos podem ser utilizados como meio de diagnóstico e prevenção. Porém, resultados positivos podem não indicar a doença, mas sim, a presença do VDN (THAYER; VILLEGAS; FLETCHER, 1987).

A redução gradual da ocorrência da enfermidade é devido a controles intensivos na avicultura industrial, por meio de programas de vacinação eficientes e além dos esforços do governo federal, através do Plano Nacional de Sanidade Avícola (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 avícolas, definindo a eficácia dos calendários de vacinação e situação real da presença do vírus no ambiente.

O Departamento de Saúde Animal (DSA) do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA) tem desenvolvido ações para evitar o ingresso de doenças no Brasil. A entrada de estirpes patogênicas do VDN pode ocorrer por meio de 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 Influenza Aviária (IA) e DN, em aves migratórias, plantéis avícolas comerciais e de subsistência (BRASIL, 2013).

Países exportadores de produtos avícolas, incluindo o Brasil, estabelecem monitoramentos constantes da DN, para avaliar a sua situação real, assim como para tentar evitar a entrada da enfermidade no país ou região. Em muitos países do mundo,

a DN vem sendo controlada em áreas comerciais por meio de emprego do calendário vacinal, com vacinas aprovadas e com controle de qualidade. Em alguns Estados brasileiros, como Santa Catarina, são vacinadas apenas as matrizes, para transferência de imunidade maternal às crias. A queda completa do nível de anticorpos, que ocorre na idade de abate de frangos de corte, tem sido utilizada como uma forma de verificar se há a presença VDN circulante no país ou região (BRASIL, 2013).

A vacinação e melhoria das condições zootécnicas, para criadores de aves caipiras, o isolamento sanitário das 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

Os sinais clínicos e as lesões causadas pela infecção do VDN não são patognomônicos, portanto, somente técnicas laboratoriais podem confirmar o diagnóstico definitivo para a DN (ALEXANDER, 2008a; OIE 2012).

A DN se enquadra na lista de enfermidades emergenciais da OIE, sendo, portanto, de notificação obrigatória. No Brasil, o laboratório de referência para diagnóstico da DN é o Laboratório Nacional Agropecuário (LANAGRO), que é uma unidade do MAPA localizada no município de Campinas, São Paulo. A confirmação deve ser feita pelo isolamento e identificação do VDN e por testes de patogenicidade como: Índice de Patogenicidade Intracerebral (IPIC), Índice de Patogenicidade Intravenosa (IPIV) e o Tempo Médio de morte Embrionária (TMME) (BRASIL, 2013). As reações sorológicas positivas servem para fazer o imunodiagnóstico e ainda detectar casos subclínicos da infecção pelo VDN (THAYER; VILLEGAS; FLETCHER, 1987; OIE, 2012).

O isolamento viral é realizado em ovos embrionados SPF com nove a 11 dias de incubação, por meio da inoculação da amostra ou macerados de órgãos de aves na cavidade córion-alantóide. O líquido córion-alantóide é colhido a partir de 48 horas ou após a morte dos embriões, sendo armazenado e depois analisado pelo teste de hemaglutinação (HA). A confirmação do isolamento viral é feita pelo teste de inibição da

hemaglutinação (HI), que permite também o diagnóstico diferencial do vírus da IA. Com resultado positivo nesse teste, é também recomendado que se realize a técnica de neutralização viral e, em seguida, os testes de caracterização de patogenicidade, pela inoculação das amostras em pintos e/ou em ovos embrionados SPF (ALEXANDER, 2008a; OIE, 2012; BRASIL, 2013).

Outro meio de diagnóstico é a detecção e identificação do VDN por testes moleculares. Nesse sentido, muitos ensaios para a detecção do genoma do VDN têm sido descritos como a hibridização de ácidos nucléicos e análise do ácido ribonucleico (RNA) genômico viral, sendo empregados vários tipos de reações de transcriptase reversa, seguida da reação em cadeia da polimerase (RT-PCR), tais como a reação em cadeia da polimerase (PCR) convencional e a PCR em tempo real, que podem ser seguidas pelas análises como a de polimorfismo de fragmentos do DNA por enzimas restrição (RFLP) e o sequenciamento (KANT et al., 1997; GOHM; TRUR; HOFMANN, 2000; ALDOUS; ALEXANDER, 2001; PHAM et al., 2004; YUSOFF; TAN, 2001; PHAM et al., 2005).

Os testes moleculares de diagnóstico têm-se destacado como alternativas importantes em comparação à metodologia convencional de caracterização viral, oferecendo vantagens como menor tempo de execução e custos menores (VIANNA et al., 2000). No capítulo da DN, do manual da OIE, a partir de 2000, a técnica de PCR passou a ser aceita e considerada padrão para diagnóstico da DN, por meio da avaliação da sequência de nucleotídeos codificadora da sequência de aminoácidos presentes na região de clivagem da proteína F0 do VDN (CREELAN; GRAHAM; MCCULLOUGH, 2002).

O VDN pode ser utilizado como antígeno em uma grande variedade de testes sorológicos para detectar Acs contra o VDN, tais como: imunodifusão radial, hemólise radial, vírus-neutralização, inibição da hemaglutinação - HI (ALEXANDER e SENNE, 2008a; ALEXANDER e SENNE, 2008b; OIE, 2012) e os ensaios imunoenzimático de fase sólida - “Enzyme-Linked Immunosorbent Assay” (ELISA) (RICHTZENHAIN, et al., 1993; CZIFRA et. al., 1996; SOUSA et al., 1999; SILVA et al., 2009; OIE, 2012 OLIVEIRA et al., 2013; SILVA et al., 2014;).

O teste de HI é amplamente utilizado como prova padrão na detecção de anticorpos contra este vírus em aves (SOUSA et al., 1999; OIE, 2012), sendo muito utilizado no controle de diversos vírus aviários, incluindo APMV-1, para o qual se revelou específico (THAYER; VILLEGAS; FLETCHER, 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; VILLEGAS; FLETCHER, 1987; ROWE et al., 1999; PEIRIS et al., 2007; PRABAKARAM et al., 2009).

Além desses testes sorológicos, há vários ensaios imunoenzimáticos, principalmente com base no método indireto, que foram desenvolvidos e aplicados no diagnóstico laboratorial da DN, os quais têm sido muito usados no lugar do teste de HI. O ELISA apresenta a vantagem de superar os demais ensaios sorológicos, em virtude do seu baixo limiar de detecção, associado à capacidade de oferecer resultados mais objetivos, reprodutíveis e de possibilitar o processamento de um grande número de amostras de soro. Portanto, a classificação é mais rápida das amostras analisadas em níveis de reação imunoenzimática, possibilitando assim o acompanhamento do grau de imunidade humoral local e sistêmica de um grande número de aves vacinadas contra o VDN, sendo de extrema importância para o monitoramento e estudos de soroprevalência da DN (SOUSA et al., 1999; YUSOFF; TAN, 2001; AL-GARIB et al., 2003; CHIMENO et al., 2008; OLIVEIRA et al., 2013; SILVA et al., 2014).

Ainda a respeito do ELISA, este é o teste sorológico mais utilizado na avicultura para outros agentes etiológicos por sua maior sensibilidade, especificidade, rapidez e maior facilidade de padronização (THAYER; VILLEGAS; FLETCHER, 1987).

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 devem ser adsorvidas com os antígenos virais purificados ou semi-purificados, os quais requerem a propagação desses agentes em sistemas convencionais, tais como: ovos embrionados SPF ou em culturas celulares, e em grandes volumes, adicionado, ainda, da necessidade de serem usados processos bastante complexos de purificação do antígeno por técnicas de ultracentrifugação em gradiente de sacarose (WILSON et al., 1984; RIVETZ et al., 1985; MIERS; SCHEID;

CHOPPIN , 1983). Tudo isso, resulta em processos laboriosos e dispendiosos para a preparação das placas de ELISA com o antígeno de forma apropriada.

As infecções agudas provocadas pelo VDN podem ser diagnosticadas por métodos diretos como o isolamento viral, técnicas moleculares (RT-PCR), técnicas de imunohistoquímica, imunoperoxidase e hibridização *in situ* (BROWN; RESURRECCION; DICKSON, 1990) e também por métodos indiretos, tais como as diferentes técnicas sorológicas que são usadas para detecção de anticorpos induzidos pelo VDN. Geralmente, essas últimas técnicas buscam detectar a soroconversão, utilizando amostras pareadas de soros, colhidas com intervalos regulares de alguns dias ou até semanas (OIE, 2012). Esse tipo de análise sorológica de soros pareados é mais cara e não prática porque ela requer mais tempo para ser finalizada. Uma alternativa a esse procedimento é a detecção da resposta de Acs antivirais específicos do isótipo IgM, os quais podem ser detectados quatro dias após o hospedeiro susceptível entrar em contato com o vírus (AL-GARIB et al., 2003). Foi relatado que a resposta de IgM é mais precoce do que a de IgG e pouco duradoura após o início da infecção ou da vacinação, de forma que apenas uma amostra de soro poderia ser suficiente para confirmar a ocorrência de soroconversão induzida pelo estímulo viral decorrente da infecção ou da imunização.

Muitos trabalhos visam melhorar a sensibilidade e especificidade dos testes de diagnóstico para a 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. Uma alternativa para isso é a utilização de proteínas recombinantes do VDN, tais como proteínas NP ou HN (YUSOFF; TAN, 2001; OIE, 2012; SILVA et al., 2014).

O conhecimento sobre a cinética e distribuição em respostas de isótipos de Acs no soro e em secreções podem aumentar a nossa compreensão sobre as fases de indução e efetora da respostas imunes humorais sistêmica e local contra o VDN (AL-GARIB et al., 2003). Além disso, essas análises podem eventualmente fornecer informações adicionais para o sorodiagnóstico ou para desenvolver e avaliar

preparações vacinais contra esse vírus, contribuindo com a otimização da aplicação dessas vacinas. Nesse sentido, verifica-se que muitas tentativas têm sido feitas para mensurar os isótipos de Acs sistêmicos e locais contra o VDN, utilizando vários testes clássicos, tais como: difusão dupla em gel de ágar, imunoeletroforese, radioimunoensaio e o ensaio de monocamada com imunoperoxidase (IPMA) utilizando anticorpos monoclonais (mAb) específicos para cada isótipo de Ac de galinha (AL-GARIB et al., 2003). Além disso, vários pesquisadores descreveram diferentes métodos de ELISAs convencionais para determinar a classe de isótipos dos Acs anti-VDN, usando conjugados imunoenzimáticos constituídos por Acs policlonais de cabra para cada isótipo de Ac de galinha, e como antígeno adsorvido à fase sólida, partículas purificadas ou semi-purificadas do VDN (AL-GARIB et al., 2003).

2.6 Produção de antígenos recombinantes

A expressão de proteínas em células onde elas não ocorrem naturalmente é denominada produção de proteínas recombinantes heterólogas. Existem diversos sistemas heterólogos disponíveis como bactérias (*Escherichia coli* - *E. coli*), leveduras (*Sacharomyces cerevisiae*, *Pichia pastoris*), bem como células eucarióticas de mamíferos, aves e de insetos, transfectadas com vetores virais (WALSH, 1998). A escolha de um desses processos biológicos para produção de proteínas recombinantes é determinada por uma variedade de fatores como as propriedades biológicas intrínsecas da proteína desejada, da finalidade de sua obtenção e da viabilidade econômica do método.

A expressão de proteínas recombinantes através do sistema baculovírus – células de insetos têm sido amplamente utilizada, sendo mais recomendada para ser empregada na obtenção de grandes quantidades de proteínas em células eucarióticas (ERRINGTON; STEWARD; EMMERSON, 1995; MAKKAY; KRELL; NAGY, 1998). Esse sistema se caracteriza também por oferecer diversas vantagens em relação à expressão de proteínas em células procariotas. Um aspecto relevante, nesse caso, é que as proteínas expressas em células de inseto possuem atividade biológica e

reatividade imunológica muito similares às proteínas expressas em células de mamíferos ou aves, com a vantagem adicional de serem produzidas em quantidades muito superiores e com custos significativamente menores. No entanto, este sistema requer o cultivo '*in vitro*' de células de inseto, sendo mais exposto à contaminação bacteriana e fúngica e o sucesso pode depender de eventos sob os quais não se tem muito controle como a transfecção e a recombinação do vetor e do DNA do baculovírus (HOCHULI; PIESECKI, 1992; ERRINGTON; STEWARD; EMMERSON, 1995; MAKKAY; KRELL; NAGY, 1998).

Por outro lado, as bactérias *E. coli*, membros da família *Enterobacteriaceae*, são os organismos hospedeiros mais utilizados na produção de várias proteínas recombinantes heterólogas. Esses organismos procariontes oferecem um conjunto relevante de vantagens em relação a outros sistemas de clonagem e expressão de genes de interesse: entre as vantagens se destacam sua maior simplicidade de manipulação, baixas exigências para meios de crescimento e a grande capacidade de produção desses microrganismos. Ainda, vale ressaltar que o processo de extração e purificação da proteína recombinante demonstra-se menos complexo aos demais sistemas. Atualmente são utilizadas comercialmente na produção de diversas proteínas, inclusive as de interesse terapêutico, tais como: insulina, hormônio do crescimento humano, entre outros, com altos níveis de expressão gênica (WALSH, 1998; SILVA et al., 2014).

E. coli possui, entretanto, algumas desvantagens como sistema recombinante, particularmente a incapacidade de realizar modificações pós-traducionais como a glicosilação, fazendo com que as proteínas recombinantes acumulem-se no citoplasma ou formem agregados insolúveis (corpos de inclusão), devido à sobrecarga dos mecanismos celulares normais de processamento de proteínas, ocasionando a formação de interações intermoleculares (WEICKERT et al., 1996).

Ainda nesse sentido, o vetor Champion™ pET SUMO "Protein Expression System" (Invitrogen) permite a clonagem e expressão da proteína de interesse em *E. coli*, fusionada ao peptídeo SUMO, que incrementa a expressão da proteína recombinante e aumenta a solubilidade dos seus produtos. Além disso, a estrutura

terciária do peptídeo SUMO é reconhecida de forma específica e clivada pela enzima SUMO protease, permitindo sua remoção e obtenção da proteína recombinante na forma nativa. Quando essa partícula está fusionada à porção N-terminal da proteína de interesse, na presença da SUMO protease, ocorre a clivagem dessa partícula, resultando na liberação da proteína (SINGH et al., 2012; SILVA et al., 2014).

2.7 Aplicação de antígenos recombinantes no imunodiagnóstico da doença de Newcastle

A NP do VDN é composta por 489 aminoácidos com peso molecular de 53 kDa, é responsável pela regulação da transcrição e replicação do genoma viral, por meio da interação com a proteína P (MEBATSION et al., 2002; PHAM et al., 2004). 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; STEWARD; EMMERSON, 1995; MAKKAY; KRELL; NAGY, 1998; SILVA et al., 2014). Pham et al. (2005) fizeram uma comparação com 15 estirpes do VDN, entre elas, vacinais, mesogênicas e velogênicas, e identificaram uma homologia de 89,9% a 96,1% no gene NP. Ainda nesse trabalho, os autores identificaram uma maior conservação da sequência de aminoácidos na porção N-terminal em contraste com a porção C-terminal.

Ademais, Panyasing et al. (2013) desenvolveram um ELISA indireto para detecção de Acs dos isótipos IgA, IgM e IgG do vírus da Influenza A em amostras de soro e fluidos orais de suínos infectados experimentalmente. Os valores da mensuração de Acs foram comparados com os isótipos IgA, IgM e IgG nos compartimentos de imunidade sistêmica e local, com resultados satisfatórios para IgM e IgG (PANYASING et al., 2013).

Portanto, a proteína NP possui apanágios satisfatórios para ser usado com vantagens como antígeno em ensaios imunoenzimáticos, como o ELISA, para serem aplicados no imunodiagnóstico de aves infectadas e/ou vacinadas a campo com diferentes estirpes do VDN.

De fato, as proteínas HN e NP, do VDN, foram expressas em diferentes sistemas com sucesso após a clonagem em baculovírus ou *E. coli* e utilizados em métodos indiretos de ELISA para mensurar os Acs anti-VDN (ERRINGTON; STEWARD; EMMERSON, 1995; MAKKAY; KRELL; NAGY, 1998; KIM, et al., 2009; SILVA et al., 2014). No entanto, nos estudos realizados até o momento, nenhum trabalho utilizando proteínas recombinantes do VDN foi direcionado para a detecção/mensuração dos isótipos IgA, IgM e IgG de Acs anti-VDN específicos. Além disso, a nucleoproteína recombinante (NPr) do VDN tem alguns atributos positivos para aplicação, tais como uma maior conservação da sequência de aminoácidos e elevada imunogenicidade, como demonstrado por Silva et al. (2014), num estudo anterior.

Assim sendo e já tendo-se disponível uma preparação antigênica da NPr da estirpe vacinal LaSota do VDN produzida em *E. coli*, foi conduzido o presente estudo, visando a mensuração de anticorpos anti-VDN de cada um dos isótipos IgA, IgM e IgG - em aves oriundas de grupos vacinados com vírus vivo vacinal, além de aves infectadas experimentalmente com estirpe vacinal, para avaliar a cinética de produção desses isótipos de anticorpos, avaliando-se assim a resposta imune humoral nos compartimentos sistêmico e local das aves.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Desenvolver e aplicar os testes de ELISAI-NPr-IgA / IgM / IgG com a nucleoproteína recombinante(NPr) do VDN na detecção de anticorpos contra o vírus da doença de Newcastle nos compartimentos sistêmico e local de galinhas.

