**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP**

**CÂMPUS DE JABOTICABAL**

# DESENVOLVIMENTO E APLICAÇÃO DE MÉTODOS SOROLÓGICOS E MOLECULARES PARA O DIAGNÓSTICO DA DOENÇA DE NEWCASTLE EM POMBOS COMUNS (*Columba livia*)

**Elisabete Schirato de Oliveira**

**Bióloga**

**2013**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP**

**CÂMPUS DE JABOTICABAL**

# DESENVOLVIMENTO E APLICAÇÃO DE MÉTODOS SOROLÓGICOS E MOLECULARES PARA O DIAGNÓSTICO DA DOENÇA DE NEWCASTLE EM POMBOS COMUNS (*Columba livia*)

**Elisabete Schirato de Oliveira**

**Orientador: Hélio José Montassier**

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP, Campus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Microbiologia Agropecuária.

**2013**

Oliveira, Elisabete Schirato de
O48d Desenvolvimento e aplicação de métodos sorológicos e moleculares para o diagnóstico da doença de Newcastle em pombos comuns (*Columba livia*) / Elisabete Schirato de Oliveira. – – Jaboticabal, 2013
ix, 76 p. : il. ; 28 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2013
Orientador: Hélio José Montassier
Banca examinadora: Antonio Carlos Paulillo, Ricardo Luiz Moro de Sousa
Bibliografia

1. Pombos. 2. ELISA. 3. Imunodiagnóstico. 4. Lectinas. 5. RT-PCR. 6. Vírus da doença de Newcastle. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 616.988.73:636.6

unesp UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CAMPUS DE JABOTICABAL
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS DE JABOTICABAL

## CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

**TÍTULO:** DESENVOLVIMENTO E APLICAÇÃO DE MÉTODOS SOROLÓGICOS E MOLECULARES PARA O DIAGNÓSTICO DA DOENÇA DE NEWCASTLE EM POMBOS COMUNS (*Columba livia*)

**AUTORA: ELISABETE SCHIRATO DE OLIVEIRA**
**ORIENTADOR: Prof. Dr. HELIO JOSE MONTASSIER**

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de MESTRE EM MICROBIOLOGIA AGROPECUÁRIA , pela Comissão Examinadora:

Prof. Dr. HELIO JOSE MONTASSIER
Departamento de Patologia Veterinária / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal

Prof. Dr. ANTONIO CARLOS PAULILLO
Departamento de Patologia Veterinária / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal

Prof. Dr. RICARDO LUIZ MORO DE SOUSA
Departamento de Medicina Veterinária / Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos / Universidade de São Paulo / Pirassununga/SP

Data da realização: 27 de fevereiro de 2013.

## DADOS CURRICULARES DA AUTORA

**ELISABETE SCHIRATO DE OLIVEIRA –** nascida em Franca – SP, no dia 20 de junho de 1985, graduou-se em Ciências Biológicas pela Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista (FCAV – UNESP), Campus de Jaboticabal, em dezembro de 2010. Entre setembro de 2008 e dezembro de 2008 realizou treinamento em iniciação científica no Laboratório de Microbiologia do Departamento de Produção Vegetal da FCAV - UNESP, sob orientação do Prof. Dr. Antonio Carlos Monteiro. Entre novembro de 2009 e fevereiro de 2010 realizou treinamento em iniciação científica, na área de Imunologia e Virologia, sob orientação do Prof. Dr. Hélio José Montassier, do Departamento de Patologia Veterinária da FCAV – UNESP. Em 2010, realizou o trabalho de conclusão de curso intitulado "Estudo comparativo entre os testes de Sandwich-ELISA-Concanavalina A (S-ELISA-ConA) e o de Inibição de Hemaglutinação (HI) para a detecção de anticorpos contra o vírus da doença de Newcastle", orientada pelo Prof. Dr. Hélio José Montassier. Email: elisaschirato@yahoo.com.br

“Procure ser uma pessoa de valor, em vez de

procurar ser uma pessoa de sucesso. O sucesso é conseqüência”.

(Albert Einstein)

Dedico este trabalho,

A minha mãe Cida, por ser tão dedicada e amiga, por ser a pessoa que mais me apóia e acredita na minha capacidade, meu agradecimento pelas horas em que ficou ao meu lado não me deixando desistir e me mostrando que sou capaz de chegar onde desejo...

Ao meu irmão Ricardo Schirato a quem considero um segundo pai, sempre me apoiando em todos os momentos, enfim por todos os conselhos e pela confiança em mim depositada...

E à Laura Schirato minha sobrinha...
Um anjinho que Deus colocou em nossas vidas.

Vocês são tudo pra mim! Muito Obrigada por tudo!

## AGRADECIMENTOS

- À **Deus**, por me guiar em todos os momentos da minha vida;
- À **minha mãe Cida** e ao **meu irmão Ricardo Schirato**, que além da minha dedicatória tem minha eterna gratidão;
- Ao **Prof. Dr. Hélio José Montassier**, meu orientador, pela transmissão de inúmeros conhecimentos, pela paciência, pela amizade e pela oportunidade que ele me concedeu de realizar este trabalho, a qual sou muito grata;
- À **Maria de Loudes Feres Tamanini** (famosa "Lurdinha"), técnica do laboratório, pelo auxílio nas técnicas laboratoriais, pelo apoio, pela cumplicidade, pelo incentivo, pela amizade e pelo carinho maternal;
- Aos queridos colegas do laboratório de Imunologia e Virologia: **Ketherson Rodrigues**, **Filipe Santos**, **Camila Cesário**, **Mariana Mello**, **Romeu Santos** e **Maria de Fátima** pela amizade, excelente convívio, ajuda e suporte não somente nesta pesquisa. Em especial à **Mariana Monezi**, uma grande amiga, que sempre me escutou e me apoiou. Muitíssimo obrigada!
- À **Clarissa Araújo** que dividiu comigo as dificuldades para capturar os pombos;
- Aos meus amigos mestrandos **Daniele Belarmino**, **Camila Figueiredo**, **Aylan Kener** e **Juliana Rovieiro**; por estarem presentes dia após dia, compartilhando os sonhos, os medos, as alegrias, os erros e as angustias, durante o curso de mestrado, mas que sempre estiveram ao meu lado me apoiando e me ajudando;

- Aos **funcionários do Departamento de Microbiologia**, pelas orientações e serviços sempre que precisei e por toda a ajuda prestada durante meu estágio;
- À **UNESP – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias**, pela oportunidade oferecida para a realização do curso de Pós-Graduação em Microbiologia Agropecuária;
- À **FortDodge**, pela doação dos ovos SPF;
- Ao **CNPq**, pelo financiamento deste projeto (proc. 578453/2008-8).
- À **CAPES** pela bolsa auxílio concedida;
- À **LANAGRO**, unidade Campinas/SP, pela parceria no desenvolvimento deste projeto;
- Aos **pombos**, que tiveram suas vidas solicitadas para esse projeto;
- Á todos que contribuíram de forma direta ou indireta para a realização deste trabalho...

**MUITO OBRIGADA!!!**

# SUMÁRIO

Página

CEUA-COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS.....xii
LISTA DE QUADROS E TABELAS.....xiii
LISTA DE FIGURAS .....xiv
RESUMO..... .....xvi
ABSTRACT .....xvii
1 INTRODUÇÃO.....1
2 REVISÃO DE LITERATURA.....4
2.1 Aspectos gerais da doença de Newcastle.....4
2.2 Aspectos históricos .....4
2.3 Etiologia, aspectos estruturas e patogenia.....6
2.4 Epidemiologia.....9
2.4.1 Hospedeiros .....9
2.4.2 Transmissão.....10
2.4.3 Disseminação.....11
2.5 Aspectos clínicos e patológicos.....12
2.6 Imunidade na Doença de Newcastle.....14
2.7 Medidas de controle .....15
2.8 Diagnóstico laboratorial.....16
2.8.1 Isolamento e caracterização viral .....16
2.8.2 Técnicas moleculares aplicadas ao diagnóstico da Doença de Newcastle.....16
2.8.3 Técnicas sorológicas aplicadas ao diagnóstico da Doença de Newcastle.....19
3 OBJETIVOS .....23
4 MATERIAL E MÉTODOS.....24
4.1 Amostras de soros e amostras cloacais de pombo (*Columba livia*) .....24
4.2 Amostras de soro positivas e negativas de pombo (*Columba livia*) .....24
4.3 Soros negativos.....24

4.4 Anticorpo detector .....25
4.5 Propagação e Titulação da Infectividade da Estirpe LaSota do VDN.....25
4.6 Análise de proteínas em gel de poliacrilamida na presença de dodecilsulfato de sódio (PAGE-SDS).....26
4.7 “Western-blotting”.....26
4.8 Determinação da diluição ótima do antígeno, do anticorpo de captura e do anticorpo detector para uso no BFL-Con A-ELISA.....27
4.9 Reação de BFL-Con A-ELISA para a detecção de anticorpos anti-VDN.....27
4.10 Cálculo das Porcentagens de Inibição obtidas no BFL-Con A-ELISA para a detecção de anticorpos anti-VDN.....28
4.11 Cálculo do ponto de corte para o BLF-Con A-ELISA .....29
4.12 Padronização e reação de Inibição da Hemaglutinação (HI).....29
4.13 Determinação do ponto de corte para o teste de HI.....30
4.14 Análise estatística .....31
4.15 Oligonucleotídeos iniciadores da RT-PCR e semi-nested-RT-PCR .....32
4.16 Seleção dos oligonucleotídeos para a reação de RT-PCR e semi-nested-RT-PCR para amplificação do gene F.....32
4.17 Extração do RNA viral .....33
4.18 Síntese do cDNA(RT).....34
4.19 Determinação e avaliação da sensibilidade da reação de PCR e semi-nested-PCR para amplificação do gene F.....34
4.20 Avaliação da especificidade da reação de semi-nested-RT-PCR para amplificação do gene F .....34
4.21 Reação em cadeia da polimerase(PCR) para amplificação do gene F.....35
4.22 Reação de semi-nested-RT-PCR para amplificação do gene F.....35
4.23 Análise eletroforética dos produtos amplificados do gene F .....36
4.24 Análise comparativa das técnicas de semi-nested-RT-PCR, HI e BFL-Con A-ELISA para o diagnóstico da infecção do VDN .....36
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....37
5.1 Especificidade do soro de galinha anti-VDN, usado como anticorpo detector no BFL-Con A-ELISA .....37
5.2 Padronização do BFL-Con A-ELISA .....38

5.3 Titulação de soros de pombos positivos e negativos para o VDN.....39
5.4 Determinação do ponto de corte do BFL-Con A-ELISA .....39
5.5 Relações entre os resultados do BFL-Con A-ELISA e do teste de HI para a detecção de anticorpos anti-VDN no soro de pombos .....40
5.6 Avaliação de combinações dos oligonucleotídeos iniciadores da técnica de RT-PCR e semi-Nested-RT-PCR para a detecção do gene F do VDN.....46
5.7 Sensibilidade Analítica da Técnica de semi-nested-RT-PCR para a detecção do VDN.....47
5.8 Especificidade Analítica da Técnica de semi-nested-RT-PCR para a detecção do VDN..... .....50
5.9 Aplicação da Técnica de semi-nested-RT-PCR para a detecção do VDN em amostras de pombos de vida-livre.....51
5.10 Comparação dos resultados obtidos nas técnicas BFL-Con A-ELISA, HI e semi-nested-RT-PCR para o diagnóstico da infecção pelo VDN .....55
6 CONCLUSÕES .....59
7 REFERÊNCIAS.....60

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

## CEUA – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

### CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 021719/11 do trabalho de pesquisa intitulado **"Desenvolvimento e aplicação de métodos sorológicos e moleculares para o diagnóstico da doença de Newcastle em aves silvestres"**, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Helio José Montassier está 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 07 de Outubro de 2011.