3.2 Objetivos específicos

1. Preparar os diferentes reagentes básicos a serem utilizados nos testes de ELISAI-NPr-IgA / IgM / IgG e otimizar suas condições de uso, por meio da indução da expressão e purificação da NPr, caracterizar imunoquimicamente a NPr produzida; preparar soros de aves de referência positivo e negativo para o VDN.
2. Aplicar o teste de ELISAI-NPr-IgA / IgM / IgG para a detecção e mensuração dos níveis dos isótipos pesquisados de anticorpos contra o VDN em amostras de soro e de lágrima de aves experimentalmente infectadas com o VDN e em aves de postura comercial submetidas à vacinação contra esse mesmo vírus.
3. Avaliar comparativamente os resultados da detecção de anticorpos anti-VDN dos isótipos IgM e IgG em amostras de soro sanguíneo, pelo método indireto de ELISA com a NPr do VDN, com aqueles obtidos no teste de HI, para determinar os coeficientes de correlação e os níveis de sensibilidade, especificidade, acurácia, concordância, bem como os valores preditivos positivo e negativo desse método de ELISA.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Obtenção do antígeno recombinante (NPr-VDN)

A sequência completa do gene, da nucleoproteína (NP) (1470 pb) da estirpe La Sota do VDN foi amplificada, por RT-PCR, num estudo anterior a este por Silva et al. (2014) e submetida a clonagem no vetor de expressão pETSUMO (Invitrogen, Carlsbad, CA), em *E. coli*. A proteína NP do VDN foi expressa sob a forma de uma proteína recombinante de fusão contendo o peptídeo SUMO e a sequência de poli-histidina (SILVA et al., 2014).

4.2 Purificação e caracterização da NPr-VDN

O procedimento utilizado na purificação da NPr do VDN foi o mesmo descrito pelo fabricante da resina de afinidade níquel-agarose (GE Healthcare, Buckinghamshire, United Kingdom). As concentrações de proteína foram determinadas pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976) e as características imunoquímicas estabelecidas por meio das técnicas de SDS-PAGE e de Western blotting, como recomendado por Towbin, Staehelin e Gordon (1979).

A concentração do VDN com polietileno-glicol (PEG) para uso nas técnicas de SDS-PAGE e de “Western-Blotting” foi 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 vírus.

4.3. Amostras de soro e de lágrima para aplicação no teste de ELISA indireto para os isótipos de IgA, IgM e IgG

A idéia central foi que pudesse ser analisado um painel de amostras o mais representativo possível. Por isso, deveriam ser obtidas amostras de soro sanguíneo e de lágrima contendo desde os títulos de Acs mais elevados, aos moderados ou mais

reduzidos e, ainda, os negativos, quanto à reatividade para o VDN. Desta forma, foram colhidas amostras de soro de galinhas de postura comercial, submetidas a esquema usual de vacinação para esse tipo de criação avícola, bem como de galinhas SPF (como fornecedoras de amostras negativas para o VDN). Também foram obtidas amostras de soro e de lágrima de aves de postura vacinadas experimentalmente com a estirpe LaSota para a determinação da cinética da produção de Acs anti-VDN específicos dos isótipos IgA, IgM e IgG.

4.3.1 Amostras de soro e lágrima de galinhas de postura

Foram colhidas 250 amostras de sangue e de lágrima de galinhas de postura (linhagem Lohmann Brown) de granjas da região de Bastos-SP, as quais foram distribuídas, conforme a idade, em cinco grupos (I, II, III, IV e V). Todas as aves haviam recebido quatro doses de vacina viva atenuada contra o VDN, da estirpe LaSota (via ocular e aerossol), nas idades de 7 dias, 30 dias, 60 dias e 90 dias, além de reforços durante o período de produção de ovos. Quando as colheitas de sangue e lágrima foram realizadas, as aves estavam na 38ª (grupo I), 49ª (grupo II), 60ª (grupo III), 86ª (grupo IV) ou 116ª (grupo V) semana de vida.

As amostras de lágrima foram coletadas de acordo com Lancellotti et al. (2014), por meio da adição de 25 µL de glicerol na mucosa conjuntival da pálpebra inferior de cada olho das aves de postura comercial. Em seguida, com auxílio de um micropipetador com ponteiros descartáveis era coletada a secreção lacrimal. Eram obtidos, aproximadamente, 200µL de volume final e armazenadas a -20 °C para posterior análise nos testes de ELISAI-NPr-IgA / IgM / IgG-LÁGRIMA.

O protocolo obedeceu aos princípios éticos de experimentação animal, adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação (COBEA), aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da FCAV-UNESP, conforme o protocolo nº 003171/13.

4.3.2 Amostras de soro e de lágrima de aves de postura infectadas experimentalmente com estirpe vacinal LaSota para a determinação da cinética da produção de anticorpos anti-VDN específicos dos isótipos IgA, IgM e IgG

Vinte aves da linhagem Lohmann Brown foram distribuídas em dois grupos de 10 aves cada um e, em seguida, colocadas em dois isoladores com pressão positiva. O primeiro grupo foi inoculado, aos 15 dias de idade, por via óculo-nasal, com a estirpe vacinal Lasota do VDN, não purificada, contendo $10^{6.5}/0,1$ mL de doses embrionárias infectantes 50% (EID 50). As aves do segundo grupo não foram infectadas e permaneceram como controle negativo. Sangue e lágrima foram colhidos nos intervalos pós-infecção de 0, 4, 7, 14 e 21 dias. Após a dessora, as amostras de soro e de lágrima foram armazenadas a -20°C até o momento de serem analisadas pelos testes de ELISAI-NPr-IgM / IgG-SORO e ELISAI-NPr-IgA / IgM / IgG-LÁGRIMA.

4.3.3 Amostras de soro e de lágrima negativos para o VDN

Amostras sanguíneas e lácrimais de 20 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 dos testes de ELISAI-NPr-IgM/IgG-SORO e ELISAI-NPr-IgA / IgM / IgG-LÁGRIMA.

4.3.4 Preparo de soro de referência positivo contra o VDN

Antissoros contra a estirpe LaSota de referência do VDN foram preparados em 10 galinhas SPF adultas alojadas em isoladores de pressão positiva, seguindo-se o método de Adair et al. (1989). As aves foram inoculadas pelas vias oral e nasal com 0,1mL de líquido córion-alantóide, contendo aproximadamente 256 Unidades Hemaglutinantes (UHA) do VDN. Decorridas três a quatro semanas, as aves receberam uma dose adicional de reforço por via nasal e, após uma a duas semanas, foram feitas as colheitas de sangue sem anticoagulante, para obtenção do soro sanguíneo, e

secreção lacrimal de cada uma das aves, os quais foram testados na técnica de HI contra a estirpe homóloga do VDN. Aqueles com altos títulos de HI foram reunidos em um “pool”, separados em pequenas alíquotas e depois armazenados a -20°C.

4.4 Método de ELISA indireto com NPr para a detecção de anticorpos anti-VDN dos isótipos IgA, IgM e IgG (ELISAI-NPr-IgA / IgM / IgG)

Em linhas gerais, foi adotado o protocolo descrito por Silva et al.(2014) e Gibertoni et al. (2005). Inicialmente, foi realizada uma titulação em bloco para cada um dos isótipos, adsorvendo-se na placa de 96 poços, quatro concentrações diferentes da NPr em µg/mL e testando seis diluições seriadas de razão 2 dos soros e de lágrimas de controles positivo e negativo para o VDN, como descrito no Quadro 1. Ao final, determinou-se a concentração ideal do antígeno para uso e também da diluição única para os soros e lágrimas de galinhas, também denominados de detector.

Quadro 1. Descrição dos diferentes parâmetros utilizados para titulação em bloco da NPr do VDN e das amostras de soro e lágrima de referências positiva e negativa.

Isótipo/ Amostra	Concentrações diferentes da NPr em µg/mL	Diluições seriadas de razão 2 dos soros e lágrimas
IgG – Soro	0,5 a 4	1:50 a 1:1600
IgM – Soro	4 a 32	1:100 a 1:3200
IgA – Lágrima	1 a 8	1:25 a 1:800
IgG – Lágrima	1 a 8	1:25 a 1:800
IgM – Lágrima	1 a 8	1:25 a 1:800

Em resumo, placas com 96 cavidades (Costar, Corning, NY) eram adsorvidas com 50µL de uma solução com a NPr do VDN em concentração ideal para uso para cada isótipo, preparada em tampão carbonato/bicarbonato (0,05M, pH 9,6). As placas eram incubadas a 4°C, durante 16 horas, depois lavadas três vezes com PBS-Tween-20 e bloqueadas, por 45 minutos, com 100µL por cavidade de tampão de bloqueio (10% de leite em pó desnatado, tampão carbonato/bicarbonato – 0,05M, pH 9,6). A seguir, as placas eram lavadas com PBS Tween 20, por quatro vezes, e adicionados 50µL por

cavidade das amostras de soro de galinha (anticorpo primário), diluídas no tampão de bloqueio na diluição final ideal para cada isótipo, procedendo-se, a incubação à temperatura de 37°C por 1 hora. As placas eram então novamente lavadas com PBS-Tween 20, por quatro vezes, adicionando-se depois 50µL dos Acs de coelhos conjugados imunoenzimaticamente com peroxidase anti-imunoglobulinas de galinha (Bethyl – Laboratories, USA), específicos para os isótipos IgA (1:800 - lágrima), IgM (1:1000 soro e lágrima), ou IgG (1:10.000 soro e 1:1500 lágrima), os quais também eram diluídos, cada um, no tampão de bloqueio. Incubaram-se as placas a 37°C por 2 horas e, ao final desta etapa, eram lavadas por quatro vezes, tal como descrito anteriormente. Em seguida, adicionava-se, em volumes de 50µL/cavidade, da mistura substrato-cromógeno (peróxido de hidrogênio - H₂O₂ / Orto-fenileno-diamina OPD – Dako, USA), preparada em água deionizada, deixando-se a reação se desenvolver por 15 minutos à temperatura ambiente, ao abrigo da luz; em seguida adicionando-se HCl 2M em volume de 50µL/cavidade para bloquear a atividade enzimática da peroxidase. As densidades ópticas (DOs) obtidas eram mensuradas em leitor de placas de ELISA (BIO-RAD – iMarkTM Microplate Reader, Hercules, CA), no comprimento de onda de 490nm; as DOs obtidas eram transformadas em valores da relação amostra / positivo (A/P), tal como descrito e recomendado por Silva et al. (2014) e Gibertoni et al.(2005). Para cada amostra de soro teste a DO média das duplicatas (DO_{MST}) foi expressa em relação à DO média das duplicatas do soro de referência positivo (DO_{MSRP}) e das duplicatas de soro de referência negativo (DO_{MSRN}) de acordo com a fórmula: $A/P = (DO_{MST} - DO_{MSRN}) / (DO_{MSRP} - DO_{MSRN})$.

Para comparar o desempenho dos ELISAI-NPr-IgM/ IgG-SORO, foram realizados testes de HI, conforme estabelece a OIE (2012), com as mesmas amostras séricas utilizadas no ELISA indireto.

4.5 Teste de inibição da hemaglutinação (HI)

Em linhas gerais, foi adotado o protocolo descrito pela OIE (2012) para a realização do teste de HI.

Para tanto, inicialmente foram colhidos aproximadamente 5mL de sangue de galinhas com anticoagulante (solução Alsever). Em seguida, a quantidade colhida (hemácias + anticoagulante) era filtrada, utilizando-se funil e algodão, lavada três vezes em PBS pH 7,2 e centrifugada à rotação de 4000rpm por 4 minutos. O sedimento resultante era diluído a 0,5% em PBS pH 7,2 + 0,1% de albumina e, em seguida, era feita a lise das hemácias utilizando-se 4,5mL de água destilada e 0,5mL da suspensão anterior. A densidade óptica desejada ($DO_{desejada} = 0,30$ a $0,33$) era mensurada em espectrofotômetro, no comprimento de onda de 545nm.

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

Uma vez determinado o título hemaglutinante do vírus, a etapa seguinte era submeter as amostras de soro ao teste de HI. Para tanto, eram colocados 25µL de PBS pH 7,2 + 0,1% de albumina em todas as cavidades e, na sequência, adicionado o soro de aves utilizando-se diluição seriada de razão 2. Em seguida, adicionaram-se 4 UHA do antígeno viral padronizado, com incubação por 30 minutos, à temperatura ambiente. Terminada esta etapa, a suspensão de hemácias de galinhas era adicionada às cavidades como sistema revelador da reação de HI, incubando-se por mais 30 minutos, à temperatura ambiente. O título era 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), de acordo com o preconizado pela OIE (2012). Nesse sentido, títulos maiores do que este valor eram considerados positivos, enquanto que títulos menores, julgados como negativos.

4.6 Análise dos resultados do testes ELISAI-NPr-IgA / IgM / IgG

Os níveis de Acs (valores A/P) anti-VDN mensurados pelo ELISAI-NPr- IgM / IgG-SORO foram analisados por regressão linear com os títulos de Acs do teste de HI mensurados como Log_{10} Título-HI obtidos dos soros de galinha testados, obtendo-se o coeficiente de correlação (r de Pearson) entre ambos testes sorológicos e usando-se o programa Excel (TAYLOR, 1990).

O ponto de corte foi estabelecido com base nos resultados da análise de 20 soros de galinha negativos para o VDN. Sendo assim, os parâmetros foram determinados a partir da média do valor A/P + 3 desvios 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 = $\frac{\text{Positivos verdadeiros}}{\text{Positivos verdadeiros} + \text{Falsos negativos}}$
- Especificidade = $\frac{\text{Negativos verdadeiros}}{\text{Falsos positivos} + \text{Negativos verdadeiros}}$
- Valor preditivo positivo = $\frac{\text{Positivos verdadeiros}}{\text{Positivos verdadeiros} + \text{Falsos positivos}}$
- Valor preditivo negativo = $\frac{\text{Negativos verdadeiros}}{\text{Falsos negativos} + \text{Negativos verdadeiros}}$
- Acurácia = $\frac{\text{Positivos verdadeiros} + \text{Negativos verdadeiros}}{\text{Valor total de soros}}$

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 Purificação da NPR do VDN e análise pelas técnicas de SDS-PAGE e de Western blotting

Com os parâmetros ideais já encontrados num estudo anterior de Silva et al. (2014), o clone A1, oriundo de uma clonagem e posteriormente transformado em células de linhagem para clonagem e expressão, foi agora, neste estudo, utilizado novamente para o desenvolvimento de um outro tipo de ensaio imunoenzimático. O clone bacteriano foi cultivado e a sua expressão induzida, após a adição de Isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside (IPTG - Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), na concentração de 0,4mM por 16 horas de incubação. O cultivo do clone bacteriano produziu em sua fração solúvel a NPR, no tamanho esperado, que é de aproximadamente 66 KDa, correspondente a 53 KDa da NP do VDN propriamente dita e um acréscimo de 13 KDa correspondente ao polipeptídeo SUMO junto com a poli-histidina (Figura 3).

Os resultados da análise, por meio de eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE), demonstraram uma banda cuja massa molecular correspondeu a aproximadamente 66 kDa (Figura 3 - A). O mesmo ocorreu quando a mesma amostra protéica foi utilizada na reação de Western blotting (Figura 3 - B) e, ainda, verificou-se que além da marcação da banda protéica de 66 kDa com o Ac monoclonal anti-histidina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), também houve a marcação de bandas de tamanhos menores do que a da NPR. Esses achados levaram a suposição de que se tratavam de fragmentos menores da NPR, ainda fusionados a etiqueta de histidina os quais, provavelmente, foram gerados pela degradação por proteases e, por essa razão, eram de menor peso molecular.

Resultados semelhantes a esses foram observados na expressão da NP do VDN por Kho et al. (2001) no sistema vetor pTrcHis2 (Invitrogen, Carlsbad, CA) – *E. coli* e também da proteína N do coronavírus da SARS (Síndrome respiratória aguda grave), no sistema vetor pET SUMO (Invitrogen, Carlsbad, CA) - *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).

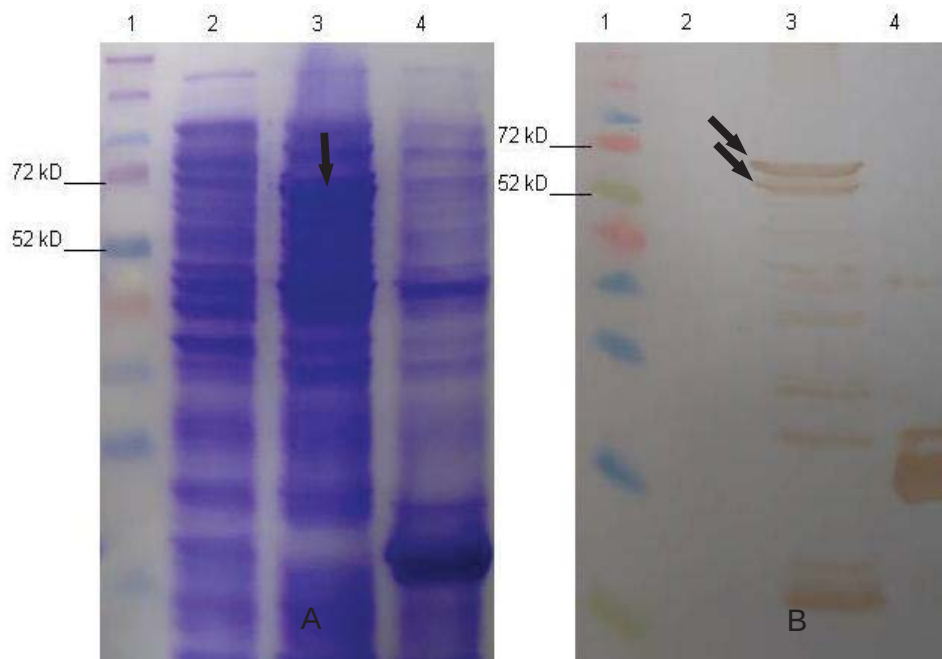


Figura 3. (A) Caracterização por SDS-PAGE da rNP expressa em *E. coli* do clone A1. Canaleta 1: 5 μ L Marcador molecular (spectra multicolor broad range protein ladder de 10 – 260 kDa, Thermo Scientific, Rockford, IL); canaleta 2: fração da cultura não induzida com IPTG (controle negativo da expressão); canaleta 3: fração induzida do clone A1 e canaleta 4: fração do extrato da cultura de *E. coli* com apenas o vetor pET SUMO sem o inserto do gene NP do VDN (controle + da expressão da “etiqueta” SUMO-Poli-His). **(B)** Caracterização por Western blotting (membrana espelho do gel de poliacrilamida/A) da NPr, onde foi usado Ac monoclonal anti-poli-histidina na diluição 1:2500. As setas destacam a produção da NPr.

Após expressão do clone A1, contendo o vetor pET SUMO com o inserto do gene NP do VDN, em média escala, obteve-se uma quantidade maior de NPr da cultura induzida, para posteriormente ser destinado a um protocolo de purificação dessa mesma proteína em resina de níquel-agarose. O extrato protéico bruto da fração solúvel obtido da indução em média escala do clone A1 revelou, pelo método de Bradford, concentração protéica de 23,79 mg/mL.

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 1,055 mg/mL (canaletas 5 Figura 4 - A e B). 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, apresentaram duas bandas protéicas que se destacaram pela sua maior intensidade, uma com cerca de 66kDa 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 revelaram, em princípio, que uma parte da NPr não estava se ligando à 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 NPr do VDN e a outra com menor peso molecular que o esperado, sendo que ambas reagiram com o Ac 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 4, onde podem ser comparados os perfis de separação eletroforética no gel de poliacrilamida (Figura 4 - A) e de reatividade com os Acs 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 e 7). Nessa membrana (Figura 4 - B), verificou-se que ainda havia um contaminante sendo eluído em conjunto com a NPr, o qual possivelmente era produto de uma proteólise ou ainda, poderia se tratar de proteínas próprias da bactéria *E. coli*.

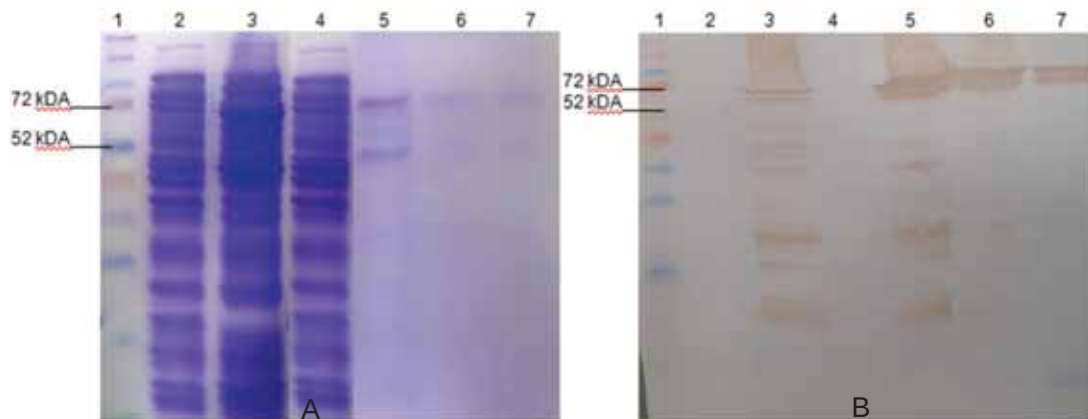


Figura 4. (A) Análise pela técnica de SDS-PAGE das frações de lavagem e eluição da resina de níquel-agarose nas diferentes etapas de purificação. Canaleta 1: 5 μ L de Marcador de peso molecular (spectra multicolor broad range protein ladder de 10-260 kDa, Thermo Scientific, Rockford, IL); canaleta 2: fração colhida do sobrenadante após a etapa de ligação da NPR à resina de níquel-agarose; canaletas 3 e 4: frações das etapas de lavagens (primeira e última) do lisado da resina de níquel-agarose após a etapa de ligação; canaletas 5, 6 e 7: extrato protéico purificado em resina de níquel-agarose do lisado da cultura de *E. coli* contendo a NPR após as etapas de lavagens. **(B)** Caracterização por Western blotting (membrana espelho do gel de poliacrilamida - A) da NPR, onde foi usado Ac monoclonal anti-poli-histidina na diluição 1:2500.

Para eliminar esse contaminante, como ilustra a canaleta 5 da Figura 4 - B, e evitar a sua interferência na elaboração dos testes de ELISA indireto destinado a detecção de anticorpos contra o VDN para diferentes isótipos, foi necessário fazer um bloqueio com extrato de *E. coli* a 10% no tampão diluente tanto para as amostras de soro quanto na diluição de cada conjugado imunoenzimático (anti IgA, IgM e IgG).

A análise pela técnica de Western blotting dos produtos da purificação da proteína recombinante NP em resina de níquel-agarose, tanto com o Ac monoclonal anti-histidina, como os Acs 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 NPR fusionada a etiqueta de poli-histidina e de uma segunda banda com peso molecular de aproximadamente 53 kDa que corresponde ao tamanho da NPR do VDN fruto de uma possível proteólise (Figura 5).

Além disso, a Figura 5 demonstra o elevado grau de homologia antigênica com relação à NP derivada de preparação concentrada de líquido córion alantóide infectado (LCAi) contendo esse mesmo vírus, já que o soro policlonal de aves hiperimunizadas com a estirpe LaSota do VDN reagiu com a fração da NPr fusionada com a etiqueta SUMO-poli-histidina e também com a NPr fruto de uma possível proteólise, talvez sem mesma etiqueta (canaleta 2) e ainda com a NP proveniente da suspensão concentrada do VDN (canaleta 3).

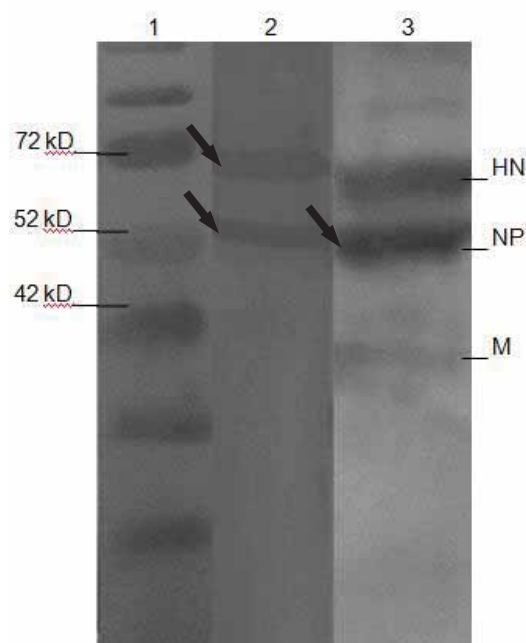


Figura 5. Membrana de Western blotting com “pool” de soros de galinha contendo Acs policlonais, para observar a sua reatividade contra a NP recombinante. Canaleta 1: 5 μ L Marcador de peso molecular (spectra multicolor broad range protein ladder de 10 – 260 kDa, Thermo Scientific, Rockford, IL); canaleta 2: fração solúvel da purificação (primeira eluição) e canaleta 3: estirpe LaSota concentrada com PEG, indicado pela seta à NP própria do VDN. As setas da canaleta 2 indicam a NPr expressa em duas diferentes alturas, a superior indica no tamanho de 66 kDa e inferior de 53 KDa.

Resultados semelhantes da análise de antigenicidade da NPr, 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, Steward e

Emmerson, (1995); Kho et al.(2001); Yusoff e Tan, (2001); Mebatsion et al. (2002); Kim et al. (2009) e por Silva et al. (2014).

De posse da NPr obtida, por meio de clonagem e expressão no sistema pET SUMO - *E. coli* descritas por Silva et al. (2014), e após a purificação em resina de níquel-agarose, foi demonstrada a sua capacidade de se combinar de forma específica com Acs 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 NPr do VDN teria atributos satisfatórios para ser aplicada em técnicas de imunodiagnóstico para o VDN.

5.2 Titulação em bloco da NPr do VDN frente aos soros e lágrimas de referências positivas e negativas

A titulação em bloco foi realizada no método indireto de ELISA com NPr produzida em *E. coli* submetida à análise de soros e de lágrimas de referência positivo e negativo de galinhas tanto para a detecção de Acs do isótipo IgG como IgM, no soro, (Figura 6 – A e B), quanto de Acs dos isótipos IgA, IgM e IgG, em lágrima, contra o VDN, (Figura 7 – A, B e C). Os resultados da titulação demonstraram que a reatividade de cada um dos isótipos, mensurada pelos valores de DOs, apresentaram uma variação do tipo dose-resposta, isto é, aumentaram com o incremento nas concentrações da NPr usada como antígeno e diminuíram à medida em que as amostras (soros e lágrimas) foram mais diluídas.

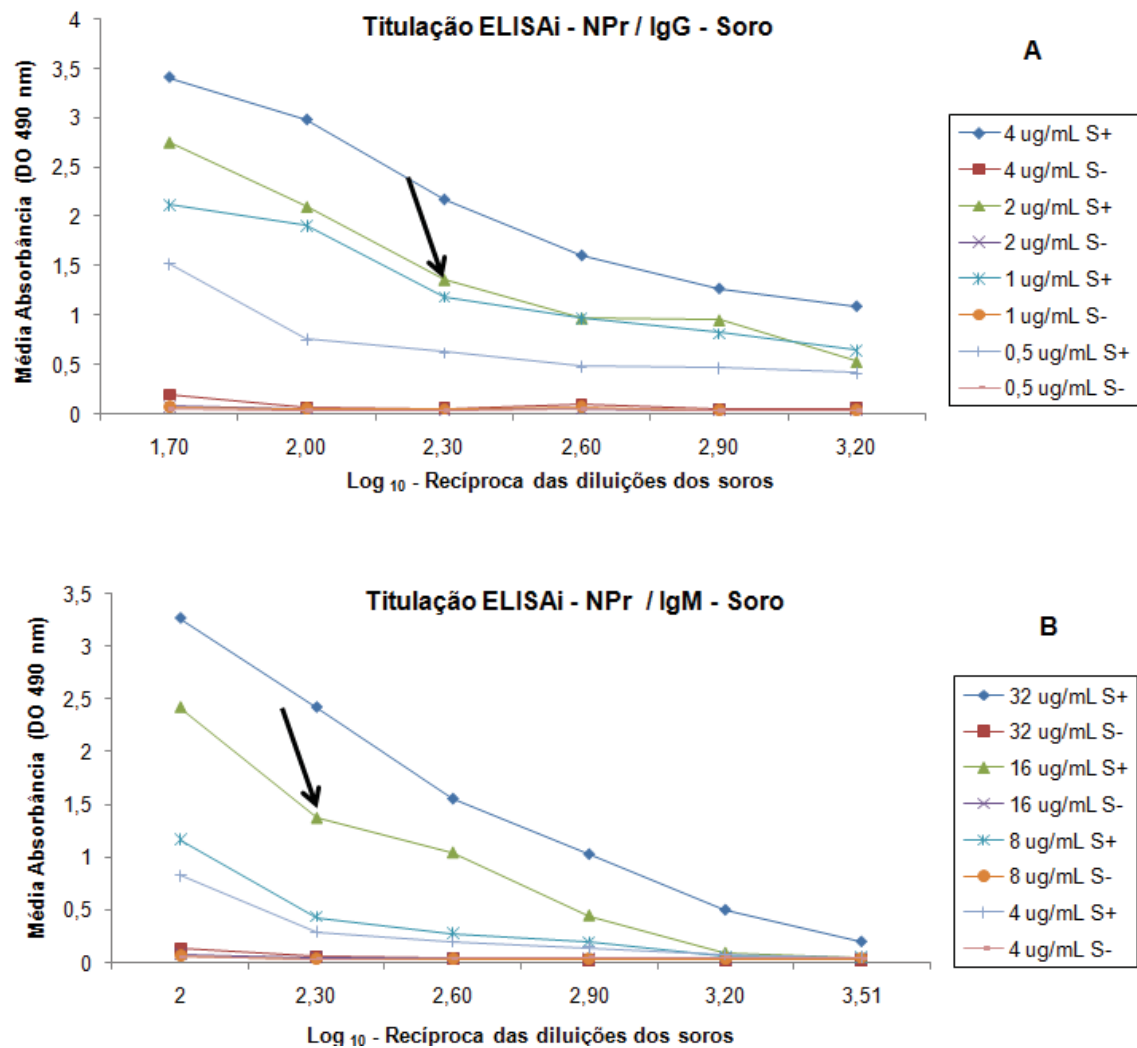


Figura 6. Titulação em bloco pelo método indireto de ELISA de diversas diluições de soros de galinha positivo e negativo de referência para o VDN, frente a diferentes concentrações da NPR do VDN produzida em *E. coli* para a detecção dos isótipos IgG **(A)** e IgM **(B)** de anticorpos contra o VDN. As setas indicam a concentração de uso para NPR e da diluição de uso para o soro.

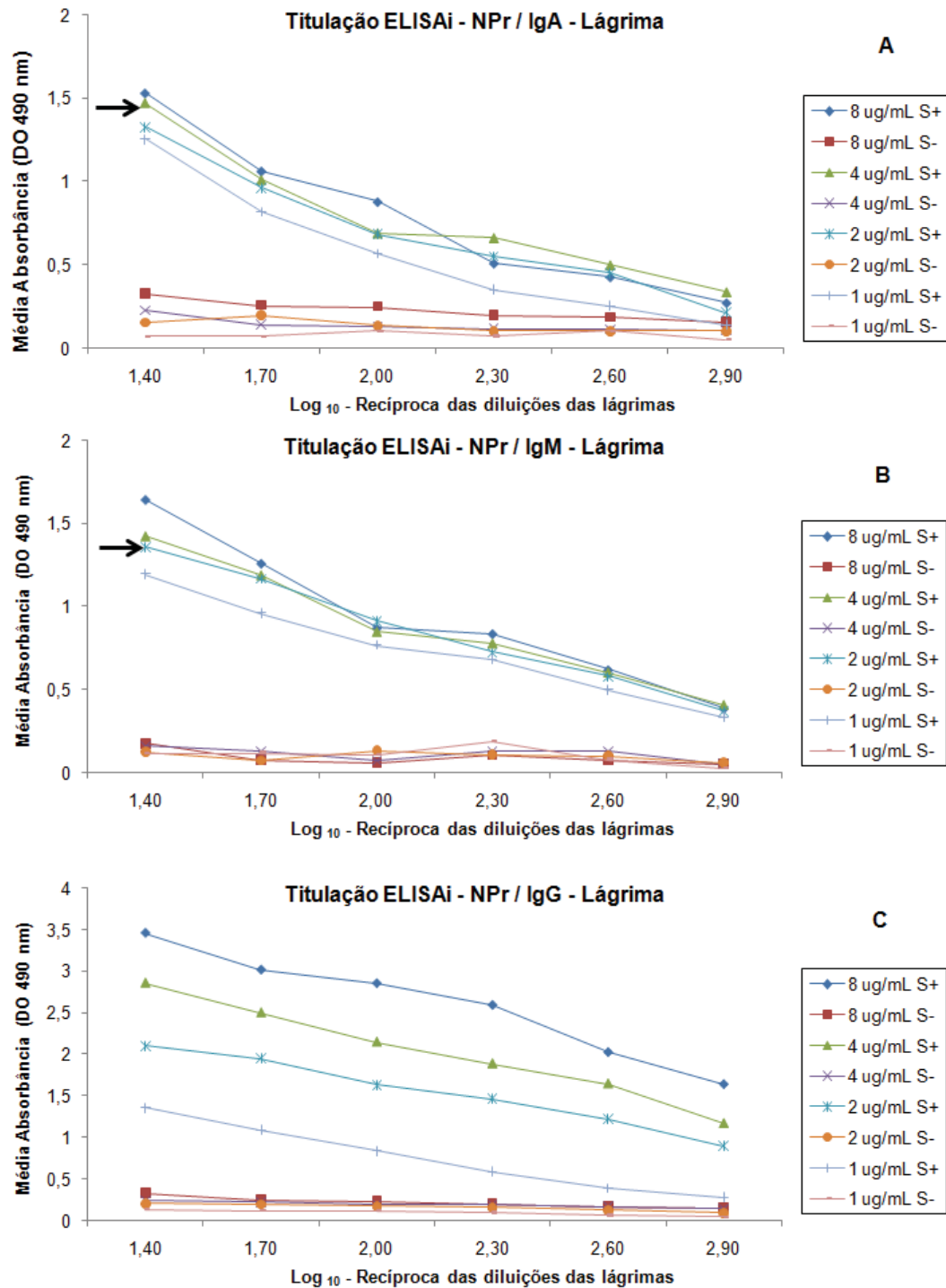


Figura 7. Titulação em bloco pelo método indireto de ELISA de diferentes diluições de lágrimas de galinha positiva e negativa de referência para o VDN (diluídos de 1:25 até 1:800), frente a diferentes concentrações da NPR do VDN produzida em *E. coli* para a detecção dos isótipos IgA (A), IgG (B) e IgM (C) de anticorpos contra o VDN. As setas indicam a concentração de uso para NPR e da diluição de uso para a lágrima.