Jaboticabal, 11 de Outubro de 2011.

**Prof. Dr. Jeffrey Frederico Lui**
Presidente - CEUA

**Med. Vet. Maria Alice de Campos**
Secretária - CEUA

Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias
Via de Acesso Prof. Paulo Donato Castellane, s/n - CEP 14884-900 - Jaboticabal - SP - Brasil
Tel. 16 3209 2600 - fax 16 3202 4275 - www.fcav.unesp.br

## LISTA DE QUADROS E TABELAS

QUADRO 1 - Descrição dos iniciadores externos e internos utilizados na RT-PCR e na semi-nested-RT-PCR para obtenção de regiões diferentes da proteína F do VDN.....32

TABELA 1 - Comparação dos resultados obtidos nas técnicas de HI e BFL – Con A - ELISA para a detecção do VDN em soros de pombos domésticos e análises de validação do teste .....43

TABELA 2 - Comparação dos resultados obtidos nas técnicas de BFL-Con A-ELISA, HI e semi-nested-RT-PCR para a detecção do VDN em 101 amostras de pombos.....55

TABELA 3 - Sensibilidade relativa e especificidade relativa do teste de semi-nested-RT-PCR comparado com os testes de HI e BFL-Con A-ELISA .....56

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - Membrana de Western com “pool” de soro de galinhas hiperimunizadas com a estirpe La Sota o VDN, para observar a reatividade desses anticorpos policlonais contra os principais antígenos virais. Na canaleta 1,5 µL do Marcador de peso molecular (Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder, Fermentas); na canaleta 2, suspensão de LCA com a estirpe La Sota do VDN concentrada com PEG. HN-Hemaglutinia-Neuraminidase, NP-Nucleoproteína e M-Proteina de Matriz do VDN.....38

FIGURA 2 - Detecção de anticorpos específicos para VDN em pools de soros de pombos imunizados (VDN+) e não-imunizados (VDN-) ensaiados por BFL-ConA-ELISA.....39

FIGURA 3 - Curvas de sensibilidade (Se) e especificidade (Sp) do BFL-ConA-ELISA através da análise TG-ROC. O ponto de intersecção entre as duas curvas indica o ponto de corte para BFL-Con A-ELISA (PI=19,730%), onde Se=Sp=0,95 (linha horizontal tracejada). O intervalo de confiança empregado foi de 95% .. .....40

FIGURA 4 - Análise de regressão linear entre os títulos obtidos nas reações de HI e BFL-ConA-ELISA coma determinação do coeficiente de correlação (*r*) e da equação da reta correspondentes ..... .....41

FIGURA 5 -Resultados da avaliação de combinação de oligonucleotídeos iniciadores na técnica de PCR para amplificação de regiões do gene F do VDN, visualizados em gel de agarose (1% tampãoTE). Canaleta 1, 8,6µL de Marcador molecular 1Kb plus DNA Ladder (INVITROGEN). Canaleta 2, FEP1/FEP2; Canaleta 3, FIP1/FIP2; Canaleta 4, FEP1/FIP2; Canaleta 5, FEP2/FIP1; Canaleta 6, controle negativo da reação.....47

FIGURA 6 -Visualização do eletroforograma em gel de agarose (1% tampão TE), de diferentes diluições da amostra padrão La Sota do VDN para a reação de PCR realizada com os oligonucleotídeos iniciadores FEP 1 e FIP 2. Canaleta 1, 8,6 µL de Marcador molecular 1 Kb plus DNA Ladder (INVITROGEN). Canaletas de 2 a 10, as diluições: 1:1, $10^{-1}$, $10^{-2}$, $10^{-3}$, $10^{-4}$, $10^{-5}$, $10^{-6}$, $10^{-7}$, $10^{-8}$. Canaleta 11, controle negativo da reação.. .....49

FIGURA 7 -Visualização do eletroforograma em gel de agarose (1% tampão TE), de diferentes diluições da amostra padrão La Sota do VDN para a reação de semi-nested-RT-PCR realizada com os oligonucleotideos iniciadores FIP 1 e FIP 2. Canaleta 1, 8,6 µL de Marcador molecular 1 Kb plus DNA Ladder (INVITROGEN). Canaletas de 2 a 14, as diluições: 1:1, $10^{-1}$, $10^{-2}$, $10^{-3}$, $10^{-4}$, $10^{-5}$, $10^{-6}$, $10^{-7}$, $10^{-8}$, $10^{-9}$, $10^{-10}$, $10^{-11}$, $10^{-12}$. Canaletas 15 e 16, controle negativo da reação .....49

FIGURA 8 -Visualização do eletroforograma em gel de agarose (1% tampão TE), do teste de especificidade da técnica de semi-nested-RT-PCR realizada com os oligonucleotideos iniciadores FIP 1 e FIP 2. Canaleta 1, 8,6µL Marcador molecular 1 Kb plus DNA Ladder (INVITROGEN). Canaleta 2, amostra de referência estirpe La Sota do VDN, Canaleta 3, pneumovírus aviário (119/95-BR), Canaleta 4, vírus da bronquite infecciosa (H-120), Canaleta 5, vírus do gumboro (cepaS-706), Canaleta 6, pneumovírus aviário (cepaPL), Canaleta 7 e 8, controle negativo .....51

FIGURA 9 -Visualização do eletroforograma em gel de agarose (1% tampão TE), das amostras positivas para a técnica de semi-nested-PCR. Canaleta 1, 8,6 µL de Marcador molecular 1 Kb plus DNA Ladder (INVITROGEN). Canaletas 2 a 11, amostras positivas de pombos, Canaleta 12 e 13, controles negativos.....52

**DESENVOLVIMENTO E APLICAÇÃO DE MÉTODOS SOROLÓGICOS E MOLECULARES PARA O DIAGNÓSTICO DA DOENÇA DE NEWCASTLE EM POMBOS COMUNS (*Columba livia*)**

**RESUMO –** Existem diversos trabalhos publicados sobre métodos de diagnóstico da Doença de Newcastle (DN) em aves comerciais da espécie *Gallus gallus*. Entretanto, é escassa a literatura sobre o desenvolvimento de técnicas para o diagnóstico laboratorial da infecção pelo vírus da Doença de Newcastle (VDN) em espécies de aves não-galiformes. O presente trabalho foi delineado com o objetivo de desenvolver e aplicar a técnica de bloqueio de fase líquida de ELISA com a concanavalina A (BFL-Con A-ELISA) para a detecção e quantificação de anticorpos contra o VDN em soros de pombos de vida livre e da técnica de Semi-nested-RT-PCR para detecção do vírus da DN (VDN) em suabes cloacais das mesmas aves. Na comparação entre o BFL-Con A-ELISA e o HI para a detecção de anticorpos em 107 amostras de soros de pombos, foram obtidos uma correlação significativa com o teste de HI ($r$ = 0,875), bem como valores elevados de sensibilidade (100%), especificidade (95,8%), acurácia (96,3%) e concordância ($\kappa$ = 0,83). Os resultados obtidos na técnica de semi-nested-RT-PCR mostraram que nove das 101 amostras analisadas foram positivas para o VDN. Na análise comparativa dos resultados da técnica do semi-nested-RT-PCR com os obtidos nas técnicas sorológicas, foram observados índices de especificidade relativa de 93,9% e 96,8% em relação aos métodos de HI e BFL-Con A-ELISA, respectivamente; além de uma máxima sensibilidade relativa (100%), comparativamente a esses testes. Esses dados demonstram que tanto o BFL-Con A-ELISA como o semi-nested-RT-PCR desenvolvidos no presente estudo foram eficientes no diagnóstico da DN, ou detectando anticorpos anti-VDN, ou esse agente viral, respectivamente, e ambas as técnicas apresentaram um grande potencial para serem usadas com vantagens no diagnóstico da infecção pelo VDN em pombos e em outras espécies de aves não-galiformes**.**

**Palavras-chave:** Pombos, ELISA, Imunodiagnóstico, Lectinas, RT-PCR, Vírus da Doença de Newcastle

**DEVELOPMENT AND APPLICATION OF SEROLOGIC AND MOLECULAR METHODS FOR DIAGNOSIS OF NEWCASTLE DISEASE IN FERAL PIGEONS (*Columba livia*)**

**ABSTRACT –** A number of studies were done on diagnostic methods of Newcastle disease in commercial poultry (*Gallus gallus*, species). However the literature is scarce on the development of techniques for the diagnosis of Newcastle disease (ND) infection in non-galiforme and free-living birds. The present study aims to develop and apply a liquid-phase blocking ELISA with Concanavalin A (BFL-Con A-ELISA) for the detection and quantification of antibodies against ND virus (NDV) in sera of free-living pigeons and a semi-nested-RT-PCR technique for detection of NDV in cloacal swabs collected from these birds. The results of BFL-Con A-ELISA and HI were compared for the detection of antibodies in serum samples from 107 pigeons, and a significant correlation with the HI test was obtained (r = 0.875) as well as high values of relative sensitivity (100 %), specificity (95.8%), accuracy (96.3%) and agreement (k = 0.83). The results of semi-nested-RT-PCR showed that nine of the 101 samples were positive for the presence of NDV. By comparing the semi-nested-RT-PCR with serological tests, high relative specificity values of 93.9% and 96.8% were obtained with regard to HI and BLF-Con A-ELISA tests, respectively, as well as a maximum relative sensitivity (100%) was observed regarding these serological tests. These data demonstrate that the BFL-Con A-ELISA and semi-nested-RT-PCR developed in this study were effective in the diagnosis of NDV infection, detecting either specific antibodies, or this virus, respectively, and have a great potential to be used advantageously in the diagnostic of NDV infection in pigeons and other species of non-galliforme birds.

**Key-words:** Pigeon, ELISA, Immunodiagnostics, Lectins, RT-PCR**,** Newcastle disease virus

## 1. INTRODUÇÃO

A Doença de Newcastle (DN) é uma enfermidade viral, aguda, altamente contagiosa que acomete aves de vida livre e comerciais, já tendo sido comprovada a presença do seu agente etiológico em mais da metade das 50 ordens da classe *Avis* (MAYO, 2002). O agente etiológico está classificado como um vírus do sorotipo *Paramyxovirus* aviário tipo 1– APMV-1, que pode variar de uma infecção branda (lentogênica), para intermediária (mesogênica), a uma infecção altamente patogênica (velogênica).