Em face desses resultados foram definidas as condições ideais para que fossem aplicadas no teste de ELISA indireto, as quais são apresentadas no Quadro 2.

Quadro 2. Descrição dos parâmetros obtidos pela titulação em bloco da NPr do VDN, das amostras de soro e de lágrima de referências positiva e negativa e da diluição ideal de uso do conjugado imunoenzimático para cada isótipo pesquisado.

Isótipo/ Amostra	Concentrações ideais da NPr em µg/mL	Diluições únicas ideais de soros e de lágrimas	Diluição de uso do conjugado imunoenzimático
IgG – Soro	2	1:200	1:10.000
IgM – Soro	16	1:200	1:1.000
IgA – Lágrima	4	1:25	1:800
IgM – Lágrima	2	1:25	1:1000
IgG – Lágrima	1	1:25	1:1.500

Ainda, a análise de 20 amostras de soros de aves do controle negativo (não vacinadas e não infectadas) revelou ponto de corte em valor A/P (média do valor A/P + 3x desvio padrão) para cada um dos diferentes isótipos IgA, IgG e IgM, como descrito no Quadro 3.

Quadro 3. Descrição do ponto de corte em valor A/P (média do valor A/P + 3x desvio padrão) para cada um dos diferentes isótipos IgA, IgG e IgM, bem como para as diferentes amostras (soro e lágrima).

Isótipo/ Amostra	Ponto de corte em valor A/P
IgG – Soro	0,119
IgM – Soro	0,093
IgA – Lágrima	0,026
IgM – Lágrima	0,037
IgG – Lágrima	0,075

Os resultados da padronização dos métodos de ELISAI-NPr-IgA / IgG / IgM usando a NPr produzida em *E. coli* para a detecção de Acs anti-NP, do VDN, não só estão em concordância com os achados de estudos anteriores que haviam destacado que a NP, do VDN, além de ser altamente conservada e bastante imunogênica, promove elevada antigenicidade e é efetiva para a detecção de Acs anti-VDN; ou sob a forma de Acs totais ou ainda do isótipo IgG, no soro sanguíneo (ERRINGTON;

STEWART; EMMERSON, 1995; MAKKAY; KRELL; NAGY, 1998; KIM et al., 2009; SILVA et al., 2014), como também caracterizam novas propriedades e novas possibilidades de aplicações na detecção de Acs anti-VDN dos isótipos de IgA (em lágrima), IgM e IgG (em lágrima e soro), avaliando a eficiência da resposta imune humoral sistêmica e local, seja em vacinação e/ou infecção.

5.3 Aplicação do teste de ELISAI-NPr-IgA / IgM / IgG para a detecção de anticorpos específicos em aves experimentalmente infectadas

As amostras de soro sanguíneo e de lágrima, pertencentes às aves do grupo controle, que foram colhidas em diferentes intervalos após o desafio experimental com a estirpe vacinal LaSota, não apresentaram nenhuma positividade para os isótipos de Acs anti-VDN - IgA, IgM e IgG (Figuras 8 e 9). Quanto à ausência de investigação do isótipo IgA, no soro sanguíneo, é pelo fato desta classe de Acs apresentar-se em maiores concentrações e suas principais atividades funcionais nas secreções mucosas (SNOECK; PETERS; COX, 2006; WOOF; KERR, 2006).

As Figuras 8 e 9 mostram que no 7º e 14º dias pós-infecção (p.i.) os Acs anti-VDN, pertencentes aos isótipos IgA, IgM e IgG, foram detectados no soro sanguíneo e na secreção lacrimal de aves de postura infectadas experimentalmente com a estirpe LaSota, do VDN, pelo teste ELISAI-NPr-IgA / IgM / IgG, utilizando como antígeno a NPr produzida em *E. coli*.

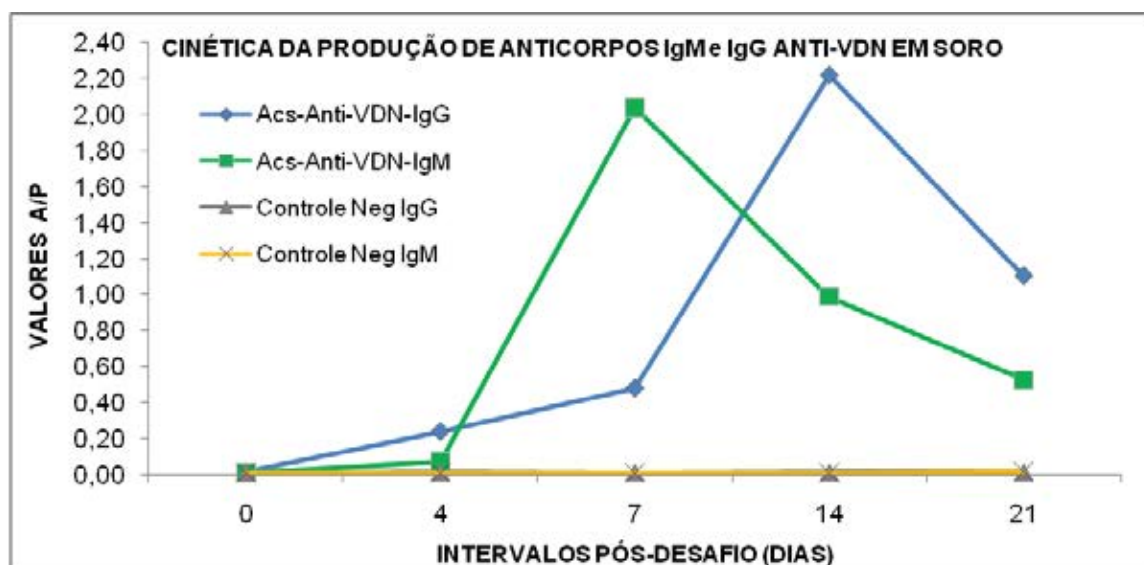


Figura 8. Cinética das respostas de anticorpos dos isótipos IgM ou IgG no soro de aves experimentalmente infectadas com a estirpe vacinal LaSota, do VDN, determinada pelo ELISAI-NPr-IgM / IgG usando a NPr produzida em *E. coli* da linhagem ER2566 e transformados com a construção plasmidial pETSUMO. Os níveis de anticorpos estão expressos como valores A/P médios.

Pode-se, também, observar nas Figuras 8 e 9, o perfil cinético da produção dos isótipos de imunoglobulinas IgG e IgM no soro sanguíneo e IgA, IgG e IgM na lágrima, após a infecção experimental com a estirpe vacinal LaSota. Dessa forma, níveis baixos e basais de Acs foram detectados nos dois primeiros intervalos p.i. analisados (dias 0 e 4 p.i.), embora os anticorpos da classe IgM, tanto no soro quanto na lágrima, e IgA na lágrima apresentaram um aumento significativo no 7º dia p.i, ocasião em que todas as 10 aves infectadas experimentalmente revelaram-se IgM positivos, nos compartimentos sistêmico e local, e IgA positivas, no compartimento local. No intervalo de 14 dias p.i., o isótipo IgG de Acs anti-VDN mostrou incrementos mais acentuados em suas concentrações em ambos compartimentos, sistêmico e de mucosa, enquanto que o isótipo IgM demonstrou uma ligeira redução em ambos locais e o isótipo IgA também apresentou diminuição na sua concentração nesse mesmo intervalo. No período pós-infecção subsequente (21 dias p.i.), todos isótipos apresentaram um declínio mais acentuado. Um ponto interessante a ser ressaltado nesses dois intervalos é que foram encontradas amostras positivas para todos isótipos e em ambos os compartimentos.

Dessa forma ficou claro que o ELISAI-NPr-IgA/IgM / IgG identificou e mensurou de forma clara e objetiva os níveis dos diferentes isótipos de Acs anti-VDN.

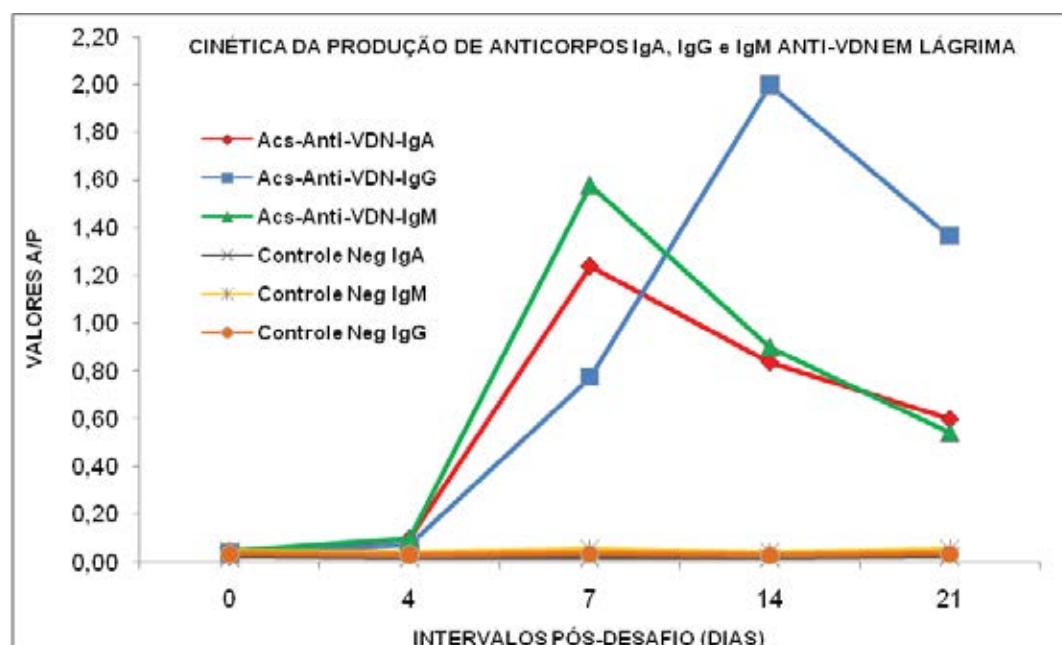


Figura 9. Cinética das respostas de anticorpos dos isótipos IgA, IgM ou IgG na lágrima de aves experimentalmente infectadas com a estirpe vacinal LaSota do VDN determinada pelo ELISAI-NPr-IgA / IgG / IgM usando a NPR produzida em *E. coli* da linhagem ER2566 e transformados com a construção plasmidial pETSUMO. Os níveis de anticorpos estão expressos como valores A/P médios.

Os resultados dos testes ELISAI-NPr-IgM / IgG para as respostas imunes humorais sistêmicas e ELISAI-NPr-IgA / IgM / IgG para as respostas imunes humorais locais descritos neste trabalho foram utilizados com sucesso para detecção de diferentes isótipos de Acs específicos para VDN no soro sanguíneo e secreção lacrimal. A cinética das respostas de Acs sistêmicos e locais foram muito semelhantes a trabalhos anteriores sobre o imunodiagnóstico do DN, os quais empregavam metodologias convencionais de ELISA realizados com preparações do VDN, purificadas ou não, como antígeno adsorvido à fase sólida. Essas investigações, registraram, tal como foi evidenciado aqui, que a cinética da produção de Acs do isótipo IgM são produzidos e detectados mais precocemente do que os Acs do isótipo IgG, tanto no

compartimento sistêmico (RUSSELL, 1993; RUSSELL, 1994; AL-GARIB et al., 2003; ZOTH, et. al., 2008), quanto no compartimento de imunidade local e que a produção e detecção dos isótipos de Acs seguem a seguinte ordem: primeiramente o isótipo IgM, seguido do isótipo IgA e mais tardiamente o isótipo IgG (RUSSELL, 1993; RUSSELL, 1994; AL-GARIB et al., 2003).

No soro, Acs específicos anti-VDN dos isótipos IgM e IgG foram encontrados no grupo vacinado com a estirpe viva vacinal, LaSota. Na secreção lacrimal, os isótipos IgA, IgM e IgG foram detectados após a vacinação local com a estirpe viva atenuada, LaSota. Russell (1994) também demonstrou a presença de Acs anti-VDN dos isótipos IgM e IgG no soro em diferentes intervalos de tempo, após a imunização com a estirpe vacinal Ulster inativada, por meio do ensaio de ELISA indireto usando como antígeno de fase sólida o VDN purificado obtido de cultura celular. No tocante às respostas imunes humorais locais, verifica-se que os nossos resultados estão de acordo com os de Russell (1993) e Al-Garib, et al. (2003), mas em contraste com aqueles relatados por Parry e Aitken (1973 e 1977), que não detectaram o isótipo IgM, porém usando o método de vírus-neutralização.

Além disso, Russell (1994) não foi capaz de detectar IgM no compartimento local, enquanto que nesse estudo esse isótipo foi encontrado em níveis significativos. Segundo esses autores, a eventual falha em detectar o isótipo IgA, no compartimento sistêmico, e IgM, no compartimento local, pode ser devido a competição causada por grandes quantidades de Acs IgG e IgM presentes no soro e de IgG e IgA em mucosa (AL-GARIB et al., 2003).

Uma importante vantagem do método de ELISA indireto é que ele permite a detecção de pequenas quantidades de uma classe de Acs em particular ou a presença de grandes quantidades de outras classes de Acs numa mesma amostra. Além disso, não há necessidade de purificar as classes de Acs, presentes nas amostras, antes de serem submetidas ao teste de ELISA, uma vez que na metodologia de ELISA indireto utiliza-se conjugado imunoenzimático anti-imunoglobulina específico (IgA, IgM ou IgG) para revelar a reação antígeno-anticorpo (AL-GARIB et al., 2003; PANYASING et al. 2013).

Nos mamíferos, as respostas imunes, sistêmica e de mucosa, são elaboradas para funcionar de forma mais ou menos independente. Portanto, a natureza e o tipo de Acs produzidos nas respostas imunes humorais locais e sistêmicas são principalmente determinados pela via de entrada do antígeno. Assim, a inoculação local com VDN “vivo” estimula a produção local de Acs e também a produção sistêmica no baço porque pequenas quantidades de vírus atingem o baço (SPANOGHE et. al., 1977; AL-GARIB et al., 2003). Dessa forma, os nossos resultados dos testes ELISAI-NPr-IgM / IgG (imunidade sistêmica) e ELISAI-NPr-IgA / IgM / IgG (imunidade local) são compatíveis com a produção local de Acs para as aves desafiadas com estirpe LaSota, do VDN, viva (RUSSELL; EZEIFEKA, 1995; AL-GARIB et al., 2003).

Além das semelhanças entre as cinéticas de anticorpos, já citadas anteriormente, para o próprio VDN, o perfil cinético determinado em nosso estudo é muito similar ao descrito por Panyasing et al. (2013), que por meio do desenvolvimento de um método de ELISA indireto com a NPr, do vírus da influenza A (VI), detectaram Acs anti-NP específicos para esse vírus, em amostras de fluidos orais de suínos infectados experimentalmente.

Portanto, fica mais fácil entender a razão por que o método ELISAI-NPr-IgM-SORO / LÁGRIMA, por nós desenvolvido com a NPr, do VDN, como antígeno, foi também efetivo em detectar, tal como demonstrou nas avaliações das cinéticas da resposta imune humoral (sistêmica e local), os Acs do isótipo IgM. Esses Acs são geralmente produzidos em uma fase inicial da resposta imune humoral, que ocorre logo após a infecção e precede a produção dos demais isótipos de Acs, com a vantagem, ainda, de que não seria necessário serem testadas amostras pareadas, seja de soro sanguíneo ou de amostras de secreção mucosa, como é requerido para se identificar o fenômeno da soroconversão, as quais são usadas rotineiramente para detecção de Acs anti-VDN do isótipo IgG, no compartimento sistêmico, ou de IgA, no compartimento local (CZIFRA, et al.1998; AL-GARIB et al., 2003).

Além disso, pode-se inferir que a presença dos Acs do Isótipo de IgA, na secreção lacrimal, e IgM, no soro sanguíneo e lágrima, provavelmente desencadearão uma resposta mais rápida e protetora frente à uma nova exposição ao VDN, devido ao

desenvolvimento da resposta imune de memória após a vacinação, a qual cria no hospedeiro um repertório de linfócitos de memória capaz de identificar o agente de forma mais rápida e específica, com consequente síntese de Acs mais precocemente. Por causa de seu aparecimento de forma rápida e inicial, tem sido sugerido que a detecção de anticorpos IgM pode ser considerada como um indicativo de infecção recente pelo VDN (AL-GARIB et al., 2003).