Dada a sua importância, essa enfermidade foi amplamente estudada em frangos de corte e galinhas de postura. Entretanto, o papel de aves ornamentais, migratórias ou selvagens na disseminação do vírus da doença de Newcastle (VDN) no ambiente constitui um campo de estudo pouco explorado, seja enfocando-se o agente isoladamente, seja particularizando-se características de imunoproteção. Dentre essas aves, o pombo (*Columba livia*) tem sido incriminado como hospedeiro e disseminador do VDN, não só para as aves de produção, mas também para aves silvestres, razão da sua importância na cadeia epidemiológica da enfermidade (TORO et al., 2005; CARRASCO et al., 2009).

As provas sorológicas comumente utilizadas para a detecção e/ou mensuração de anticorpos séricos de aves domésticas contra o VDN são o teste de Inibição da Hemaglutinação (HI) e o método indireto de ELISA, sendo o último geralmente obtido sob a forma de kits comerciais (CZIFRA et al., 1996). No entanto, em relação às aves não-galiformes de vida livre, o uso desse teste para o diagnóstico encontra-se limitado, pois não há disponibilidade de anticorpos secundários espécie-específicos. Neste caso, ainda é amplamente utilizado o teste padrão, o HI.

Em face dessas dificuldades, o método competitivo de ELISA com base no uso de anticorpo monoclonal específico para VDN (Mab) foi desenvolvido e tem sido utilizado como método alternativo para detectar anticorpos específicos em amostras de soro de aves exóticas ou selvagens, já que este ensaio imunoenzimático não requer o uso de anticorpos secundários espécie-específicos. No entanto, o

crescimento e manutenção das células de hibridoma para produzir continuamente Mabs são muito trabalhosos, ou ainda, a aquisição destes anticorpos é cara (SNYDER et al., 1983; SOUSA et al., 1999, 2000).

Por outro lado, as lectinas são glicoproteínas bastante versáteis sob o ponto de vista funcional e que se notabilizam pela capacidade de se ligarem a estruturas de carboidratos presentes em oligossacarídeos, glicoproteínas ou glicoconjugados (SHARON & LIS, 1990). A lectina Concanavalina A (Con A) tem sido empregada, com sucesso, em técnicas de imunoensaio para capturar antígenos glicosilados. Muitos pesquisadores demonstraram que a técnica de ELISA utilizando Con A é um método simples e de baixo custo para o diagnóstico de agentes virais. Apesar da elevada especificidade e eficiência, as lectinas não foram ainda usadas em técnicas imunoenzimáticas para o soro-diagnóstico do VDN, ou mesmo para a mensuração de anticorpos específicos contra esse vírus, tendo sido somente demonstrado que o VDN é capaz de se combinar com algumas lectinas; dentre elas a Con A.

Outros meios de diagnóstico laboratorial da DN em aves de vida livre incluem os procedimentos moleculares, que possuem a vantagem de conferir maior rapidez e sensibilidade, além de um alto nível de especificidade na obtenção de resultados (VIANNA et al., 2000). Dentre as técnicas de biologia molecular, a RT-PCR vem sendo amplamente utilizada como ferramenta alternativa de diagnóstico para um grande número de viroses de interesse veterinário, e passou a ser aceita e considerada o método padrão para o diagnóstico da DN, sobretudo quando faz a avaliação da sequência de nucleotídeos codificadora da sequência de aminoácidos presentes na região de clivagem da proteína de fusão (F) do VDN (CREELAN et al., 2002; OIE, 2012).

Com relação aos procedimentos para a realização da técnica de RT-PCR, existe a possibilidade de se usar uma variação da abordagem convencional, conhecida como nested-RT-PCR, ou semi-nested-RT-PCR, que vem a ser um procedimento que envolve duas etapas, no qual um par de oligonucleotídeos iniciadores flanqueando uma região maior e mais externa de um determinado alvo gênico é usado para amplificar um fragmento na primeira PCR e, em seguida, a partir de uma alíquota da primeira PCR, um segundo par de iniciadores flanqueando uma região menor e mais interna desse mesmo gene é usado para amplificar um

fragmento menor em uma segunda PCR. Esse procedimento resulta em um aumento considerável da sensibilidade, e em um menor limiar de detecção desse gene alvo, quando comparada com a técnica convencional de PCR (OHTA et al., 1995; MARTINS et al., 2000).

O presente estudo objetivou desenvolver um novo método alternativo de imunoensaio competitivo, usando a lectina concanavalina A como reagente de captura e soros de galinha hiperimunizadas contra o VDN, como anticorpo detector, para detecção de anticorpos contra esse vírus em amostras de soro de pombos, e também desenvolver e aplicar a técnica de semi-nested-RT-PCR para a detecção do VDN em amostras de suabes cloacais dessas mesmas aves.

# 2. REVISÃO DE LITERATURA

## 2.1 Aspectos gerais da doença de Newcastle

A doença de Newcastle (DN), também conhecida como pseudo-peste aviária, pneumoencefalite aviária ou desordem respiratório-nervosa, é um dos principais problemas sanitários da avicultura mundial. É uma enfermidade viral, aguda, altamente contagiosa que acomete várias espécies de aves domésticas e silvestres, produzindo sinais respiratórios (tosse, espirro, estertores), podendo ser acompanhados por manifestações nervosas, diarréia, edema da cabeça, entre outros (ALDOUS & ALEXANDER, 2001; ARNS et al, 2007).

É considerada em todo o mundo uma das mais importantes doenças virais em aves, não só devido a sua alta mortalidade e gravidade, mas também por causa do grande impacto econômico que pode resultar, sendo de notificação compulsória, e impondo restrições e embargos comerciais às áreas e países onde os surtos ocorrem (BRAZIL, 2007; OIE, 2008).

A DN possui uma distribuição mundial e já foi descrita nos principais países produtores de aves do mundo. A doença afeta principalmente galinhas e perus e tem como característica mais importante se tornar endêmica uma vez introduzida em uma determinada área, dificilmente podendo ser erradicada (JULY, 1971; BACK, 2004).

Além disso, foi relatado que existe uma grande variação entre as diversas estirpes do VDN, no que se refere à patogenia (ZHUHUI et al., 2004). Fatores como virulência da amostra, espécie acometida, “status” imunológico, predileção do vírus pelo sistema respiratório, nervoso central ou digestório, causam variações significativas na apresentação de sinais clínicos (SWAYNE & KING, 2003; ALEXANDER, 2009).

## 2.2 Aspectos Históricos

As primeiras descrições científicas da DN foram feitas em 1926, na Ilha de Java, na Indonésia, por Kraneveld; e em 1928, em Newcastle, na Inglaterra, por Doyle (ALEXANDER, 1997, SEAL et al., 2000), que utilizou o nome Doença de Newcastle, como forma de evitar um nome descritivo que induzisse a confusão com outras enfermidades (DOYLE, 1935).

Desde a primeira identificação da doença, foram relatadas na literatura três panzootias (ALEXANDER, 1997). A primeira panzootia ocorreu por volta de 1926, atingindo aves comerciais do Sudeste Asiático, Oriente Médio e Europa, principalmente na Inglaterra. A segunda panzootia ocorreu na década de 60 e atingiu vários países no Oriente Médio, provavelmente pelo intenso comércio de espécies de psitacídeos, oriundos principalmente da América do Sul, América Central e Sudeste da Ásia, transportados por aviões até seus destinos, o que afetou drasticamente a indústria avícola na maioria dos países. A enfermidade passou a ser controlada por meio de vacinas e fiscalização mais rigorosa na importação aves exóticas. A terceira panzootia emergiu no final da década de 70 e foi relatada em pombos-correio, sendo que, nesse caso, a forma de difusão mais freqüente do agente ocorreu por meio da exposição e comercialização dessa espécie aviária. Na Inglaterra, em 1984, uma amostra viral de pombos foi responsável por vinte surtos da doença em frangos de corte, sendo que os pombos infectados contaminaram a ração que foi ingerida pelos frangos (ALEXANDER, 2002).

O primeiro surto da DN, no Brasil, ocorreu concomitantemente em Belém do Pará e em Macapá, por volta de 1953 (SANTOS et al, 1954), sendo o primeiro isolamento do vírus realizado por Silva (1954). A partir desta data, a enfermidade passou a ser verificada em várias regiões do país, sempre associada a perdas importantes para os produtores (ITO et al, 1986). A entrada do VDN no país foi atribuída à importação de carcaças de aves contaminadas procedentes dos EUA para hotéis da capital paraense (CUNHA & SILVA, 1955). Posteriormente, foi isolado o VDN em aves ornamentais de cativeiro do estado do Rio de Janeiro (COUCEIRO et al, 1990), em flamingo (*Phoenicopterus ruber*) e avestruzes (*Struthio camelus*) (DORETTO JR. et al, 1999 ).

No Brasil, há registros de detecção de anticorpos específicos e de isolamento do VDN em aves silvestres no estado do Rio de Janeiro e de Pernambuco, sendo

que essas espécies de aves foram consideradas reservatórios desse vírus para as aves de produção comercial (OLIVEIRA JR. et al, 2003; SILVA et al, 2006). Além disso, em outro estudo no município de Galinhos, estado do Rio Grande do Norte, foi detectada presença de estirpes do VDN de baixa patogenicidade do VDN em suabes cloacais de aves migratórias (ARAÚJO et al., 2004; SILVA et al., 2006).

Segundo alguns autores, a DN ainda continua endêmica no Brasil, bem como em toda a América do Sul, servindo, por isso, como fonte constante de disseminação do vírus, principalmente por meio do tráfico de aves silvestres (CLAVIJO et al, 2000).

### 2.3 Etiologia, Aspectos estruturais e Patogenia

O agente etiológico da DN está classificado como um vírus do sorotipo *Paramyxovirus* aviário tipo 1 – APMV-1 (ZHUHUI et al., 2004). A família *Paramyxoviridae* é subdividida em duas subfamílias: *Pneumovirinae*, composta de um único gênero, o *Pneumovirus*, incluindo os pneumovirus aviários; e a subfamília *Paramyxovirinae*, a qual possui três gêneros, dentre eles o *Avulavirus*, que incorporou o vírus da Doença de Newcastle recentemente. O *Paramyxovirus* aviário é subdividido em 9 grupos, sendo os sorotipos descritos como APMV-1 a APMV-9 (PAULILLO & DORETTO JÚNIOR, 2009). Além destes, existe ainda estirpes denominadas Paramyxovirus Tipo 1 provenientes de pombos (PPMV-1 – “Pigeon Paramyxovirus Type 1”). Essas estirpes são variantes do APMV-1, que após sucessivas passagens em outras espécies de aves, sofreram um mecanismo de adaptação aos pombos, os quais tornaram-se resistentes a essas estirpes (BOX et al., 1988; ALEXANDER, 2009; International Commitee on Taxonomy of Viruses - ICTV, 2010).