Os resultados dos testes ELISAI-NPr-IgA / IgM / IgG empregados nesse estudo demonstraram, de forma nítida, que os Acs dos isótipos IgA, IgM e IgG produzidos pelas aves submetidas à infecção experimental com a estirpe LaSota, apresentaram elevado nível de similaridade antigênica com a NPr expressa em *E. coli*. Resultados semelhantes aos nossos, porém apenas para a detecção dos Acs do isótipo IgG ou totais, foram relatadas com a NPr, do VDN, produzida em *E. coli* (KIM, et al., 2009; SILVA et al., 2014), ou com essa mesmo antígeno recombinante produzido em células de inseto por meio do sistema baculovírus de expressão (ERRINGTON; STEWARD; EMMERSON, 1995; MAKKAY; KRELL; NAGY, 1998). Com base nisso e no fato de se ter disponível uma preparação da NPr, do VDN, produzida em *E. coli* e caracterizada imunologicamente, foi possível desenvolver e aplicar de forma efetiva o método de ELISA indireto, empregando como antígeno recombinante para detectar/mensurar Acs anti-VDN específicos dos isótipos IgA, IgM e IgG presentes em amostras de soro sanguíneo e lágrima de aves de postura vacinadas submetidas à infecção experimental com estirpe vacinal LaSota do VDN.

Em síntese, os isótipos de Acs IgA, IgM e IgG específicos de NP, foram detectáveis no soro sanguíneo e na secreção lacrimal, ao longo do tempo após a inoculação experimental do VDN, com respostas de IgG correlacionados em ambos compartimentos de respostas imunes humorais sistêmica e local.

5.4 Aplicação do teste do ELISAI-NPr-IgA / IgG / IgM para a detecção de anticorpos anti-virais específicos em amostras de soro e lágrima de aves de postura comercial

Com relação à análise das amostras de campo colhidas em granjas de aves de postura vacinadas para o VDN, foram detectados níveis relevantes de anticorpos contra a nucleoproteína do VDN tanto da classe IgG como da IgM no soro sanguíneo, bem como para os isótipos IgA, IgG e IgM em secreção lacrimal. Foi analisado um total de 270 amostras de soro, pareados com a lágrima das mesmas aves para cada um desses isótipos. Com base nos resultados do ELISAI-NPr-IgM / IgG para os soros foram obtidas 263 amostras com resultados coincidentes quanto à detecção de Acs anti-VDN, sendo 241 positivas simultaneamente para os isótipos IgG e IgM e 22 foram classificadas como negativas para ambos isótipos. Por outro lado, sete amostras apresentaram resultados discordantes, sendo cinco positivos somente para os anticorpos do isótipo IgM enquanto que apenas duas amostras revelaram-se positivas para os anticorpos do isótipo IgG. Os resultados concordantes (IgG+/IgM+) ocorreram nas amostras séricas dos lotes I, II e III, que foram constituídos por aves mais jovens em relação aos lotes IV e V e os resultados concordantes negativos (IgG-/IgM-) foram das amostras oriundas de aves do lote I (Tabela 1).

Tabela 1. Resultados do ELISAI-NPr-IgM / IgG para detecção de anticorpos anti-VDN dos isótipos IgG e IgM em amostras de soro de aves postura comercial.

Classificação das amostras de soro	Aves de postura comercial testadas	Porcentagem (%)
ELISAI-NPr-IgM / IgG		
IgG+ IgM+	241	89,3%
IgG+ IgM-	2	0,7%
IgG- IgM+	5	1,9%
IgG- IgM-	22	8,1%
Total	270	100%

Com respeito aos resultados do ELISAI-NPr-IgA / IgM / IgG para a detecção de Acs na secreção lacrimal foram observadas 189 amostras coincidentes no que concerne à detecção de Acs anti-VDN, sendo 169 positivas simultaneamente para os isótipos IgA, IgG e IgM e 20 classificadas como negativas para os três isótipos avaliados. Por outro lado, 81 amostras apresentaram resultados discordantes, sendo 28 positivos para os anticorpos dos isótipos IgA e IgM; 29 positivos para os isótipos IgA e IgG; dois positivos apenas para IgA, enquanto para IgM e IgG foram 12 amostras co-positivas. Ainda, desse conjunto de amostras, apenas seis foram positivas para IgM e quatro para IgG. Assim como ocorreu na análise das amostras de soro, a maior parte dos resultados concordantes (IgA+/IgG+/IgM+) para as amostras de lágrimas ocorreram nas amostras séricas dos lotes I, II e III, que foram constituídos por aves mais jovens em relação aos lotes IV e V e os resultados concordantes negativos (IgG-/IgM-) foram das amostras oriundas de aves do lote I (Tabela 2).

Tabela 2. Resultados do ELISAI-NPr-IgA / IgM / IgG para detecção de anticorpos anti-VDN dos isótipos IgA, IgG e IgM em amostras de lágrima de aves postura comercial.

Classificação das amostras de lágrima	Aves de postura comercial testadas	Porcentagem (%)
ELISAI-NPr-IgA / IgM / IgG		
IgA+ IgG+ IgM+	169	62,6%
IgA+ IgG- IgM+	28	10,4%
IgA+ IgG+ IgM-	29	10,7%
IgA+ IgG- IgM-	2	0,7%
IgA- IgG+ IgM+	12	4,4%
IgA- IgG- IgM+	6	2,2%
IgA- IgG+ IgM-	4	1,5%
IgA- IgG- IgM-	20	7,4%
Total	270	100%

Os resultados de frequência relativa entre a quantidade de amostras classificadas em IgG e IgM positivas, individualmente, e de amostras classificadas IgG e IgM positivas, com base nos testes de ELISAI-NPr-IgM/IgG-SORO, foram submetidas ao teste estatístico McNemar, pois esse faz uma análise de proporções pareadas. As amostras IgG positivas apresentam um frequência relativa de 97,2%, para as amostras IgM positivas a frequência foi de 98,4%, e para ambos isótipos de Acs, IgG e IgM positivos a frequência foi de 99,2%. Sendo assim, fica evidenciado que há uma diferença estatística na classificação de amostras IgG e IgM positivas (Figura 10).

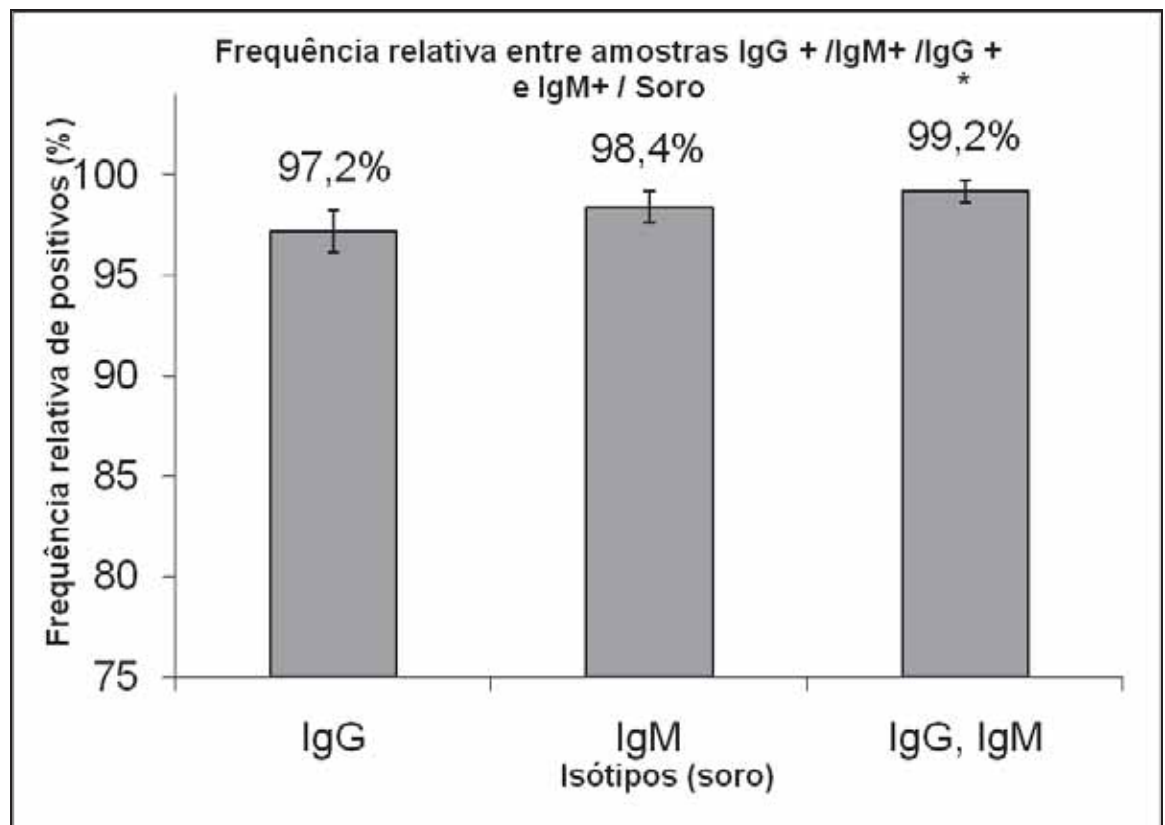


Figura 10. Frequência relativa entre a quantidade de amostras classificadas em IgG positiva, IgM positiva, individualmente, e IgG e IgM positiva, simultaneamente, no compartimento sistêmico (soro sanguíneo) de aves de postura comercial.

Do mesmo modo, foram analisadas pelo teste estatístico McNemar as amostras de lágrimas submetidas aos testes ELISAI-NPr-IgA/IgM/IgG-LÁGRIMA. Em relação ao teste de proporções pareadas as amostras classificadas em IgA positivas foi de 91,2%, enquanto que quando comparadas com mais de isótipo IgA e IgG positivas foi, de 97,6%, o que ficou próximo de 98,4% para IgA e IgM positivas e para IgA, IgG e IgM positivas a frequência atingiu 100% (Figura 11).

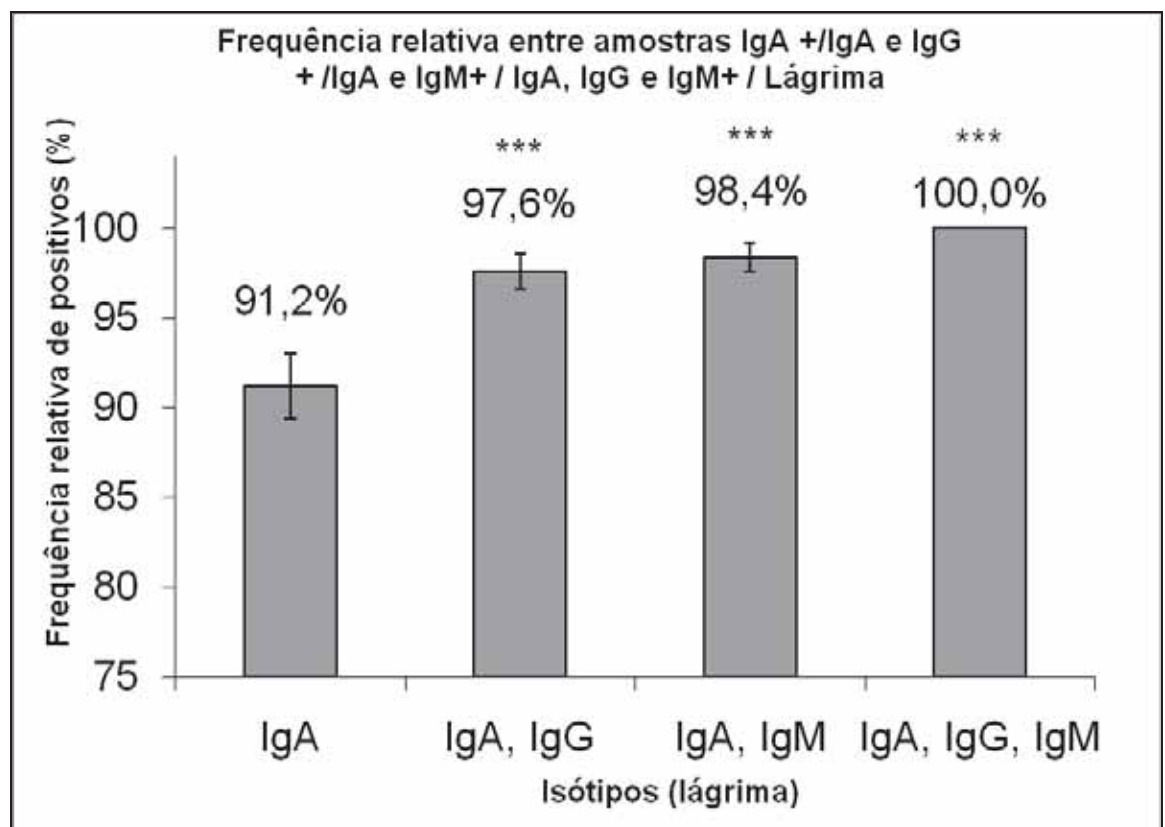


Figura 11. Frequência relativa entre a quantidade de amostras classificadas em IgA positiva, individualmente, IgA e IgG positivas, IgA e IgM positivas, e IgA, IgG e IgM positivas simultaneamente, no compartimento de imunidade local (lágrima) de aves de postura comercial.

Em síntese, os Acs do isótipo IgG são frequentemente pesquisados, na avicultura industrial, a detecção e/ou mensuração no compartimento sistêmico (soro sanguíneo), enquanto que para avaliação das respostas imunes humorais no

compartimento das mucosas são pesquisados a detecção e/ou mensuração de Acs do isótipo IgA. Com base nos resultados dos testes de ELISAI-NPr-IgM/IgG-SORO e ELISAI-NPr-IgA/IgM/IgG-LÁGRIMA das amostras de aves de postura comercial obteve-se uma maior frequência relativa (%) para as amostras classificadas em dois ou mais isótipos.

A redução gradual na ocorrência da enfermidade é devido a controles intensivos na criação comercial, por meio de programas de vacinação eficientes, além dos esforços do governo federal, por meio do PNSA (OIE, 2012). Entretanto, a DN continua endêmica no Brasil (SEAL et al., 1998; CLAVIJO et al., 2000, ORSI, 2010). 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.

5.5 Relações entre os resultados do ELISAI-NPr-IgM / IgG-Soro e do teste de HI usados na detecção de anticorpos contra o VDN

O gene da NP, do VDN, já foi clonado e expresso em diferentes sistemas: sistema baculovírus de expressão (ERRINGTON et al., 1995 e MAKKAY; KRELL; NAGY, 1998) e sistema *E. coli* de expressão (KIM, et al., 2009; SILVA et al., 2014) sendo utilizado como um antígeno de adsorção de fase sólida em diferentes formatos de ELISA para detectar Acs anti-VDN. No entanto, os parâmetros de sensibilidade, especificidade, acurácia e concordância não foram determinados nestes estudos anteriores, incluindo a comparação com o teste HI, que atualmente é o padrão ouro para a sorologia de Acs anti-VDN (OIE, de 2012).

Os resultados da mensuração de Acs contra o VDN obtidos no teste de HI e no teste de ELISA têm sido constantemente avaliados e correlacionados no sorodiagnóstico da DN em diferentes espécies de aves, os quais evidenciam na maioria dos estudos, valores moderados a elevados de correlação, sensibilidade e

especificidade (CZIFRA et al., 1998; SILVA et al., 2014). No presente trabalho, buscou-se desenvolver um método alternativo de ELISA indireto para detecção de Acs anti-VDN dos isótipos IgA, IgM e IgG, utilizando como antígeno a NPr, do VDN, expressa em *E. coli*, em comparação com o teste padrão de sorodiagnóstico HI com os isótipos IgG e IgM.

Assim sendo, foram determinados os níveis de correlação, concordância, sensibilidade, especificidade e acurácia, bem como os valores preditivos positivos e negativos do ELISAI-NPr-IgG / IgM em relação ao teste de HI, parâmetros esses que não foram discriminados de forma clara e objetiva nos trabalhos de clonagem e expressão da NPr, do VDN, em células de insetos infectadas por baculovírus e *E.coli*.

Sabe-se ainda que outros pesquisadores já utilizaram, com bons resultados, as proteínas de nucleocapsídeo de outros vírus como: vírus da caxumba (LINDE et al., 1987), vírus do sarampo (HUMMEL et al., 1992), vírus da estomatite vesicular, vírus da peste bovina (KAMATA et al., 1993), vírus da bronquite infecciosa das galinhas e coronavírus dos perus (NDIFUNA et al., 1998; CHEN; COOTE; HISCOX, 2003; LOA et al., 2004); vírus da raiva (REID-SANDEN et al., 1990), vírus da influenza suína (PANYASING, et al., 2013) e do próprio VDN (AHAMAD et al., 1993; ERRINGTON; STEWARD; EMMERSON, 1995; KIM et al., 2009; SILVA et al., 2014) na adsorção a superfície de microplacas de ensaios imunoenzimáticos.