A definição mais recente da DN é uma infecção que apresenta Índice de Patogenicidade intracerebral (IPIC) em aves jovens da espécie *Gallus gallus* - SPF (“Specific Pathogen Free”), de um dia de idade, maior que 0,7. Alternativamente ao IPIC, considera-se como agente etiológico da DN o APMV-1 que demonstra através de seqüenciamento de nucleotídeos do genoma viral, uma seqüência codificadora de aminoácidos básicos na posição carbóxi-terminal da proteína $F_2$, sendo

fenilalanina na posição 117 da extremidade amino-terminal da proteína $F_1$. Nesse caso, o termo “múltiplos aminoácidos básicos” usado para caracterizar a proteína F das estirpes mais virulentas do VDN, refere-se aos três últimos resíduos de arginina ou lisina entre as posições 113 e 116 dessa mesma proteína (ALEXANDER, 2003).

Os *Paramyxovirus* são compostos por RNA genômico de fita simples, não segmentado e de polaridade negativa e que contém 15,2 kilobases, equivalente $5\times10^6$ daltons. O VDN é envelopado, pleomórfico, muitas vezes esférico e se apresenta com diâmetro entre 100 a 500 nanômetros (SANSON, 1988; ALEXANDER, 2003; ARNS et al., 2007). Conforme Silva et al. (2006), este vírus se caracteriza pela capacidade de aglutinar hemácias de aves, devido a presença da proteína hemaglutinina, que junto com a neuraminidase, se projetam da superfície do vírus.

O genoma viral é constituído de seis genes (3’-NP-P-M-F-HN-L-5’) que codificam as seguintes proteínas: NP, proteína do nucleocapsídeo; P, proteína fosforilada associada ao nucleocapsídeo; M, a proteína da matriz; F, proteína de fusão, que constitui as menores projeções de superfície; HN, hemaglutinina-neuraminidase, que formam também projeções vistas na superfície das partículas virais; e L, polimerase associada ao nucleocapsídeo (LEEW & PEETERS, 1999; YUSOFF & TAN, 2001).

As duas proteínas estruturais de membrana têm papéis bastante importantes na relação com o hospedeiro: a glicoproteína Hemaglutinina-Neuraminidase (HN), envolvida na adsorção às células alvos e liberação dessas mesmas células e a glicoproteína de fusão (F), mediadora da fusão do envelope viral com as membranas da célula hospedeira. A glicoproteína F é sintetizada como um precursor, a $F_0$, e só tem capacidade de fusão após a clivagem em dois polipeptídeos: $F_1$ e $F_2$. Entretanto, além da clivagem de $F_0$, ainda é fundamental a ação de HN para que ocorra a fusão (LEEUW & PEETERS, 2005). A proteína HN desempenha papel importante na infecção viral. Esta proteína é responsável pelo reconhecimento dos receptores que contém ácido siálico na superfície das células alvos; pela promoção do mecanismo de fusão mediado pela proteína F, o qual possibilita a penetração do vírus e também pela remoção do ácido siálico das novas partículas virais, evitando que ocorra a

auto-aglutinação do vírus. A demonstração dessa dependência confirmou a hipótese de que a virulência do VDN é multigênica (HUANG et al., 2004).

A proteína de nucleocapsídeo (NP) é uma das mais importantes proteínas do VDN. Essa proteína mantém uma relação estreita com o genoma viral durante a replicação do vírus, através da síntese de nucleocapsídeo RNAse resistente, proporcionando proteção às novas partículas virais sintetizadas em ação conjunta com as proteínas P e L. Quanto a proteína de matriz (M), está presente em maior quantidade no interior do vírus, com a função de organizar a morfogênese do virion (KHO et al., 2001). A replicação viral ocorre no citoplasma da célula hospedeira. A transcrição ocorre por meio da atuação da enzima transcriptase, que produzirá moléculas com capacidade de atuar com o RNA mensageiro e utilizar mecanismos da própria célula parasitada para tradução das proteínas virais, as quais serão transportadas até a membrana plasmática celular, que se modificará devido ao pareamento nucleocapsídeo, culminando assim na liberação de novos virions (PEEPLES, 1988).

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

Estirpes do VDN têm sido agrupadas, para fins epidemiológicos, em cinco patotipos com base nos sinais clínicos observados nas aves infectadas (PAULLILLO & DORETO JÚNIOR, 2009; OIE, 2008). São eles:

- **Velogênico Visceratrópico** – apresenta-se altamente patogênica, culminando em altos índices de mortalidade; freqüentemente são observadas lesões intestinais e respiratórias hemorrágicas;
- **Velogênico Neurotrópico** – forma que apresenta alta mortalidade e usualmente são observados sinais nervosos e respiratórios;

- **Mesogênico** – apresenta sinais respiratórios mais brandos, ocasionalmente sintomatologia nervosa, mas com baixa mortalidade;
- **Lentogênica ou vacinal** – apresenta infecções respiratórias brandas ou subclínicas;
- **Entérica Assintomática** – consiste usualmente de infeção entérica subclínica.

A adequação exata a essa classificação de patotipos raramente é vista no campo, uma vez que essas descrições referem-se a observações em aves SPF inoculadas com os respectivos patotipos. Ainda no campo, sinais clínicos observados em aves infectadas com estirpes lentogênicas podem ser exacerbadas com infecções por outros microrganismos ou quando condições adversas ambientais estão presentes (ALEXANDER, 2009).

## 2.4 Epidemiologia

### 2.4.1 Hospedeiros

Além de afetar um grande número de espécies aviárias, a infecção pelo VDN tem sido descrita também em outras espécies, incluindo répteis (principalmente serpentes) e mamíferos (cães, gatos e humanos). Aparentemente a replicação desse vírus nestes hospedeiros não tem importância epidemiológica para a ocorrência da doença nas aves (SPREADBROW, 1999). Apesar de não existirem levantamentos sobre a ocorrência da DN em humanos, existem evidências de que amostras vacinais e amostras virais de campo podem infectar e causar sinais clínicos em humanos, como dores de cabeça, lacrimejamento, conjuntivite e edema de pálpebra (HERNANDEZ et al., 1987).

O VDN tem sido detectado em 27 das 50 ordens de aves existentes, sendo que, até o momento, 241 espécies aviárias tiveram registro de infecção pelo vírus (KALETA & BALDAUF, 1988). Esse dado é corroborado em um estudo realizado por Schelling et al. (1999), no qual verificaram índices de soropositividade para o VDN variando de 10,2 a 100% em 115 diferentes espécies aviárias domésticas e silvestres. Ademais, foram realizados isolamentos de vírus em aves migratórias,

aves aquáticas, aves silvestres, aves de competição e em aves de criação comercial, incluindo pombos e avestruzes (SENNE et al., 1983; PANIGRAHY et al., 1993).

Inúmeras espécies aviárias de vida livre têm sido descritas como susceptíveis à infecção pelo VDN e existe a possibilidade de esse vírus permanecer sob forma latente nestas aves, que, sob determinadas condições, podem sofrer mutações, as quais podem levar a formação de estirpes virulentas do VDN (ALEXANDER et al., 1985; MONNE et al., 2006). Dentre as aves mais susceptíveis a DN, estão os galináceos, faisões, papagaios e ratitas. As aves de susceptibilidade intermediária incluem corujas, falcões, águias, cegonhas, pingüins, pardais e pássaros. E ainda, dentre as aves que apresentam pouca susceptibilidade, estão as aves aquáticas em geral, pelicanos, gaivotas e grande garça azul (CROSS, 1991).

A partir do momento que as aves de vida livre podem ser responsabilizadas pela introdução da DN, estudos comparativos das estirpes de VDN isoladas de aves e estirpes utilizadas no preparo de vacinas vivas tornaram-se de crucial importância (PANSHIN et al., 2002; KAPCZYNSKI et al., 2006).

### 2.4.2 Transmissão

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, 2003).

A principal via de transmissão do VDN é a horizontal, através de aerossóis (gotículas de saliva ou de secreções respiratórias) expelidos pelas aves doentes, os quais contaminam o ar, a água e os alimentos. Assim sendo, as aves podem se infectar ao beberem água ou comerem alimentos contaminados. O contato direto entre as aves doentes e sadias também é uma das causas de contaminação com a doença. Spradbrown (1999) argumenta que, em pequenas criações de galinha, a disseminação pelo ar é uma forma importante de manutenção do vírus na propriedade.

Adicionalmente, a DN pode ser também difundida por fezes contaminadas, através de sua ingestão direta ou indiretamente, através da ração ou água

contaminada, ou ainda pela inalação de pequenas partículas produzidas pelas fezes secas (MALAVAZZI, 1999).

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 das chocadeiras constituem um importante fator na disseminação da doença (CORREA, 1970).

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

### 2.4.3 Disseminação

A DN é considerada uma doença de distribuição mundial, com áreas endêmicas, ou áreas consideradas livres da doença. O VDN virulento é endêmico e causa freqüente epidemias na África, Ásia, América Central e partes da América do Sul e Oriente Médio. Graves epidemias aconteceram na Dinamarca em 2002 e na Califórnia em 2003. Desde então, epidemias tem ocorrido na Áustria, Barém, Bulgária, Finlândia, Grécia, Itália, Japão, Noruega, África do Sul, Suécia, Tailândia e Venezuela (OIE, 2008).

O VDN possui a capacidade de se difundir por todo o mundo por meio de aves susceptíveis, pessoas, equipamentos, ar, ração, animais mortos contaminados e até por espécies não aviárias, entre as quais, pequenos roedores, insetos e artrópodes, que transitam entre as aves infectadas e as não infectadas susceptíveis (LANCASTER, 1964; LANCASTER & ALEXANDER, 1975; ALEXANDER, 1991; ALEXANDER, 1997; SALLE, 2002). Durante o curso da infecção por uma estirpe velogênica do VDN, a maioria das aves excreta grande quantidades de vírus nas fezes, que se constituem no principal meio de disseminação do VDN entre as aves (NISHIZAWA et al., 2007).

As aves de vida livre são uma fonte importante do VDN, tendo sido demonstrado que elas podem ajudar a introduzir e a disseminar a DN em criações domésticas de determinada região (DEGEFA et al., 2004; CAMENISCH et al., 2008; ORSI et al., 2010). A alta densidade em criatórios e a localização de plantéis

avícolas industriais em áreas de concentração de aves silvestres têm sido apontadas como responsáveis pelo aumento significativo da DN (SEAL et al., 1998; CLAVIJO et al., 2000; VERWOERD, 2000).

De fato, os columbiformes têm sido incriminados como hospedeiro e disseminadores da DN, não só para as aves de produção, mas também para aves silvestres, razão da sua importância na cadeia epidemiológica dessa enfermidade. Por serem de vida livre, os pombos podem carrear o VDN para dentro das granjas comerciais e ainda, em condições favoráveis, transmitir para aves de vida livre, estirpes virais presentes em granjas (ALEXANDER et al., 1985; SICK, 2001; TORO et al., 2005; CARRASCO et al., 2009; SOUZA et al., 2010). Avaliações realizadas na Itália, em estudo comparativo de estirpes isoladas de pombos sinantrópicos (*Columba livia*) e pombos selvagens (*Streptopelia decaocto*), revelaram que, embora muitas vezes estas aves ocupem o mesmo habitat, podem albergar estirpes do VDN de linhagens filogenéticas distintas (TERREGINO et al., 2003).