Na literatura existem vários estudos de comparação de diferentes métodos de ELISA (indireto, competitivo, sanduíche, dentre outros) com o teste de HI para a mensuração de Acs contra o VDN, nos quais foram obtidos coeficientes de correlação significantes entre essas duas técnicas. A análise comparativa dos testes de ELISAI-NPr-IgG / IgM e de HI com o grupo de 270 amostras séricas de aves de postura proporcionou coeficiente de correlação alto ($r = 0,760$) para correlação HI e ELISAI-NPr-IgG-SORO, e um coeficiente de correlação moderado ($r = 0,490$) para a relação HI e ELISAI-NPr-IgM-SORO.

Em outras pesquisas, foram observados tanto valores de correlação superiores ou inferiores aos encontrados na análise de correlação HI e ELISAI-NPr-IgG-SORO ($r = 0,760$), em soros de aves vacinadas contra o VDN por Thayer; Villegas; Fletcher,

(1987) em dois diferentes kits comercial em relação ao HI ($r = 0,98$ / $r = 0,95$); Witt, Davelaar e Braunius, (1992) $r = 0,95$ e Richtzenhain et al. (1993) $r = 0,96$. Como valor semelhante ao nosso estudo, Brown et al. (1990) observaram $r = 0,85$ e Cveliccabrilo et al. (1992) encontraram $r = 0,85$ enquanto Czifra et al. (1998) demonstraram valores inferiores ao encontrado no presente estudo de $r = 0,72$. Enquanto que, Adair et al. (1989), obtiveram valores de correlação de $r = 0,75$, ao testarem soros de galinhas e perus; Koch et al. (1998) encontraram $r = 0,71$ ao comparar o ELISA e HI com amostras de soros de avestruzes e Hauslaigner et al. (2009) detectaram $r = 0,652$ em estudo com amostras de soros de patos e gansos vacinados e não-vacinados.

De qualquer sorte, pode-se prever a ocorrência de alguns resultados discordantes entre os testes de ELISAI-NPr IgG / IgM-SORO desenvolvidos, nesse estudo, e o teste de HI, já que se tratam de alvos antigênicos bem diferentes, ou seja, a NP, no ELISA e a glicoproteína HN, no teste de HI. A respeito disso, o coeficiente de correlação encontrado entre o ELISAI-NPr IgG - Soro e o HI pode ser classificado como elevado ($r=0,760$), sugerindo que as amostras de soro de galinhas submetidas à imunização com o VDN, no geral, contêm Acs para esses dois tipos de antígenos (NP e HN). Errington, Steward e Emmerson (1995) classificaram como bom o coeficiente de correlação, do ELISA indireto desenvolvido por esses autores com NPr oriunda do sistema baculovírus de expressão.

Em nosso estudo, verificou-se também que os títulos de Acs HI variaram de 0,301 a 3,311 (Log_{10} título), enquanto que os níveis de Acs do ELISAI-NPr IgG – Soro variaram de -0,037 a 2,845 (valor A/P) e o ELISAI-NPr IgM – Soro variaram de -0,034 a 2,129 (valor A/P), conforme ilustra as Figuras 10 e 11, respectivamente. Por mais que os resultados mencionados anteriormente sejam semelhantes, deve-se reforçar que no HI a reação antígeno-anticorpo ocorre devido à presença das glicoproteínas de superfície HN e nos testes de ELISA apenas NPr do VDN está adsorvida à superfície das microplacas.

Além disso, os resultados obtidos no teste de HI, tido como padrão-ouro para a detecção e/ou mensuração de anticorpos contra o VDN, e no ELISAI-NPr IgG / IgM - Soro, mostraram que as aves de postura produziram quantidades relevantes de Acs

após a infecção experimental com a estirpe vacinal atenuada LaSota do VDN. E, nesse sentido, ambos os testes realizados detectaram no soro sanguíneo das aves de postura níveis de Acs anti-VDN variando de moderado (ELISAI-NPr-IgM-Soro) a elevado (ELISAI-NPr IgG-Soro). Isso ocorreu, principalmente, devido ao fato de terem sido testadas amostras obtidas de aves que haviam recebido quatro doses seguidas de reforços com vacina viva atenuada de VDN, o que pode ser considerado um protocolo de indução de hiperimunização, que levou a produção de altos títulos de Acs contra o VDN, o que é importante para a avicultura por garantir altos títulos de Acs maternos, ou seja, passados da mãe para a progênie (VILLEGAS; AVELLANEDA, 1992).

Em contrapartida, os Acs induzidos por vacinas recombinantes construídas a partir das glicoproteínas de superfície viral (HN e F) do VDN expressas em células eucariontes transfectadas por poxvírus ou em *Pichia pastoris* (BOURSNELL et al., 1990; TAYLOR et al., 1990; OGAWA et al., 1999; PEETERS et al., 2001), não apresentariam reações com a NPr nos testes de ELISA indireto aqui desenvolvidos, mas esses soros poderiam ser mais facilmente diferenciados daqueles provenientes de aves infectadas com o VDN, pois os Acs induzidos pela infecção acarretariam a produção de Acs contra a NP, sendo assim detectados nos testes de ELISAI-NPr IgG / IgM-SORO, além de outros Acs contra os outros alvos antigênicos do VDN.

Dessa forma, pode-se supor que os testes de ELISAI-NPr IgG / IgM – Soro distinguiriam tais tipos de respostas imunes, da mesma forma que foi demonstrado nos estudos envolvendo a análise de amostras séricas de aves imunizadas com vacinas recombinantes constituídas pelo gene completo ou de porções da proteína HN, embora não tenham sido testados no presente estudo (PEETERS et al., 2001; MEBATSION et al., 2002).

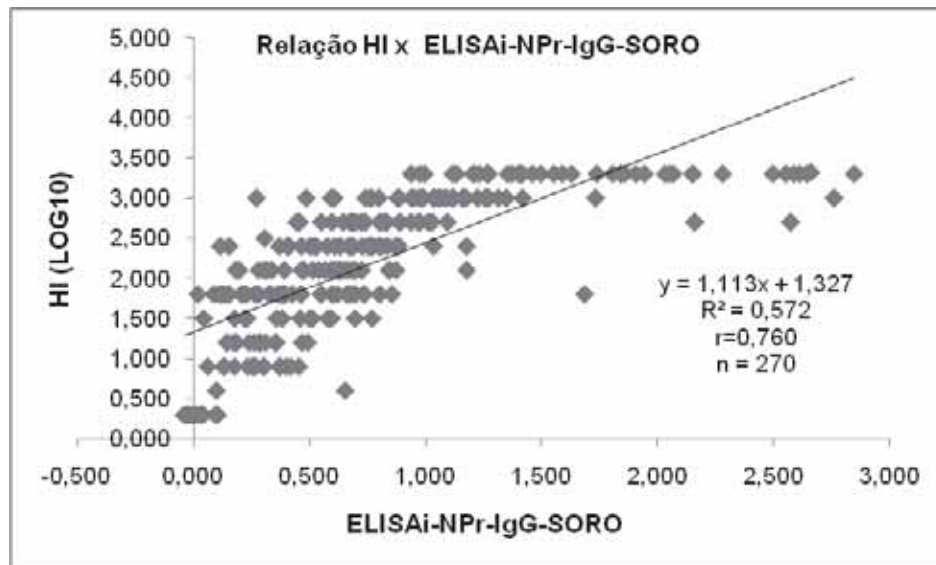


Figura 12. Correlação entre os níveis de anticorpos detectados pelo teste de HI (Log_{10} Título) e pelo ELISAI-NPr-IgG-SORO (Valor A/P).

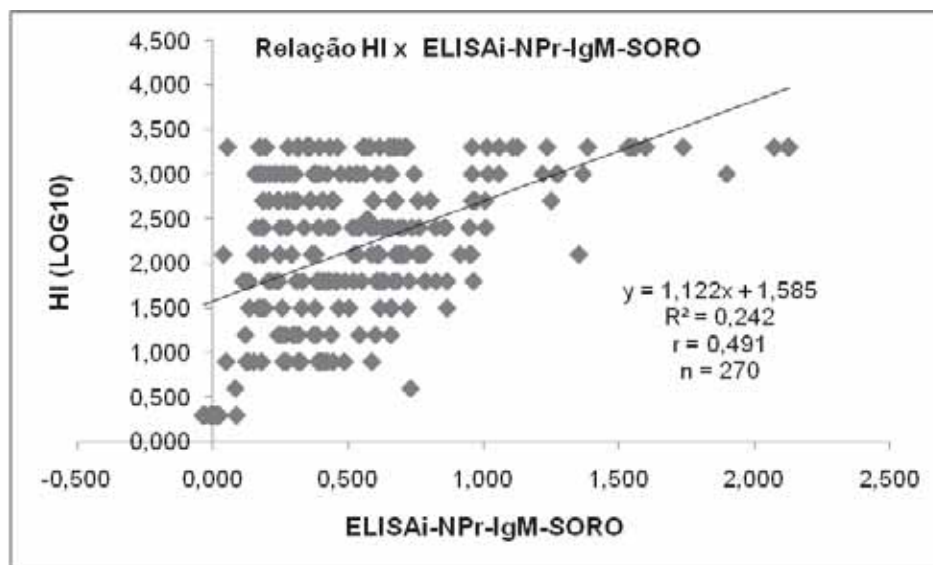


Figura 13. Correlação entre os níveis de anticorpos detectados pelo teste de HI (Log_{10} Título) e pelo ELISAI-NPr-IgM-SORO (Valor A/P).

Para validação da eficiência dos testes de ELISAI-NPr-IgG / IgM-SORO, os resultados foram comparados com os obtidos no teste de HI (Tabelas 3 e 4). Dos 270 soros de galinhas de postura analisados, 243 amostras positivas e 21 amostras

negativas foram concordantes no ELISAI-NPr-IgG e no teste de HI, sendo que cinco soros apresentaram reação falso-negativa e um soro apresentou reação falso-positiva no teste de ELISA (Tabela 3). Comparando o ELISAI-NPr-IgM e o teste de HI dos 270 soros analisados, 245 amostras positivas e 21 amostras negativas foram concordantes no ELISAI-NPr-IgM e no teste de HI, sendo que três soros apresentaram reação falso-negativa e um soro apresentou reação falso-positiva no teste de ELISA (Tabela 4).

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; SOHR; GOBEL, 1995). A determinação do ponto de corte baseou-se na média acrescida de três desvios padrão, similar ao que foi realizado por Sousa, Montassier e Pinto (2000) e Silva et al. (2014). De posse desses dados, determinou-se a sensibilidade relativa dos ELISAI-NPr-IgG / IgM-SORO, que correspondeu a 97,6% e 98,8%, respectivamente. Em relação a reações falso-positivas, ambos os testes de ELISA apresentaram apenas um soro, o que corresponde a uma especificidade relativa de 95,5% para os testes ELISAI-NPr-IgG / IgM-SORO e teste de HI (Tabelas 3 e 4).

Os valores preditivos negativos (VPN) da comparação entre ELISAI-NPr-IgG / IgM-SORO e HI foram 77,8% e 87,5%, respectivamente, e os valores preditivos positivos (VPP) foram iguais em ambas as comparações - 99,6% (Tabelas 3 e 4), enquanto que a acurácia foi de 97,4% para ELISAI-NPr-IgG-SORO e teste de HI (Tabela 3) e de 98,5% para ELISA-NPr-IgM-SORO e teste de HI (Tabela 4).

Sousa et al. (1999), ao testarem soros de aves de corte vacinadas contra o VDN e compararem os resultados entre o sanduíche ELISA com Duplo Anticorpo (DAS-ELISA) e o teste de HI, verificaram que a acurácia para o DAS-ELISA relativa ao teste de HI foi de 88,8%, inferior à que foi determinada no presente estudo. No entanto, esses mesmos autores encontraram uma especificidade de 100% e sensibilidade de 88,80%, a qual é inferior à sensibilidade aqui obtida para os ensaios de ELISAI-NPr-IgG/IgM-SORO em relação ao teste de HI.

Ademais, em outro trabalho, Sousa, Montassier e Pinto (2000) observaram resultados um pouco melhores de sensibilidade relativa do ELISA frente ao HI

(90,91%), que foram, porém, ainda menores do que os valores de sensibilidade do nosso estudo, enquanto que a especificidade relativa apresentou no estudo desses autores um ligeiro decréscimo para 91,18%, que é um pouco menor do que a especificidade determinada em nosso estudo (95,5%). Ainda, o nível de acurácia entre os dois testes foi de 91,02%, valor um pouco menor ao dos nossos testes de ELISAI-NPr-IgG/IgM-SORO, em relação HI (97,4% e 98,5% respectivamente). Enquanto os VPP e VPN foram de 93,02% e 88,57%, respectivamente, sendo menor o VPP e maior o VPN comparado ao ELISAI-NPr-IgG/-SORO e HI (VPP = 99,6% e VPN=77,8%) e ao comparar os resultados ELISAI-NPr-IgM/-SORO e HI, o VPP (99,6%) e VPN (88,7%) foram ligeiramente superiores aos de Sousa, Montassier e Pinto (2000).

Ainda em relação aos resultados da análise comparativa entre os testes sorológicos de ELISAI-NPr-IgG / IgM –SORO e o HI, verifica-se que os testes de ELISA indireto desenvolvidos nesse estudo demonstraram concordâncias muito boas ($k = 0,84$ e $k = 0,90$), respectivamente. (Tabela 3 e 4). A propósito, Czifra et al. (1998) e Sousa; Montassier e Pinto (2000), ao compararem o método competitivo de bloqueio de ELISA e o teste de HI, na análise de soros de ratitas, relataram menores valores de concordância ($k = 0,67$ e $k = 0,82$), enquanto que BROWN et al.(1990), KOCH et al. (1998), na análise de soros de galinhas, encontraram valores de concordância mais próximos aos do nosso estudo ($k = 0,84$; $k = 0,85$).

Em vista do conjunto de resultados obtidos no presente estudo, constata-se que os métodos de ELISAI-NPr-IgM/IgG-SORO e ELISAI-NPr-IgA/IgM/IgG-LÁGRIMA trouxeram vantagens relevantes para a detecção mais precoce e mais sensível de Acs contra o VDN em aves infectadas ou vacinadas com o VDN, seja no compartimento sistêmico, seja no compartimento local e têm o potencial de contribuir com o aprimoramento do imunodiagnóstico desse vírus.

Tabela 3. Comparação dos resultados obtidos nas técnicas de HI e ELISAI-NPr-IgG-SORO para a detecção de anticorpos para VDN em soros de aves de postura comercial e análises de validação do teste.

ELISA-NPr-IgG-SORO	Resultados HI – Padrão ouro		
	Positivos	Negativos	Total
Positivos	243 (a)	1 (b)	244 (a+b)
Negativos	5 (c)	21(d)	26 (c+d)
Total	248 (a+c)	22(b+d)	270(a+b+c+d)

Sensibilidade relativa: $(a) / (a+c) \times 100 = 244/248 \times 100 = 97,6\%$

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

Valor preditivo positivo: $(a) / (a+b) \times 100 = 244/245 \times 100 = 99,6\%$

Valor preditivo negativo: $(d) / (c+d) \times 100 = 21/25 \times 100 = 77,8\%$

Acurácia: $(a) + (d) / (a+b+c+d) \times 100 = (244+21)/270 \times 100 = 97,4\%$

Índice kappa (grau de concordância corrigido): 0,84 (<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).

Tabela 4. Comparação dos resultados obtidos nas técnicas de HI e ELISA-NPr-IgM-SORO para a detecção de anticorpos para VDN em soros de aves de postura comercial e análises de validação do teste.

ELISA-NPr-IgM-SORO	Resultados HI – Padrão ouro		
	Positivos	Negativos	Total
Positivos	245 (a)	1 (b)	246 (a+b)
Negativos	3 (c)	21(d)	24 (c+d)
Total	248 (a+c)	22(b+d)	270(a+b+c+d)

Sensibilidade relativa: $(a) / (a+c) \times 100 = 245/248 \times 100 = 98,8\%$

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

Valor preditivo positivo: $(a) / (a+b) \times 100 = 245/246 \times 100 = 99,6\%$

Valor preditivo negativo: $(d) / (c+d) \times 100 = 21/24 \times 100 = 87,5\%$

Acurácia: $(a) + (d) / (a+b+c+d) \times 100 = (245+21)/270 \times 100 = 98,5\%$

Índice kappa (grau de concordância corrigido): 0,90 (<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).

6. CONCLUSÕES

6.1 O sistema de expressão constituído pelo vetor pET-SUMO e *E. coli* demonstrou sua eficiência para a expressão de níveis relevantes da NPr da estirpe LaSota do VDN fusionada a etiqueta SUMO-Poli-Histidina, bem como a sua purificação.

6.2 A NPr expressa pelo sistema pET SUMO – *E. coli* apresenta características imunoquímica similares aos da NP oriunda da estirpe LaSota do próprio VDN.