Para que ocorra a manutenção do vírus em uma determinada população aviária há necessidade da existência de reservatórios e/ou disseminadores, cuja participação e identificação na patogenia da doença são pouco compreendidas. Diante disso, o que favorece a manutenção do VDN é: presença de indivíduos portadores, introdução de aves susceptíveis; multiplicidade das espécies aviárias (aves comerciais X aves de vida livre), heterogeneidade de estirpes de VDN, dentre outros fatores (AWAN, 1994).

### 2.5 Aspectos clínicos e patológicos da infecção pelo VDN

Os sinais clínicos em aves infectadas com o VDN variam amplamente e são dependentes de fatores tais como: patotipo viral, espécie hospedeira, idade das aves, infecções intercorrentes com outros microrganismos, estresse ambiental e competência imunológica do hospedeiro. Em algumas circunstâncias, infecções com vírus extremamente virulento podem resultar em alta mortalidade súbita e, até mesmo, poucos sinais clínicos (BEARD, 2008). Ainda que os sinais clínicos não sejam considerados patognomônicos da DN, os sinais nervosos e/ou entéricos podem estar associados à estirpes velogênicas (BEARD & HANSON, 1984).

Um quadro inespecífico também pode estar associado com sinais como depressão, diarréia, prostação, edema de cabeça, queda da produção de ovos caminhando para uma parada completa (MCFERRAN, 1989).

Caso a DN não seja endêmica em uma determinada área, os sinais clínicos e as lesões podem ser altamente significativos (ALEXANDER et al., 2004). Os sinais clínicos típicos são: estado de prostração e depressão com penas eriçadas, diarréia branco-esverdeada, e nas sobreviventes, a cabeça girada para um lado conhecido como torcicolo, paralisia das patas, asas ou outros sinais neurológicos. Outras características típicas da doença incluem: rápida propagação, morte em período de 2-3 dias, mortalidade superior a 50%, e um período de incubação de 2-3 dias, ou, em ocasiões raras, de 2-15 dias. À necropsia, os achados mais comuns são: muco na traquéia, hemorragias no intestino e no proventrículo (BEARD & HANSON, 1984; NISHIZAWA et al., 2007).

Deve-se destacar que os sinais clínicos descritos para a doença de Newcastle são muito parecidos ou idênticos a outras enfermidades infecciosas que acometem as aves, como: bronquite infecciosa, laringotraqueíte, influenza aviária, coriza, doença crônica respiratória, dentre outras, que causam principalmente sintomas digestivos e respiratórios, indistinguíveis da doença de Newcastle. Portanto, sinais clínicos isolados não apresentam uma base confiável para o diagnóstico da doença (JORGE et al., 2002; ALEXANDER, 2009).

A infecção de algumas espécies de aves silvestres com estirpes mais virulentas do VDN pode não mostrar quaisquer sinais clínicos, porém essa espécie animal pode difundir o vírus da Doença de Newcastle para plantéis susceptíveis (SICK, 2001; PAULILLO & DORETTO JÚNIOR, 2009).

A cura da DN, que, aliás, é rara nas aves que sofreram lesões nervosas graves, é acompanhada por seqüelas diversas, como crescimento retardado, postura reduzida, com ovos anormais e de baixa capacidade de eclosão (CORREA, 1970).

O período de incubação do VDN pode ser de até 15 dias, entretanto a média é de 2 a 6 dias. Em galinhas susceptíveis, o surto pode ser extremamente severo; 100% das aves afetadas podem morrer em até 72 horas sem apresentar qualquer sinal clínico. Pombos podem apresentar mortalidade de até 80%, enquanto que

canários geralmente apresentam doença branda com baixa mortalidade, e o perdiz (*Rhynchotus rufescens*) não apresenta sinais clínicos, nem mortalidade quando infectada experimentalmente com vírus patogênico. Entretanto esta espécie, quando infectada experimentalmente, foi capaz de difundir o vírus da doença de Newcastle para galinhas SPF. Psitacídeos podem desenvolver uma infecção crônica renal com potencial de eliminação de partículas virais por longo período (CORREA, 1970; SICK, 2001; ALEXANDER, 2009).

O aparecimento da doença em uma criação geralmente se verifica após 5 dias, em média, a partir da introdução do vírus. A mortalidade entre pintos varia de 10 a 50% nos casos crônicos e a quase 100% nos casos de infecção com estirpes de virulência mais elevada do VDN (MALAVAZZI, 1999).

### 2.6 Imunidade na Doença de Newcastle

Durante a infecção pelo VDN, a resposta imune inicial é mediada por células e detectável de dois a três dias após a inoculação de vacinas vivas (GUHMMAN et al., 1976). Porém, foi demonstrado que a resposta celular por si só, não é o suficiente para conferir proteção contra a infecção pelo VDN. A presença de anticorpos neutralizadores do vírus e/ou inibidores da hemaglutinação são necessários para gerar a proteção contra o a DN (REYNOLDS & MARAQA, 2000).

Anticorpos direcionados contra as glicoproteínas hemaglutinina-neuraminidase (HN) e fusão (F) podem neutralizar o VDN (SANTOS et al. 1996; ALEXANDER, 1997). Anticorpos monoclonais específicos para reconhecer a glicoproteína F têm se mostrado mais eficientes em induzir maior neutralização do que os que reconhecem a glicoproteína HN. Os títulos de anticorpos dependem da amostra infectante, mas normalmente o pico da resposta humoral é alcançado entre três e quatro semanas. Anticorpos inibidores da hemaglutinação podem ser detectados em aves por até um ano após uma série de imunizações ou infecção com a forma mesogênica (LEE et al., 2008). Anticorpos contra o VDN têm sido encontrados nas secreções respiratórias e intestinais, sendo IgG e IgA as principais imunoglobulinas identificadas (AL-GARIB et al., 2003; SHARMA, 2003; JEON et al., 2008).

## 2.7 Medidas de controle

Aliada às medidas de biosseguridade que as granjas devem possuir, a vacinação sistemática contra o VDN e o monitoramento do grau de proteção pós-vacinal, por meio de reações sorológicas, são os instrumentos mais eficientes no controle da DN (ALEXANDER, 2009).

As vacinas mais utilizadas são preparadas com estirpes virais lentogênicas, embora vacinas preparadas com o vírus inativado também têm sido utilizadas em poedeiras (REHMANI, 1996). Usualmente, para aves de corte, recomenda-se uma vacinação na água de beber aos 10 a 12 dias e uma revacinação aos 30 a 35 dias de idade. Já no caso das galinhas poedeiras, além destas duas vacinações citadas, há necessidade de que se vacinem aos 90 ou 120 dias, através de via intramuscular, no peito (MALAVAZZI, 1999). Uma grande desvantagem da utilização destas vacinas usuais contra a DN é que fica impossível a diferenciação por provas sorológicas de aves vacinadas das infectadas. Desse modo, a produção de vacinas recombinantes, expressando as proteínas HN e F se apresenta com resultados promissores, gerando na maioria das aves uma proteção eficaz contra a doença e permitindo a diferenciação de aves vacinadas das infectadas com o VDN (LEE et al., 2008).

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

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

### 2.8 Diagnóstico laboratorial

O objetivo do diagnóstico da DN é nortear as decisões a serem tomadas para o controle da doença e, desse modo, a sua disseminação (ALEXANDER, 1997). Portanto, um diagnóstico confiável, seguro e de fácil realização deve ser considerado, pois quanto mais rápido for realizado, mais eficazes serão as medidas de controle da doença a serem postas em execução, evitando-se assim e a disseminação da enfermidade (KHO, et al., 2000).

A DN está enquadrada na O.I.E. como de notificação compulsória. O laboratório de referência para diagnóstico do VDN, no Brasil, é o Laboratório Nacional Agropecuário (LANAGRO), que é uma unidade do MAPA localizado em Campinas, São Paulo. A confirmação deve ser feita pelo isolamento e identificação do agente viral e através de testes de patogenicidade como: Índice de Patogenicidade Intracerebral (IPIC), Índice de Patogenicidade Intravenosa (IPIV) e o Tempo Médio de morte Embrionária (TMME) (BRASIL, 2007). Reações sorológicas positivas servem para fazer o imunodiagnóstico e ainda detectam casos subclínicos da infecção por este vírus (THAYER, 1986).

#### 2.8.1 Isolamento e caracterização viral

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

#### 2.8.2 Técnicas moleculares aplicadas ao diagnóstico da Doença de Newcastle

Vários métodos têm sido desenvolvidos para o diagnóstico direto laboratorial do VDN, com destaque para as técnicas de detecção e identificação viral, incluindo-se os procedimentos de biologia molecular como a hibridização de ácidos nucléicos, análise de RNA genômico viral e o uso de anticorpos antipeptídeos de regiões das proteínas HN e F (YUSSOF & TAN, 2001), vários tipos de PCR ("Polymerase chain reaction"), incluindo a técnica convencional de PCR, a nested-PCR e a PCR em tempo real, sendo que algumas dessas técnicas podem ser seguidas por análises de genotipagem por técnicas como RFLP e seqüenciamento de nucleotídeos de determinados alvos gênicos do VDN (KANT et al., 1997; GOHM et al., 2000; ALDOUS et al., 2001; PHAM et al., 2005).

Todavia, o processo de isolamento viral do VDN e posterior determinação do IPIC é extremamente laborioso, demorado e de alto custo, sendo que algumas amostras necessitam de seis passagens em ovos embrionados (ALDOUS & ALEXANDER, 2001; CREELAN et al., 2002). Em adição a isso, procedimentos moleculares de diagnóstico, dentre eles a técnica de PCR têm despontado como uma alternativa interessante em comparação à metodologia convencional de caracterização viral, com vantagens em relação ao tempo de execução e ao custo (VIANNA et al., 2000).

A PCR constitui-se em uma técnica muito eficaz para produzir grandes quantidades de fragmentos amplificados de DNA, a partir de uma pequena concentração de um DNA molde presente em uma amostra inicial. O processo utiliza uma DNA polimerase termoestável (Taq polimerase) e oligonucleotídeos iniciadores específicos ("primers") que se ligam às extremidades 5' e 3' de uma determinada região do genoma a ser amplificada (JACKWOOD, 1992).

A partir de 1991, quando a combinação da técnica de transcrição reversa seguida pela reação em cadeia da polimerase (RT-PCR) foi primeiramente utilizada no diagnóstico de material genético do VDN (JESTIN & JESTIN, 1991), este procedimento tem sido reproduzido, aperfeiçoado e amplamente utilizado na rotina do diagnóstico laboratorial da DN (CAVANAGH, 2001). Como o VDN é um RNA vírus, ele se tornou um ponto de partida bastante apropriado para ser usado na maioria das técnicas moleculares, destinadas ou a simples detecção de partes do genoma desse vírus, ou para diferenciação de suas estirpes. Por meio da

transcrição reversa, o RNA viral passa a DNA complementar (c-DNA), que pode ser utilizado na PCR (ALDOUS, 2001). Com isso, a técnica de PCR passou a ser utilizada como uma ferramenta muito útil no diagnóstico do VDN e também de um grande número de vírus de interesse veterinário (KHO et al., 2000).