6.3 O método de ELISAI usando o NPr do VDN como antígeno foi padronizado e aplicado de forma bem sucedida, nesse estudo, para a detecção de Acs de galinha anti-VDN dos isótipos IgG, IgM e IgA em amostras de soro e/ou de secreção lacrimal de aves infectadas ou vacinadas com esse vírus. A soroconversão na infecção experimental pelo VDN foi detectada pelo método ELISAI usando a NPr do VDN, mais precocemente em aves infectadas experimentalmente com esse vírus para os Acs do isótipo IgM (lágrima e soro) e IgA (lágrima) do que para os Acs IgG anti-NDV (lágrima e soro). Os testes de ELISAI-NPr- IgG / IgM-SORO desenvolvidos foram capazes de detectar e mensurar com eficiência os isótipos de Acs contra o VDN em soros sanguíneos de galinhas, 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 de HI.

6.4 Pode-se inferir que os testes ELISAI-NPr-IgA / IgM / IgG tem potencial de serem utilizados de forma mais vantajosa para o sorodiagnóstico ou para o monitoramento da infecção / vacinação com o VDN nos plantéis avícolas, considerando sua elevada especificidade e sensibilidade, bem como a possibilidade de avaliar, de forma mais rápida e prática, um maior número de amostras, do que o teste de HI. No caso específico da avaliação das respostas imunes humorais locais, os ensaios de ELISAI-NPr-IgA / IgM / IgG - LÁGRIMA foram capazes de detectar e mensurar com eficiência os diferentes isótipos de Acs contra o VDN presentes na secreção lacrimal.

7. REFERÊNCIAS¹

ADAIR, B. M.; MCNULTY, M. S.; TODD, D.; CONNOR, T. J.; BURNS, K. Quantitative estimation of Newcastle disease virus antibody levels in chickens and turkeys by ELISA. **Avian Pathology**, Huntingdon, v. 18, n. 1, p. 175-92, 1989.

AHMAD, D. S.; BASSIRI, M.; BANERJEE, A. K.; YILMA, T. 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.; ALI, A. M.; TAN W. S.; SALLEH, H. M.; ESHAGHI M.;YUSOFF, K. Localization of the antigenic sites of Newcastle disease virus nucleocapsid using a panel of monoclonal antibodies. **Research in Veterinary Science**, London, v. 86, n. 1, p. 174-182, 2009.

ALDOUS, E. W.; ALEXANDER, D. J. Technical Review: Detection and differentiation of Newcastle disease virus (avian paramyxovirus type 1). **Avian Pathology**, London, v. 30, n. 2, p. 117-128, 2001.

ALEXANDER, D. J.; PARSONS, G; MARSHALL, R. Infections of fowls with Newcastle Disease Virus by food contaminated with pigeons faeces. **The Veterinary Record**. Huntingdon, v. 115,n. 23, p. 601-602, 1984.

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

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**. 9. ed. Ames: Iowa State University Press, 1991. p. 496-519.

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: CALNEK, B. W. (Ed.). **Diseases of Poultry**. 10. ed. Ames: Iowa State University Press, 1997. p. 541-569.

¹ABNT- NBR 6023/2002.

ALEXANDER, D. J.; BELL, J. G.; ALDERS, R. G. **Technology Review: Newcastle Disease**. Roma: FAO, 2004. p.161.

ALEXANDER, D. J.; SENNE D. A. Newcastle disease, other avian paramyxoviruses, and pneumovirus infections. In: SAIF Y. M.; FADLY A. M.; GLISSON J. R.; MCDOUGALD L. R.; NOLAN L. K.; SWAYNE D. E., (Eds.). **Diseases of Poultry**. Ames: Iowa State University Press, USA, 2008a. p. 75-116.

ALEXANDER, D. J.; SENNE, D. A. Newcastle Disease and Other Avian Paramyxoviruses. In: DUFOUR-ZAVALA, L.; SWAYNE, D. E.; GLISSON, J. R.; JACKWOOD, M. W.; PEARSON, J. E.; REED, W. M; WOOLCOCK, P. R. A. (Eds.). **Laboratory manual for the isolation, identification and characterization of avian pathogens**. Athens: American Association of Avian Pathologists, 2008b. p. 135-141.

ALEXANDER, D. J. Doença de Newcastle. In REVOLLEDO, L.; FERREIRA, A. J. P. (Orgs). **Patologia Aviária**. São Paulo: Editora Manole Ltda., 2009. p. 219-228.

AL-GARIB, S. O.; GIELKENS, A. L.; GRUYS, D. E.; HARTOG, L.; KOCH, G. Immunoglobulin Class distribution of systemic and mucosal antibody responses to Newcastle Disease in chickens. **Avian Diseases**, Kennett Square, v. 47, n. 1, p. 32-40, 2003.

ARAÚJO, F. A. A.; VIANNA, R. S. T.; WADA, M. Y.; SILVA, E. V.; DORETTO JÚNIOR, L.; CAVALCANTE, G. C. CAVALCANTE, G. C; MAGALHÃES, V. S; GOMES, J. L; DE QUEIROZ, P. V. S; DE LARRAZÁBAL, M. E; MARTINS, L. C; RODRIGUES, S. G; VASCONCELOS, P. F. C. Inquérito sorológico em aves migratórias e residentes de Galinhos/Rn para detecção do vírus da Febre do Nilo Ocidental e outros vírus. **Boletim Eletrônico Epidemiológico** 2004. Disponível em: <http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/periodicos/boletim_eletronico_epi_ano04_n02.pdf>. Acesso em dezembro de 2014.

BACK, A. **Manual de doenças das aves**. 2. ed. Cascavel: Integração, 2004. p. 222.

BEARD, C. W. Velogenic Newcastle disease. **USDA, ARS, Southeast Poultry Research Laboratory**. Athens, GA. 2008. Disponível em <<http://www.vet.uga.edu/VPPgraybook02/fod/vnd.php>>. Acesso em maio de 2010.

BEARD, C. W.; HANSON, R. P. Newcastle disease. In: HOTSTAD, M.S.; BARNES H.J.; CALNEK B.W.; REID W.M; YODER H.W. (ed.), **Disease of Poultry**, 8. ed. Ames: Iowa State University Press, Ames, p. 452-470, 1984.

BOURSNELL, M. E. G.; GREEN, P. F.; CAMPBELL, J. I.; DEUTER, A.; PETERS, R. W.; TOMLEY, F. M.; SAMSON, A. C.; CHAMBERS, P.; EMMERSON, P. T.; BINNS, M. M. Insertion of de fusion gene from NDV into a non-essential region in the terminal repeats of fowlpox virus and demonstration of protective immunity induced by the recombinant. **The Journal of General Virology**, London, v. 71, n. 3, 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. **Analytical Biochemistry**, Orlando, v. 72, n. 1-2, 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 2014.

BRASIL. Ministério da Agricultura e do Abastecimento - MAPA. **Programa Nacional de Sanidade Avícola.** Plano de Contingência para Influenza Aviária e Doença de Newcastle. Versão 1.4. Brasília, 59 p., 2013.

BRETANO, L.; SILVA, B. G.; SAYD, S.; FLORES, S. W. Anticorpos para o vírus da anemia das galinhas em matrizes de corte no Brasil. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, Campinas, 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 Diseases**, Kennett Square, v. 34, n. 3, 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. **Journal Wildlife Disease**, Lawrence, v. 44, n. 3, p. 772-776, 2008.

CHANG, P. W. Newcastle disease. In: Beran, G. W. (Ed.). **CRC Handbook Series in Zoonoses**: Section B, Viral Zoonoses, Volume II. Florida: CRC Press., 1981. p. 261-274.

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 Pathology**, Huntingdon v. 32, n. 5, p. 519-526, 2003.

CHIMENO, Z. S.; GÓMEZ, E.; CARRILLO, E.; BERINSTEIN, A. Locally produced mucosal Ig G in chickens immunized with conventional vaccines for Newcastle disease. **Brazilian Journal of Medical and Biology Research**, São Paulo, v. 41, n. 4, p. 318-323, 2008.

CLAVIJO, A.; ROBINSON, Y.; BOOTH, T.; MUNROE, F. Velogenic Newcastle disease in imported caged birds. **Canadian Veterinary Journal**, Ottawa. v. 41, n. 5, p.404-406, 2000.

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 Pathology**, Huntingdon, v. 31, n. 5, p. 493-499, 2002.

CVELIC-CABRILO, V.; MAZIJA, H.; BINDIN, Z.; RAGLAND, W. L. Correlation of haemagglutination inhibition and enzyme-linked immunosorbent assays for antibodies to Newcastle disease virus. **Avian Pathology**, Huntingdon, v. 21, n.3, p. 509-512, 1992.

CZIFRA, G.; NILSSON, M.; ALEXANDER, D. J.; MANVELL, R.; KECSKEMETI, S.; ENGSTROM, B. E. Detection of PMV-1 specific antibodies with a monoclonal antibody blocking enzyme-linked immunosorbent assay. **Avian Pathology**, Huntingdon, v. 25, n. 4, p. 691-703, 1996.

CZIFRA, G.; MESZAROS, J.; HORVATH, E.; MOVING, V.; ENGSTROM, B. E. Detection of NDV-specific antibodies and the level of protection provided by a single vaccination in young chickens. **Avian Pathology**. Huntingdon, v. 27, n. 6, p. 526-565, 1998.

DOMINGO, E. Quasispecies Theory in Virology. **Journal of Virology**, Washington, v. 76, n. 1, p. 463-465, 2002.

ERRINGTON, W.; STEWARD, M.; EMMERSON, P. T. A diagnostic immunoassay for Newcastle disease virus based on the nucleocapsid protein expressed by a recombinant baculovirus. **Journal of Virology Methods**, Amsterdam, v. 55, n. 3, p. 357-365, 1995.

FRANZO, V. S.; GAMA, N. M. S. Q.; ARTONI, S. M. B.; SILVA, P. L.; AMOROSO; PAULILLO, A. C. Importância dos patos (*Anas platyrinchus*) na epidemiologia experimental da doença de Newcastle. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**- v. 6, Santos: FACTA , 2004. p. 190.

HECKERT, R. A.; RIVA, J.; COOK, S.; MCMILLEN, J.; SCHWARTZ, R. D. Onset of protective immunity in chicks after vaccination with a recombinant herpesvirus of turkeys vaccine expressing Newcastle Disease Virus fusion and hemagglutinin-neuraminidase antigens. **Avian Disease**, Kennett Square, v. 40, n. 4, p. 770-777, 1995.

GIBERTONI, A. M.; MONTASSIER M. F.; SENA, J. A.; GIVISIEZ, P. E.; FURUYAMA, C. R.; MONTASSIER, H. J. Development and application of a *Saccharomyces cerevisiae*-expressed nucleocapsid protein-based enzyme-linked immunosorbent assay for detection of antibodies against infectious bronchitis virus. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 43, n. 4, p. 1982-1984, 2005.

GOEBEL S. J.; TAYLOR, J.; BARR, B. C.; KIEHN, T. E.; CASTRO-MALASPINA, H. R.; HEDVAT, C. V.; RUSH-WILSON, K. A.; KELLY, C. D.; DAVIS, S. W.; SAMSONOFF, W. A.; HURST, K. R.; BEHR, M. J.; MASTERS, P. S. Isolation of avian paramyxovirus 1 from a patient with a lethal case of pneumonia. **Journal of Virology**, Washington, v. 81, n. 22, p. 12709–12711, 2007.

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 Pathology**, Huntingdon, v. 29, n. 2, 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. **Journal of Immunology Methods**, Amsterdam, v.185, n.1, p.123-132, 1995.

HAUSLAIGNER, R.; SONNENBURG J.; KOTHLOW S.; KASPERS B.; STAUBACH C.; GRUND C. 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 Pathology**, Huntingdon, v. 32, n. 2, p. 89-95, 2009.

HERNÁNDEZ, M. S.; MONTOYA, N. H.; ARMAS, C. D.; RODRIGUES, J. A.; PÉREZ, A. D. Pesquisa serológica sobre el virus de la enfermedad de Newcastle em obreros avícolas y um grupo control. **Revista Cubana de Higiene y Epidemiología**, Ciudad de La Habana, v. 25, n. 1, p. 77-84, 1987.

HOCHULI, E.; PIESECKI, S. Interaction of hexahistidine fusion proteins with nitrilotriacetic acid-chelated Ni^{2+} ions. **Methods**, San Diego, v. 4, n. 1, p. 68-72, 1992.

HUANG, Z.; PANDA, A.; ELANKUMARAN, S.; GOVINDARAJAN, D.; ROCKEMANN, D. D.; SAMAL, S. K. The hemagglutinin-neuraminidase protein of Newcastle disease virus determines tropism and virulence. **Journal of Virology**. Amsterdam, 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. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 30, n. 11, p. 2874-2880, 1992.

JORGE, M. A.; MARTINS, N. R. S.; MORAIS, J. S.; GRONDONA, K. E. B.; RESENDE, J. S.; NUNES, J. E. S.; VASCONCELOS, A. C.; GUIMARÃES, E. B. Reação respiratória forte não é indicação de melhor resposta imune na vacinação contra a Doença de Newcastle. **Revista 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: Kluwer Academic Publishers, 1988. p.197-256.

KAMATA, H.; OHKUBO, S.; SUGIYAMA, M.; MATSUURA, Y.; KAMATA, Y.; TSUKIYAMA-KOHARA, K.; IMAOKA, K.; KAI, C.; YOSHIKAWA, Y.; YAMANOUCHI, K. Expression in baculovirus expression system of the nucleocapsid gene of rinderpest virus. **Journal of Virological Methods**, Amsterdam, v. 43, n. 2, p. 1599-1666, 1993.

KANT, A.; KOCH, G.; VAN ROOZELAAR, D. J.; BALK, F.; HUURNE, A. T. Differentiation of virulent and non-virulent strains of Newcastle disease virus within 24 hours by polymerase chain reaction. **Avian Pathology**, Huntingdon, v. 26, n. 4, p. 837-849, 1997.

KIM, H.; PARK, K.; PARK, C.; CHO, H.; YANG, H.; HAHN, T. Production of recombinant nucleocapsid protein of Newcastle disease virus in *Escherichia coli* for a diagnostic ELISA. **Korean Journal of Veterinary Research**, Seoul, v. 49, n. 1, p. 39-44, 2009.

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. **Journal of Microbiology**, Korea, v. 39, n. 4, p. 293-299, 2001.

KOCH G.; CZIFRA G.; ENGSTRÖM B E. Detection of Newcastle disease virus-specific antibodies in ostrich sera by three serological methods. **The Veterinary Record**, Huntingdon, v.4, n. 1, p.10–12, 1998.

LAMB, R. A.; LOLAKOFSKY, D. Paramyxividae: the viroses and their replication. In: FIELDS, B. N.; KNIPE, D. M.; HOWLEY, P. M. (Ed.). **Fundamental virology**. Philadelphia: Lipincott-Raven, 1996. p. 1177-1204.

LAMB, R.; PARKS, G. Paramyxoviridae: the viruses and their replication. In: KNIPE, D. M.; HOWLEY, P. M.; GRIFFIN, D. E.; LAMB, R. A.; MARTIN, M. A.; ROIZMAN, B.; STRAUS, S. E. (Eds.). **Fields virology**. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins, 2007. p. 1449-1496.

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. p. 79.

LANCELLOTTI, M.; MONTASSIER, M. F. S.; FERNANDO, F. S.; SILVA, K. R.; OKINO, C. H.; SANTOS, I. L.; SANTOS, R. M.; BORZI, M. M.; ALESSI, A. C.; PEREIRA, G. T.; MONTASSIER, H. J. Relationship between mucosal antibodies and immunity against avian infectious bronchitis virus. **International Journal of Poultry Science**, Faisalabad, v.13, n. 3, p. 138-144, 2014.

LANCER, J.A, HOWARD, C.R.The polypeptides of infectious Bronchitis Virus (IBV-41 strain). **The Journal of General Virology**, London, 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*. **The Journal of General Virology**, London, v. 80, n. 1, p. 131-139, 1999.

LIMA, F. S.; SANTIN, E.; PAULILLO, A. C.; DORETTO JÚNIOR, L. Evaluation of different programs of Newcastle disease vaccination in japanese quail (*Coturnix coturnix japonica*). **International Journal of Poultry Science**, Faisalabad, v. 3, n. 5, p. 354-356, 2004a.

LIMA, F. S.; SANTIN, E.; PAULILLO, A. C.; DORETTO JÚNIOR, L. Japanese quail (*Coturnix coturnix japonica*) as Newcastle disease carrier. **International Journal of Poultry Science**, Faisalabad, v. 3, n. 7, p. 483-484, 2004b.

LIMA, F. S. **Estudo de parâmetros clínicos, epidemiológicos, imunitários e patológicos da vacinação contra a moléstia de Newcastle em galinhas d'angola industriais para corte (*Numida meleagris galeata*)**. 2005. 64f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2005.

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. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 25, n. 9, p. 1653-1658, 1987.

LOA, C. C.; LIN, T. L.; WU, C. C.; BRYAN, T. A.; HOOPER, T.; SCHRADER, D. Expression and purification of turkey coronavirus nucleocapsid protein in *Escherichia coli*. **Journal of Virological Methods**, Amsterdam, v. 116, n. 2, p. 161-167, 2004.

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. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 66, n. 3, p. 209-222, 1998.

MALAVAZZI, G. **Avicultura: Manual Prático**. São Paulo: Nobel S/A, 1999. p.197.

MAST, J.; DEMEESTERE, L. Electron tomography of negatively stained complex viruses: application in their diagnosis. **Diagnostic Pathology**, London, v. 4, n. 5, p. 1-7, 2009.