Ainda, de acordo com a OIE (2012), a PCR é considerada um dos métodos padrão de diagnóstico para a DN, sendo que nesse caso, além da detecção de partes do genoma viral, são avaliadas as características da seqüência de aminoácidos presentes na região de clivagem da proteína F da estirpe do VDN que está sendo analisada (CREELAN et al., 2002). Dado que a base molecular da patogenicidade da DN depende da seqüência de aminoácidos no sítio de clivagem da proteína $F_0$, a técnica de PCR pode ser usada na amplificação dessa região específica do gene da proteína F, sendo capaz de identificar todas as estirpes do VDN já conhecidas, independentemente das amostras, da patogenicidade ou hospedeiro envolvido. Essas características tornam a PCR com base na amplificação da proteína F aceita para fins de diagnóstico do VDN (COLLINS et al., 1993; SEAL et al., 2000; OIE, 2008).

Entretanto, a PCR convencional é usualmente ineficiente na detecção de alvos moleculares escassos, como ocorre em infecções e amostras biológicas, nas quais há a presença de poucos agentes virais infecciosos (FANSON et al., 2000; LEGAY et al.,2000). Considerando que, aves de vida livre infectadas naturalmente com o VDN nem sempre eliminam uma carga viral alta durante todo o curso da infecção, e, ademais, a eliminação do genoma do VDN nas fezes é detectada em períodos variáveis, como por exemplo em pombos experimentalmente infectados, isso ocorre a partir do 5° dia após a infecção, perdurando até o 24° dia, ao passo que os anticorpos anti-VDN começam a ser detectados entre a 2ª e 3ª semanas pós-infecção (CARRASCO et al., 2008). Dessa maneira, tanto podem ser detectados resultados falso-negativos pela PCR como pelos testes sorológicos, em período mais precoces após a infecção com o VDN, embora as técnicas de diagnóstico molecular detectem mais precocemente a infecção pelo VDN. Por outro lado, um outro ponto interessante ainda a se considerar é que resultados positivos para a detecção de anticorpos contra o VDN podem ocorrer concomitante com resultados negativos em técnicas moleculares, pois a eliminação e a presença de vírus em

suabes cloacais ou traqueais é intermitente, enquanto que os anticorpos uma vez produzidos atingem um pico de concentração e, a partir daí, sofrem um declínio em seus níveis, se não houver um novo contato com esse agente.

Variações da técnica de PCR podem ser desenvolvidas para o diagnóstico da DN, entre elas o nested-RT-PCR ou o semi-nested-RT-PCR, que é constituída por duas amplificações sucessivas do marcador molecular e é defendida por conciliar ainda maior sensibilidade e especificidade que a PCR simples e o multiplex-PCR (OHTA et al. 1995; MARTINS et al., 2000). Contudo, estudos demonstraram que o nested-RT-PCR é cerca de 100 vezes mais sensível que a RT-PCR convencional (KHO et al., 2000). Ao aumentar a sensibilidade e a especificidade da primeira etapa a partir da segunda, a técnica se apresenta como uma alternativa vantajosa em relação à reação de PCR simples, já que a grande sensibilidade torna o nested-PCR altamente recomendado para a detecção de alvos com baixo número de cópias genômicas (DUPIN et al., 2002). Além disso, a transferência do primeiro produto amplificado serve para diluir inibidores de PCR que eventualmente possam estar presentes na amostra inicial e que podem contribuir para a ocorrência de resultados falsos-negativos. Todavia, há também desvantagens por despender mais tempo, mais reagentes, e oferecer maior risco de contaminação por manipulações excessivas do produto amplificado na primeira PCR (PERSING, 1993; REBOUÇAS, 2001; CREELAN et al., 2002).

Além disso e em favor da técnica de nested-RT-PCR, quando comparada à técnica usual de isolamento viral em ovos embrionados, essa metodologia de diagnóstico molecular se mostrou mais eficiente em termos de redução de tempo para a determinação de resultados conclusivos, e em equivalência quanto à sensibilidade e especificidade nos estágios iniciais e intermediários da infecção (BARBEZANGE & JESTIN, 2002).

### 2.8.3 Técnicas sorológicas aplicadas ao diagnóstico da DN

Uma ampla variedade de testes foi desenvolvida para detectar anticorpos contra o VDN, entre eles a imunodifusão radial, hemólise radial, neutralização em placa e inibição da hemaglutinação (HI) (ALEXANDER & MANVELL, 2002). O teste

HI é um dos testes sorológicos mais utilizados para detectar/titular os anticorpos contra o VDN, e é considerado como reação padrão para o diagnóstico dessa enfermidade (XU et al., 1997). Porém, atualmente, vários relatos na literatura indicam que o método indireto de ELISA é também eficaz nessa mesma tarefa, apresentando, ainda, algumas vantagens relevantes, tais como: é o teste sorológico mais utilizado em avicultura para VDN e outros agentes etiológicos, por sua sensibilidade, especificidade e rapidez (SANTOS & SILVA, 2009). Comparativamente, o teste de HI apresenta baixa sensibilidade, especialmente quando soros de outras espécies de aves são testados, e ainda há a possibilidade de ocorrência de aglutinação inespecífica de hemácias de galinha (CZIFRA et al., 1996).

Valores dos níveis de anticorpos quantificados pela técnica de ELISA usualmente são correlacionados com os valores obtidos no teste de HI, por ser este adotado como padrão no monitoramento pós-vacinal da DN (BROWN et al., 1990; CVELIC-CABRILO et al., 1992; RICHTZENHAIN et al., 1993; CZIFRA et al., 1998; SOUSA et al., 1999a).

É válido ressaltar também que o ensaio ELISA pode ser executado através de vários protocolos, e fazendo uso de diferentes tipos de conjugados imunoenzimáticos, os quais, por sua vez, podem restringir a detecção de anticorpos antivirais a uma dada espécie animal como verificado pelo método indireto do teste, disponível sob a forma de kits comerciais, para os quais, conjugados específicos para a maioria das espécies de aves não-galiformes não são encontrados comercialmente. Adicionalmente, algumas variantes de métodos de ELISA, como exemplifica o próprio ensaio indireto, a despeito de certas vantagens mencionadas, envolvem o preparo e a padronização freqüentes de várias partidas de antígeno viral purificado por ultracentrifugação, tornando sua exeqüibilidade na rotina laboratorial, um tanto mais laboriosa.

No entanto, em relação às aves de vida livre, o uso do método indireto de ELISA para o soro-diagnóstico da DN encontra-se limitado, pois os conjugados imunoenzimáticos conseguem detectar anticorpos presentes nos soros de aves galiformes e não há disponibilidade desses tipos de conjugados para as outras espécies de aves, sobretudo as de vida-livre. Em vista dessa dificuldade, tem-se

utilizado com maior freqüência o teste de HI, ou na melhor das hipóteses há o esforço para a padronização de métodos alternativos de ELISA, usando o formato de ensaios competitivos (c-ELISA) (KOTHLOW et al, 2008).

Com respeito aos testes de ELISA competitivo, sabe-se que essa técnica faz uma abordagem mais refinada e sua execução não requer o uso de anticorpos secundários espécie-específicos (SHAFER et al, 1998; ZHOU et al, 1998). Adicionalmente, alguns métodos variantes do ELISA como exemplifica o próprio ensaio indireto, a despeito de certas vantagens mencionadas, envolvem o preparo e a padronização freqüentes de várias partidas de antígeno viral purificado por ultracentrifugação, o que representa dificuldades adicionais no preparo desse ensaio imunoenzimático.

Dentre os métodos de ELISA competitivo, verifica-se que o método de ELISA de bloqueio de fase líquida com base no uso de anticorpo monoclonal específico para VDN (Mab) tem sido utilizado para detectar anticorpos específicos em amostras de soro de aves exóticas ou selvagens (CZIFRA et al., 1996). No entanto, o crescimento e manutenção das células de hibridoma para produzir continuamente Mabs são muito trabalhosos e oneorosos, ou ainda, a aquisição deste tipo de anticorpos monoclonais é cara (SNYDER et al., 1983; CARDOSO et al., 1999; SOUSA et al., 1999; GROVES & MORRIS, 2000). Ademais, em relação ao uso de Mab, sabe-se que o método de ELISA competitivo utilizando esses anticorpos, não é capaz de reconhecer todas as cepas de APMV-1, já que os Mabs são conhecidos pela sua especificidade para epítopos individuais (OIE, 2008).

Por outro lado, constata-se que as lectinas têm sido empregadas em técnicas de ELISA, para capturar antígenos glicosilados, permitindo que sejam usadas preparações não purificadas desses mesmos antígenos. As lectinas são glicoproteínas derivadas de plantas, animais ou microrganismos, que interagem, especificamente, com os carboidratos, em especial alguns monossacarídeos, que estejam presentes na superfície de células humanas, de animais e de plantas, bem como de bactérias e vírus (RHODES & MILTON, 1998). Dentro desse contexto, verifica-se que o ELISA-Lectina foi utilizado com sucesso no diagnóstico laboratorial de antígeno do câncer pancreático, do vírus da imunodeficiência adquirida humana (HIV), do vírus da imunodeficiência felina (FIV) e do vírus da bronquite infecciosa

aviária (GILIAN, 1993, PARKER et al., 1992, SIBILE et al., 1995, BRONZONI et al., 2005).

Apesar da elevada especificidade e eficiência, as lectinas não foram ainda usadas em técnicas imunoenzimáticas para o soro-diagnóstico do VDN, ou mesmo para a mensuração de anticorpos específicos contra esse vírus, tendo sido somente demonstrado que o VDN é capaz de se combinar com algumas lectinas; dentre elas, a Concanavalina A (Con A), em ensaios nos quais as lectinas inibiam a hemaglutinação viral (MCMILLAN et al, 1985).

Dessa forma, pode-se supor que a substituição de anticorpos de captura anti-VDN pela lectina Con A e do anticorpo detector monoclonal por anticorpos policlonais obtidos de galinhas hiperimunizadas por via óculo-nasal com suspensões do VDN não purificadas poderiam facilitar a execução dos ensaios competitivos de ELISA, como a técnica de BFL-ELISA, uma vez que não há necessidade de se fazer a purificação viral por ultra-centrifugação, ou de se deparar com a restrição de uma única especificidade de epítopo que é imposta quando se utilizam anticorpos monoclonais.

Em face de todo exposto e da evidente escassez de trabalhos sobre o desenvolvimento e padronização de novos métodos para o diagnóstico da DN em aves de vida livre, esse trabalho tem como proposta o desenvolvimento e a aplicação de um método alternativo de imunoensaio competitivo, usando a lectina concanavalina A como reagente de captura para o VDN e soros de galinhas hiperimunizadas contra esse vírus, como anticorpos policlonais detectores, em um formato de bloqueio de fase líquida, e que é denominado BFL-Con A-ELISA, para a detecção de anticorpos contra o VDN em amostras de soros de pombos, sendo os resultados finais obtidos comparados com aqueles gerados pelo teste convencional de Inibição da Hemaglutinação (HI). E ainda, objetiva-se, nesse estudo, fazer o desenvolvimento e a aplicação de um método molecular mais sensível e específico que a PCR convencional, além de mais rápido e prático que o isolamento viral, denominado semi-nested-RT-PCR, utilizando oligonucleotídeos iniciadores que amplificam uma região conservada da proteína F, capaz de identificar as estirpes do VDN em amostras de suabes cloacais dessas mesmas aves.

## 3. OBJETIVOS

Tendo-se em vista a escassez de informações e trabalhos a respeito de técnicas de diagnóstico da DN utilizando amostras biológicas de aves de vida livre, o presente estudo tem como objetivos:

- Desenvolver e padronizar o método de BFL-Con A-ELISA para a detecção e mensuração do nível de anticorpos contra o VDN em pombos, utilizando reagentes de mais fácil preparação do que aqueles que são usualmente empregados nos métodos competitivos de bloqueio de ELISA.

- Comparar o método de BFL-Con A-ELISA e o teste convencional HI, na detecção de anticorpos contra VDN em soros de pombos.

- Desenvolver e aplicar a técnica de Semi-nested-RT-PCR, visando a detecção do VDN em amostras de suabes cloacais de pombos de vida-livre.

- Comparar o desempenho dos métodos de BFL-Con A-ELISA, HI e Semi-nested-RT-PCR no diagnóstico da infecção pelo VDN em pombos de vida-livre.

# 4. MATERIAL E MÉTODOS

## 4.1 Amostras de soros e amostras cloacais de pombo (*Columba livia*)

Para realização desse trabalho, foram capturados um total de 107 pombos adultos e de vida livre. As aves procedentes de Jaboticabal - SP foram capturadas no Campus da UNESP por meio de uma arapuca, no período de janeiro a maio de 2012. Foram colhidas 107 amostras de sangue por punção da veia braquial de cada ave e estocadas em freezer -20ºC; e 101 amostras cloacais, utilizando suabes estéreis, que foram diluídas em meio triptose e armazenadas em freezer -70ºC. Todos os procedimentos com as aves foram delineados de acordo com os Princípios Éticos em Experimentação Animal, além da aprovação pelo Comitê de Ética e Bem Estar Animal da FCAV – UNESP – Jaboticabal (Protocolo nº 021719/11) e com a anuência do IBAMA (Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis), embora estas aves sejam consideradas da fauna doméstica do país.

## 4.2 Amostras de soro positivas e negativas de pombo (*Columba livia*)

Dois grupos de seis pombos cada um, que foram previamente confirmados como soronegativos para VDN por meio do teste de HI, foram colocados em dois isoladores de pressão positiva. O primeiro grupo recebeu quatro doses da estirpe LaSota do VDN com $10^4$ EID50/ave, via intra-ocular, em intervalos de dez dias entre cada administração desse vírus. As amostras de sangue foram colhidas 10 dias após a última imunização e os soros obtidos foram armazenados a -20º C. Um conjunto dos soros a partir do último sangramento foi preparado e usado como soro positivo anti-VDN. O segundo grupo de seis pombos permaneceu não-imunizado para o mesmo período de imunização. Estas aves foram sangradas de forma semelhante aos pombos do grupo imunizado, para preparar o soro negativo anti-VDN de pombo.

## 4.3 Soros negativos

Ovos SPF (“Specific pathogen free”) de aves da linhagem Leghorn Branca foram colocados em incubadoras (Premium Ecológica) ajustadas para 37,8ºC e 60% de umidade. A produção de secreção lacrimal será estimulada através do gotejamento de glicerina. O sangue foi colocado em tubos de vidro autoclavados, para obtenção do soro. O título de anticorpos anti-VDN presentes nos soros colhidos foi analisado através do método de Sanduíche-ELISA-Con A (BRONZONI et al., 2005), determinando a resposta imune específica.

### 4.4 Anticorpo detector

Para a obtenção de soro hiperimune policlonal anti-VDN a ser utilizado como anticorpo detector no BFL-Con A-ELISA foi realizada a imunização de 6 aves da linhagem Leghorn Branca utilizando-se a estirpe LaSota do VDN. Todas as aves receberam 2 doses de vacina viva atenuada (via ocular), nas idades de 4 e 6 semanas, e 2 doses de vacina oleosa (via intramuscular), nas idades de 8 e 16 semanas. As aves foram sangradas, por punção cardíaca, dez dias após a última inoculação. Os soros foram misturados, distribuídos em alíquotas e titulados pelas provas de HI e S-ELISA-Con A (BRONZONI et al., 2005); em seguida, foram estocados a -20°C.

### 4.5 Propagação e Titulação da Infectividade da Estirpe LaSota do VDN

A amostra da estirpe LaSota do VDN viral foi multiplicada por meio da inoculação de 0,1 mL da suspensão na cavidade alantóide de ovos embrionados, livres de patógenos específicos (SPF), com 9 a 11 dias de idade. Após 40 horas de inoculação, os ovos foram resfriados a 4°C, por no mínimo 4 horas e, em seguida, o líquido córion alantóide (LCA) foi colhido e imediatamente centrifugado a 5000 x*g* a 4°C por 7 a 10 minutos, para a clarificação da suspensão viral. O título hemaglutinante dessa suspensão foi avaliado pelo teste de hemaglutinação (SOUSA et al., 2000). Foi obtido um titulo de HA igual a 10 ($log_2$) do LCA infectado com a

estirpe LaSota do VDN. O volume total obtido foi separado em alíquotas de 1 mL que foram armazenadas a -70ºC.

### 4.6 Análise de proteínas em gel de poliacrilamida na presença de dodecilsulfato de sódio (PAGE-SDS)

A suspensão de líquido córion-alantóide (LCA) contendo a estirpe LaSota do VDN a ser analisada foi previamente concentrada pela adição de NaCl e polietileno-glicol (PEG) 8000 (BRONZONI et al., 2005) e, depois de ter sido determinada a concentração proteíca pelo método de Bradford, ela foi diluída em tampão para amostra contendo 62,5mM Tris-HCl, pH 6,8, 1% SDS, 10% de glicerol, 0,001% de azul de bromofenol e 1% de 2-mercaptoetanol. Após fervura por 2 minutos essa amostra foi aplicada no gel de poliacrilamida com concentração de 12% no gel de separação. A separação eletoforética foi realizada pela técnica de eletroforese de gel de poliacrilamida com PAGE-SDS, usando-se um sistema de tampão descontínuo, conforme recomendado na técnica descrita por Laemmli (1970). As bandas polipeptídicas foram submetidas a eletrotransferência para a membrana de nitrocelulose, seguindo-se a realização da técnica de Western-blotting, conforme as recomendações de Towbin et al. (1979) e de Gibertoni et al. (2010).

### 4.7 “Western-blotting”

Para realização dessa técnica foi adotado o protocolo de Towbin et al., (1979) e de Gibertoni et al. (2010), buscando-se fazer a detecção de anticorpos policlonais anti-VDN presentes no soro de referência positivo para esse vírus. Após realizada a separação eletroforética pela técnica de poliacrilamida gel eletroforese com SDS-PAGE, os polipeptídeos foram transferidos para uma membrana de HPVDF (GE Healthcare, EUA), a qual foi, em seguida bloqueada com leite em pó desnatado a 5% em tampão PBS. A diluição do soro hiperimune de galinha contra o VDN foi de 1:100, sendo esta fase da reação incubada sob agitação por 1 hora a temperatura ambiente. O conjugado anti-IgG de galinha com a peroxidase (SIGMA-ALDRICH) foi utilizado na diluição de 1:500 e incubado por 1 hora sob agitação, para revelar a

ligação antígeno-anticorpo. Em seguida a membrana foi lavada com PBS-Tween 20 (PBST) e PBS, sendo a revelação de cor da reação feita após a adição do substrato cromógeno específico dietil-amino-benzidina (DAB) acrescido de uréia (SIGMA-ALDRICH).

### 4.8 Determinação da diluição ótima do antígeno viral, do reagente de captura e do anticorpo detector para uso no BFL-Con A-ELISA

A diluição ótima do antígeno viral (estirpe LaSota), do reagente de captura (Concanavalina A), e do anticorpo detector (soro hiperimune de galinha anti-VDN), foi determinada por titulação em bloco, através do método Sanduíche-ELISA-ConA (BRONZONI et al., 2005). Inicialmente, foram adsorvidos duas diluições de VDN (1:2 e 1:4) frente a diluições seriais de razão 2 da ConA (4mg/mL a 0,06mg/mL) e do soro hiperimune de galinha (1:250 a 1:1000).

### 4.9 Reação de BFL-Con A-ELISA para a detecção de anticorpos anti-VDN

Em linhas gerais, a técnica BFL-Con A-ELISA foi realizada de acordo com a metodologia desenvolvida por Sousa et al. (2000), com algumas adaptações, abaixo explanadas. Uma vez determinados as diluições ideais dos reagentes utilizados no método de BFL-Con A-ELISA, as microplacas foram adsorvidas com a concentração ótima (1mg/ml de Con A), preparadas em PBS pH 7,4 (“Phosphate Buffer Saline” – 0,01 M $PO_4^{=}$ 0,14 M NaCl), sendo a reação incubada de 16 a 18 horas a 4ºC. Após esse período, as placas foram lavadas quatro vezes com PBS-Tween-20 e bloqueadas por 45 minutos a 37 °C com 100 μL por cavidade de tampão de bloqueio (tampão Carbonato-Bicarbonato – pH 9,6 - acrescido de 10% de leite em pó desnatado- LPD). As placas foram a seguir lavadas com PBS-Tween-20 (PBS-T) quatro vezes e foram adicionados 50 μL por cavidade da Fase Líquida da reação, a qual era composta de uma mistura de volumes iguais (40 μL) entre suspensão antigênica do VDN em LCA diluída (1:2) em PBS-T + 10% de LPD e os soros testes de pombo diluídos 1:8 no mesmo tampão para o antígeno, em duplicatas. A mistura acima mencionada foi realizada em microplaca em fundo “U”, previamente

bloqueadas com 250 µL de TCB pH 9,6 + 10% de LPD, por cavidade, e incubada por 2 horas em câmara úmida. Estas microplacas contendo a mistura entre VDN e diluições dos soros testes, permaneceram a 4ºC de 16 a 18 horas, e, ao final, foram incubadas por 45 minutos a 37ºC. Em seguida, foi adicionado a Fase Líquida às microplacas de ELISA e incubou-se essa fase da reação à temperatura de 37ºC por 1 hora. Ao final desta etapa, as placas foram novamente lavadas com PBS-T quatro vezes e foi adicionado 50 µL do anticorpo detector ("pool" de soro hiperimune de galinha anti-VDN) em sua diluição ideal (1:1000 em PBS-T + 10% de LPD ), para titulação dos antígenos residuais do VDN não-ligados aos anticorpos presentes no soro teste, incubando as microplacas, de maneira idêntica à etapa anterior. As microplacas foram lavadas, como nas etapas anteriores; receberam, na próxima fase, uma diluição (1:1000) do conjugado imunoenzimático anti-IgG de galinha com a peroxidase (50 µL por cavidade), foram incubadas a 37ºC por 2 horas e, ao final desta etapa foram lavadas por quatro vezes, tal como se descreveu anteriormente. Em seguida, foi feita a adição, em volumes de 50µL por cavidade, da mistura substrato-cromógeno (peróxido de hidrogênio - $H_2O_2$ / Orto-fenileno-diamina - OPD), preparada em água deionizada, deixando-se a reação se desenvolver por 15 minutos à temperatura ambiente, quando foi adicionado HCl 2M em volumes de 50 µ L por cavidade para bloquear a atividade enzimática. As densidades ópticas (DOs) obtidas foram mensuradas em leitor de placas de ELISA (BIO-RAD - Modelo 550) e no comprimento de onda de 490 nm.