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**, London, v. 17, n. 2, p. 509-513, 1988.

MEBATSION, T.; KOOLEN, M. J.; DE VAAN, L. T.; DE HAAS, N.; BRABER, M.; RÖMER-OBERDÖRFER, A.; VAN DEN ELZEN, P.; VAN DER MAREL, P. Newcastle Disease Virus (NDV) Marker Vaccine: an immunodominant epitope on the nucleoprotein gene of NDB can be deleted or replaced by a foreign epitope. **Journal of Virology**, Washington, 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**, New York, v. 109, n. 1, 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 Diseases**, Kennett Square, v. 27, n. 4, p.1112-1125, 1983.

MILLER, P. J.; AFONSO, C. L.; SPACKMAN, E.; SCOTT, M. A.; PEDERSEN, J. C.; SENNE, D. A.; BROWN, J. D.; FULLER, C. M.; UHART, M. M.; KARESH, W. B.; BROWN, I. H.; ALEXANDER, D. J.; SWAYNE, D. E. Evidence for a New Avian Paramyxovirus Serotype-10 Detected in Rockhopper Penguins from the Falkland Islands. **Journal of Virology**, Washington, v. 84, n. 21, p. 11496-11504, 2010.

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

NISHIZAWA, M.; PAULILLO, A. C. I.; NAKAGHI, L. S. O. I.; NUNES, A. D. I.; CAMPIONI, J. M. I.; DORETTO JÚNIOR, L. I. V. Newcastle disease in pekin ducks response to experimental vaccination and challenge. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, Campinas, v. 9, n. 2, p.123-125, 2007.

NUNES, J. E. S.; VASCONCELOS, A. C.; JORGE, M. A.; GUIMARÃES, E. B.; PAIXÃO, T. A.; MARTINS, N. R. S.; RESENDE, J. S. 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. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 54, n. 4, p. 335-339, 2002.

OFFICE INTERNATIONAL EPIZOOTIES DISEASE INFORMATION (OIE). Newcastle Disease, capítulo 2.3.14. In: OIE (Ed.). **Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals**, 7. ed. Paris: OIE, 2012. p. 555-573.

OGAWA, R.; YANAGIDA, N.; SAEKI, S.; SAITO, S.; OHKAWA, S.; GOTOH, H.; KODAMA, K.; KAMOGAWA, K.; SAWAGUCHI, K.; IRITANI, Y. Recombinant fowlpox viruses inducing protective immunity against Newcastle disease and fowlpox viruses. **Vaccine**, Amsterdam, v. 8, n. 5, p. 486-490, 1999.

OLIVEIRA, E. S.; SILVA, K. S.; FERNANDO, F. S.; GONÇALVES, M. C. M.; FERNANDES, C. C.; BORZI, M. M.; SANTOS, R. M.; TAMANINI, M. L. F.; MONTASSIER, M. F. S.; MONTASSIER, H. J. A liquid-phase-blocking concanavalin A enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of antibodies against Newcastle disease virus in serum of free-ranging pigeons. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**. Thousand Oaks, v. 25, n. 6, p. 720-726, 2013.

OLIVEIRA JUNIOR, J. G.; PORTZI, C.; LOUREIRO, B. O.; SCHIAVO, P. A.; FEDULLO, L. P. L.; MAZURIV, C.; ANDRADE, C. M. Vírus da doença de Newcastle em aves não vacinadas no Estado do Rio de Janeiro. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 33, n. 2, p. 381-383, 2003.

OLIVEIRA JUNIOR, J. G.; SCHIAVO, P. A.; DORETTO JÚNIOR; L.; ORSI, M. A.; MAZURIV, C.; ANDRADE, C. M. Isolamento e caracterização biológica da amostra JAP99 do vírus da doença de Newcastle isolada de patos domésticos (*Neta sp*) no Rio de Janeiro. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 35, n. 4, p. 948-951, 2005.

ORSI, M. A. L.; DORETTO JR, L.; CAMILLO, S. C. A. I.; REISCHAK, D. I.; RIBEIRO, S. A. M. I.; RAMAZZOTTI, A. I.; MENDONÇA, A. O. I.; SPILKI, F. R.; BUZINARO, M. G. V.; FERREIRA, H. L.; ARNS, C. Prevalence of NDV in broiler chickens (*Gallus gallus*) in Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 41, n. 2, p. 349-357, 2010.

PANYASING Y.; GOODELL C. K.; GIMÉNEZ-LIROLAA L.; KITTAWORNAT A.; WANGA C.; SCHWARTZ A. K. J.; ZIMMERMAN J. J.; Kinetics of influenza A virus nucleoprotein antibody (IgM, IgA, and IgG) in serum and oral fluid specimens from pigs infected under experimental conditions. **Vaccine**, Amsterdam, v. 31, n. 52, p. 6210-6215, 2013.

PARRY, S. H.; AITKEN I. D. Immunoglobulin A in the respiratory tract of the chicken following exposure to Newcastle disease virus. **The Veterinary Record**, London, v. 94, n. 9, p. 258-260, 1973.

PARRY, S. H.; AITKEN I. D. Local immunity in the respiratory tract of the chicken. II. The secretory immune response to Newcastle disease virus and the role of IgA. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 2, n. 2, p. 143-165, 1977.

PAULILLO, A. C.; SILVA, G. S.; DORETTO JUNIOR, L.; MEIRELES, M. V.; KRONKA, S. N.; ARIKI, J.; SAKOMURA, N. K.; RIBEIRO, R. C. Estudos zootécnico e imunológico de aves de corte submetidas a diferentes programas de vacinação contra a doença de Newcastle. In: REUNIÃO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA 33, 1996, Fortaleza, **Anais...** Fortaleza: SBZ, 1996. p. 388-390.

PAULILLO, A. C.; SILVA, G. S.; MORO, M. E. G.; DORETTO JÚNIOR, L.; MEIRELES, M. V.; SHOCKEN-ITURRINO, R. P.; SOUSA, R. L. M. Importância de la vacunación experimental en perdices (*Rhynchotus rufescens*) contra la enfermedad de Newcastle y investigación del estado de portador del virus. In: CONGRESO LATINOAMERICANO DE AVICULTURA, 16. Lima. **Memorias**. 1999. p. 291-293.

PAULILLO, A. C.; DORETTO JÚNIOR, L. Doença de Newcastle. In: BERCHIERI JÚNIOR, A.; MACARI, M.(Ed.) **Doenças das aves**. Campinas: Fundação APINCO de Ciência e Tecnologia Avícolas, p. 267-281, 2009.

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

PEETERS, B. P. H.; LEEUW. O. S.; VERSTEGEN, I.; KOCH, G.; GIELKENS, A. L. J. Generation of a recombinant chimeric Newcastle disease virus vaccine that allows serological differentiation between vaccinated and infected animals. **Vaccine**, v. 19, n. 27, p. 1616-1627, 2001.

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

PERALES, C.; MARTÍN, V.; RUIZ-JARABO, C. M.; DOMINGO, E. Monitoring sequence space as test for the target of selection viruses. **Journal of Molecular Biology**, Amsterdam, v. 345, n. 3, p. 451-459, 2005.

PHAM, H. M.; CHANG, K. S.; MASE, M.; OHASHI, K.; ONUMA, M. Molecular characterization of the nucleocapsid protein gene of Newcastle disease virus strain in Japan and development of a restriction enzyme-based rapid identifying method. **Archive of Virology**, Austria, v. 149, n. 8, p. 1559-1569, 2004.

PHAM, H. M.; NAKAJIMA, C.; OHASHI, K.; ONUMA, M. Loop-mediated isothermal amplification for rapid detection of Newcastle disease virus. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 43, n. 4, p. 1646-1650, 2005.

PRABAKARAN, M.; HO, H. T.; PRABHU, N.; VELUMANI, S.; SZYPORTA, M.; HE, F.; CHAN, K. P.; CHEN, L. M.; MATSUOKA, Y.; DONIS, R. O.; KWANG, J. Development of epitope-clocking ELISA for universal detection of antibodies to human H5N1 influenza viruses. **Plos One**, San Francisco, v. 4, n. 2, p. e4566, 2009.

REID-SANDEN, F. L.; SUMNER, J. W.; SMITH, J. S.; FEKADU, M.; SHADDOCK, J. H. BELLINI, W. J. Rabies diagnostic reagentes prepared from a rabies N gene recombinant expressed in baculovirus (published erratum appears in) **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 28, n. 5, p. 858-863, 1990.

RICHTZENHAIN L. J.; PAULILLO A. C.; PINTO A. A.; KRONCA S. N. Relation between the hemagglutination inhibition test and indirect ELISA in serologic monitoring of laying Hens submitted to different systems of vaccination against Newcastle disease. **Revista de Microbiologia**, Sao Paulo, v. 24, n. 3, p.187-91, 1993.

RIVETZ, B.; WEISMAN, Y.; RITTERBAND, M.; FISH, F.; HERZBERG, M. Evaluation of a novel rapid kit for the visual detection of Newcastle disease virus antibodies. **Avian Diseases**, Kennet Square, v. 29, n. 4, 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. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 37, n. 4, p. 937-943, 1999.

RUSSELL, P. H. Newcastle disease virus: replication in the harderian gland stimulated lacrimal IgA: the yolk sac provides early lacrimal IgG. **Veterinary immunology and immunopathology**, Amsterdam, v. 37, n.2, p. 151-163, 1993.

RUSSELL, P. H. Newcastle disease virus vaccines: differences between Line C and Line 151 chickens with respect to virus replication and IgA responses in gut and Harderian gland. **Veterinary immunology and immunopathology**, Amsterdam, v. 42, n.2, p. 357-167, 1994.

RUSSELL, P. H; G. O. EZEIFEKA. The Hitchner B 1 strain of Newcastle disease virus induces high levels of IgA, IgG and IgM in newly hatched chicks. **Vaccine** v.13, n. , p. 61-66, 1995.

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

SEAL, B.; KING, D. J.; LOCKE, D. P.; SENNE, D. A.; JACKWOOD, M. W. Phylogenic relationships among highly virulent Newcastle disease virus isolates obtained from exotic birds and poultry from 1989 to 1996. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington v. 36, n. 4, p.1141-5, 1998.

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

SILVA, J. S. A.; MOTA, R. A.; VILELA, S. M. O.; DORETTO JÚNIOR, L. I. V.; PINHEIRO JÚNIOR, J. W. V.; SILVA, L. B. G. Newcastle disease virus infection in sparrows (*Passer domesticus*, Linneaus, 1758) captured in poultry farms of agreste region of the State of Pernambuco. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, Campinas, v. 8, n. 2, p. 125-129, 2006.

SILVA, K. R.; GONÇALVES, M. C. M.; MONTASSIER, M. F. S.; FERNANDES, C. C.; LIMA, P. J. H. L. P.; GHELLER, L. A.; MONTASSIER, H. J. Estudo comparativo entre os testes de HI e o ELISA-lectina para a detecção de anticorpos contra o VDN em frangos de corte vacinados. **Biológico**, São Paulo, v. 71, n. 2, p.88, 2009,

SILVA, K. R.; GONÇALVES M. C. M; OLIVEIRA E. S; FERNANDO F. S.; MONTASSIER M. F. S; FERNANDES C. C; TAMANINI M. L. F; BORZI M. M; SANTOS R. M.; MENDONÇA A. O.; REISCHAK D.; PAULILLO A. C.; MONTASSIER H. J. Cloning and expression of nucleoprotein gene (NP) of *Newcastle Disease Virus* in *Escherichia coli* for application in immunodiagnosis. **International Journal of Poultry Science**, Faisalabad, v.13, n. 8, p. 473-479, 2014.

SINGH, A.; YADAV, D.; RAI, K. M.; SRIVASTAVA, M.; VERMA, P. C.; SINGH, P. K.; TULI, R. Enhanced expression of rabies virus surface G-protein in *Escherichia coli* using SUMO fusion. **The Protein Journal**, Dordrecht, v. 31, n. 1, p. 68-74, 2012.

SNOECK, V.; PETERS, I.; COX, E. "The IgA system: a comparison of structure and function in different species". **Veterinary Research**, London, v. 37, n. 3, p. 455–67, 2006.

SNOECK, C. J.; DUCATEZ, M. F.; OWOADE, A. A.; FALEKE, O. O.; ALKALI, B. R.; TAHITA, M. C.; TARNAGDA, Z.; OUEDRAOGO, J. B.; MAIKANO, I.; MBAH, P. O.; KREMER, J. R.; MULLER, C. P. Newcastle disease virus in West Africa: new virulent strain Identified in non-commercial farms. **Archives of Virology**, Wien, v. 154, n. 1, p. 47-54, 2009.

SOUSA, R. L. M.; CARDOSO, T. C.; PAULLILO, A. C.; MONTASSIER, H. J.; PINTO, A. A. Comparison between the Indirect ELISA, Sandwich ELISA and Hemagglutination Inhibition Test for the detection of antibodies against Newcastle disease virus. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, Campinas, v. 1, n. 1, 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. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, Washington, v.7, n.6, p.940 - 944, 2000.

SWAYNE, D. E.; KING, D. J. Avian influenza and Newcastle disease. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Schaumburg, v. 222, n. 11, p.1534-1540, 2003.

SPANOGHE, L.; PEETERS, J. E; COTLEAR, J. C; DEVOS, A; VIAENE, N. Kinetics of serum and local HI antibodies in chicks following vaccination and experimental infection with Newcastle disease virus and their relation with immunity. **Avian Pathology**, Huntingdon, v.6, n.2, p. 101-109, 1977.

TAYLOR, R. Interpretation of the correlation coefficient: A basic review. **Journal of Diagnostic Medical Sonography**, Philadelphia, v. 6, n. 1, p.35-39, 1990.

TAYLOR, J.; EDBAUER, C.; REY-SENELONGE, A.; BOUQUET, J. F.; NORTON, E.; GOEBEL, S.; DESMETTRE, P.; PAOLETTI E. Newcastle disease virus fusion protein expressed in a fowlpox virus recombinant confers protection in chickens. **Journal of Virology**, Washington, v. 64, n. 4, p.1441-1450, 1990.

THAYER, S. G.; VILLEGAS, P.; FLETCHER, O. J. Comparasion of two commercial Enzyme-Likeed Assays and conventional methods for avian serology. **Avian Disease**, Kennett Square, v. 31, n. 1, p. 120-124, 1987.

TOWBIN, H. T.; STAEHELIN, T.; GORDON, J. Eletrophoretic transfer of protein from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Produce and some applications. **PNAS**, Washington, v. 76, n. 9, p. 4350-4354, 1979.

YUSOFF, K.; TAN, W. S. Newcastle disease virus: macromolecules and opportunities. **Avian Pathology**, Huntingdon, v. 30, n. 5, p. 439-455, 2001.

VERNOERD, D. J. Ostrich diseases. **Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics)**, Paris, v. 19, n. 2, p. 638-661, 2000.

VIANNA, J. S. M.; MAZUR, C.; PORTZ, C.; FERREIRA, I. I.; ALMEIDA, C. A. S.; GALLER, R. Identificação e caracterização biomolecular do vírus da doença de Newcastle pela técnica de RT-PCR. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, Rio de Janeiro, v. 22, n. 4, p. 160-163, 2000.

VILLEGAS, P.; AVELLANEDA, G. Interpretacion de resultados serológicos em bronquitis infecciosa. **Avicultura Profesional**, v.10, n.1, p. 21-23,1992.

WALSH, G. **Biopharmaceuticals: biochemistry and biotechnology**. 2. ed. London: Wiley, 1998. p. 94.

WEICKERT, M. J.; DOHERTY, D. H.; BEST, E. A.; OLINS, P. O. Optimization of heterologous protein production in *Escherichia coli*. **Current Opinion in Biotechnology**, London, v. 7, n. 5, p. 494-499, 1996.

WHITE, E. G.; JORDAN, F. T. W. **Newcastle Disease: Veterinary Preventive Medicine**. Baillaire: Tindall and Cox Ltd, London, 1963. p. 128-137.

WILSON, R. A.; PERROTTA JUNIOR, C.; FREY, B.; ECKROADE, R. J. An enzyme-linked immunosorbent assay that measures protective antibody levels to Newcastle disease virus in chickens. **Avian Diseases**, Kennett Square, v. 28, n. 4, p. 1079-1085, 1984.

WITT JJ, DAVELAAR FG, BRAUNIUS WW. Comparison of the enzyme-linked immunosorbent assay, the hemagglutination inhibition test and the agar gel precipitation test for the detection of antibodies against infectious bronchitis and Newcastle disease in commercial broilers. **Avian Pathology**, Huntingdon, v. 21, n. 4, p.651-58, 1992.

WOOF J. M; KERR M. A. The function of immunoglobulin A in immunity. **The Journal of Pathology**, London, v. 208, n. 2, p. 270-82, 2006.

ZUO, X.; MATTERN, M. R.; TAN, R.; LI, S.; HALL, J.; STERNER, D. E.; SHOO, J.; TRAN, H.; LIM, P.; SARAFIANOS, S. G.; KAZI, L.; NAVAS-MARTIN, S.; WEISS, S. R.; BUTT, T. R. Expression and purification of SARS coronavirus proteins using SUMO-fusions. **Protein Expression and Purification**, Amsterdam, v. 42, n. 1, p. 100-110, 2005.