### 4.10 Cálculo das Porcentagens de Inibição (PI) obtidas no BFL-Con A-ELISA para a detecção de anticorpos anti-VDN

Em cada microplaca, 10 cavidades foram reservadas para controle do antígeno (VDN), na ausência de anticorpos competidores presentes nos soros testes, tendo sido adicionados 50 µL apenas da suspensão viral, diluída a 1:2 em PBST pH 7,4 + 10 % de LPD, durante a adição da Fase Líquida. Tais cavidades foram utilizadas para definir a DO média correspondente a 100% de ligação do anticorpo detector ao antígeno. A média das DOs obtidas para cada amostra teste

foi transformada em porcentagem de inibição (PI), segundo Esterhuysen et al. (1995), calculada através da seguinte fórmula:

PI = 100 – (X / Y x 100), onde:

X = média das DOs de cada amostra teste, já descontando o valor da média das DOs obtido no controle do antígeno em cada microplaca e correspondente a 0% de inibição;

Y = média das DOs do controle negativo, já descontado o valor da média das DOs obtido no controle do antígeno em cada microplaca e correspondente a 0% de inibição.

### 4.11 Cálculo do ponto de corte para o BFL-Con A-ELISA

O ponto de corte da técnica de BFL-Con A-ELISA foi determinado pela análise TG-ROC ("Two-graph receiver operating characteristic") (GREINER et al., 1995, XU, et al., 1997) plotando-se, graficamente, valores de sensibilidade (Se) e especificidade (Sp) contra os respectivos valores de PI, sendo esse considerado uma variável independente. No ponto de intersecção das curvas de Se e Sp, denominado de ponto de equivalência (Se=Sp), foi determinado o ponto de corte do BFL-Con A-ELISA. Portanto, soros apresentando valores de PI iguais ou maiores ao ponto de corte determinado conforme a descrição acima foram considerados positivos para anticorpos contra o VDN no BFL-Con A-ELISA, enquanto que, valores abaixo deste mesmo ponto foram classificados como negativos para a presença de anticorpos anti-VDN. O nível de acurácia pré-estabelecido foi de 95%, assim como os intervalos de confiança utilizados. A análise TG-ROC foi realizada em pasta de trabalho do programa EXCEL Microsoft (GREINER et al., 1995).

### 4.12 Padronização e reação de Inibição da Hemaglutinação (HI)

Foram colhidos aproximadamente 5 mL de sangue de galinhas com anticoagulante (solução de Alsever). Em seguida, a quantidade colhida (hemácias + anticoagulante) foi filtrada, utilizando-se funil e algodão; tendo-se lavado a suspensão dessas hemácias por três vezes em PBS pH 7,2 e centrifugando-se à

baixa rotação por 4 minutos. O sedimento resultante foi diluído a 0,5% em PBS pH 7,2 e, em seguida, foi feita a lise das hemácias utilizando-se 4,5 mL de água destilada e 0,5 mL da suspensão anterior. A densidade óptica desejada ($DO_{desejada}$= 0,30 a 0,33) foi mensurada em espectofotrômetro, no comprimento de onda de 545 nm.

A próxima etapa foi a reação de hemaglutinação (HA). Utilizando-se microplacas de 96 cavidades com fundo em “U”, foram adicionados 25 µL por cavidade de diluente (PBS pH 7,2) e, em seguida, foi realizada diluição seriada na razão 2 de suspensão viral (LCA infectado com a estirpe vacinal La Sota de VDN) até a penúltima coluna reservando a última coluna para o controle das hemácias. Foi adicionada a suspensão de hemácias em todas as cavidades, no volume de 25 µL/cavidade, e após 30-40 minutos procedeu-se à leitura do título do HA, que foi expressa como a recíproca da maior diluição do vírus, onde se verificou o fenômeno da hemaglutinação por completo. Esta diluição corresponde a uma UHA (Unidade Hemaglutinante).

Determinado o título hemaglutinante da suspensão do VDN em LCA, foi realizada a prova de HI. As alíquotas dos soros testes colhidos de pombos de vida-livre foram previamente tratadas com inativação térmica a 56ºC por 15 minutos e com Kaolin a 5% (p/v), para remoção dos inibidores inespecíficos da hemaglutinação (PHILLIPS, 1973; WILLIANS et al., 1997). Para tanto, foram colocados 25 µL de PBS pH 7,2, em todas as cavidades e foi adicionado soro de pombo, utilizando-se diluição seriada de razão 2, de 1:2 até 1:2048. Em seguida, adicionaram-se quatro UHA do antígeno viral padronizado e incubou-se por 20 minutos, à temperatura ambiente. Superada esta etapa, a suspensão de hemácias lavadas de aves a 0,5% em PBS pH 7,2 foi adicionada às cavidades, como sistema revelador da reação e incubou-se por mais 30 minutos, à temperatura ambiente. O título foi definido como o inverso da maior diluição de soro capaz de inibir completamente a atividade hemaglutinante viral.

### 4.13 Determinação do ponto de corte para o teste de HI

O ponto de corte utilizado para o teste de HI foi de 1:8 ($2^3$), conforme recomendam Alexander (1989) e Cadman et al. (1997). Nesse sentido, títulos maiores ou iguais do que este valor foram considerados positivos para a presença de anticorpos contra o VDN, e títulos menores foram considerados negativos.

### 4.14 Análise estatística

Os níveis de anticorpos (valores PI) anti-VDN mensurados pelo BFL-Con A-ELISA foram analisados por regressão linear com os títulos de anticorpos HI mensurados como $Log_2$Título-HI obtidos para cada um das 107 amostras de soros de pombos testados, obtendo-se o coeficiente de correlação (*r* de Pearson), usando-se o programa EXCELL (MS OFFICE).

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

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

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

### 4.15 Oligonucleotídeos iniciadores para uso nas técnicas de RT-PCR e semi-nested-RT-PCR

Os oligonucleotídeos externos (FEP1 e FEP2) foram definidos a partir a seqüência de nucleotídeos do gene da glicoproteína F da estirpe LaSota do VDN, disponível no GeneBank sob o nº AJ629062 e utilizando-se o programa computacional para construção de oligonucleotídeos iniciadores denominado “Gene Runner” (versão 3.05). Os oligonucleotídeos internos (FIP1 e FIP2) foram previamente descritos por Pham et al. (2005) e abrangem a região codificadora do sítio de clivagem da glicoproteína F (Quadro 1).

**Quadro 1.** Descrição dos iniciadores externos e internos utilizados na RT-PCR e na semi-nested-RT-PCR para obtenção de regiões diferentes da proteína do VDN.

| **Oligonucleotídeos** | **Sequência 5’ → 3’** | **Posição genoma (pb)** |
|---|---|---|
| *Externos* | | |
| FEP 1 + | ATGGGCTCCAGACCTTC | 1 |
| FEP 2 - | CATTTTTGTAGTGGCTCTCA | 1640 |
| *Internos* | | |
| FIP 1 + | AACAGGACAACTGACCACT | 252 |
| FIP 2 - | TGGCAGCATTCTGGTTGGCT | 447 |

(+) Oligonucleotídeo sense; (-) Oligonucleotídeo anti-sense

**4.16 Seleção dos oligonucleotídeos para a reação de RT-PCR e semi-nested- RT-PCR usados para amplificação do gene F**

Foram testadas quatro combinações de oligonucleotídeos internos com os externos. A primeira combinação foi feita com os oligonucleotídeos de sentido positivo FEP1 e de sentido negativo FEP2, que são específicos para a amplificação de um fragmento de 1662 pb do gene F. A segunda combinação foi com os oligonucleotídeos de sentido positivo FIP1 e de sentido negativo FIP2, que flanqueiam um fragmento de 196 pb do gene F, incluindo a região codificadora do sítio de clivagem da proteína F do VDN. A terceira combinação foi com os

oligonucleotídeos de sentido positivo FEP1 e de sentido negativo FIP2, que são específicos para a amplificação de um fragmento de 448 pb do gene F e a quarta foi feita com uma combinação dos oligonucleotídeos de sentido positivo FEP2 e de sentido negativo FIP1, a qual delimitava um fragmento de 1406 pb do gene F.

### 4.17 Extração do RNA viral

O procedimento da extração do RNA viral foi realizado a partir das amostras de LCA contendo a estirpe LaSota do VDN ou dos suabes cloacais colhidas de pombos, com o auxílio de hastes estéreis e descartáveis. Os suabes foram acondicionados em microtubos de 2 mL contendo meio triptose-fosfato (DIFCO) e, em seguida, congelados a -70ºC. No momento da extração, as amostras foram descongeladas à temperatura de 4ºC e homogeneizadas em vórtex por 15 segundos. Para o RNA viral foi utilizado o kit comercial Trizol LS Reagent (INVITROGEN), seguindo-se as recomendações do fabricante, com algumas adaptações, abaixo explanadas.

A extração foi feita a partir de 500 µL de amostra de suabe cloacal, adicionando-se 500 µL de Trizol LS Reagent (INVITROGEN) e mais 100 µL de uma mistura de clorofórmio e álcool isoamílico, na proporção 24:1. Em seguida, a mistura foi homogeneizada com ajuda do vórtex e deixada em repouso à temperatura ambiente por 5 minutos e ao final desse passo, foram centrifugadas em 12 000 x*g* por 15 minutos a 4ºC. A fase líquida, em volume de aproximadamente 500 µL, foi transferida para outro microtubo de 1,5 mL, onde se adicionou o mesmo volume de álcool isopropílico (500 µL). Essa mistura foi agitada, delicadamente, por inversão e depois deixada por 20 minutos a -70ºC (precipitação do RNA).

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

### 4.18 Síntese do cDNA (RT)

A reação de transcrição reversa (RT) para obtenção do cDNA, a partir do RNA genômico viral extraído conforme a descrição anterior, foi realizada seguindo o protocolo recomendado pelo Kit da enzima SuperScript (INVITROGEN), em um volume final de 20 µL. Inicialmente incubou-se a 65ºC por 5 minutos a mistura inicial da reação, a qual foi constituída de 5 µL do RNA genômico extraído, dNTP 0,5 mM (INVITROGEN), 0,5 µg de Random primer (INVITROGEN) e $H_2O$ DEPC. Em seguida, acrescentou-se o tampão da RT 5x (INVITROGEN), 1 µL de inibidor de ribonucleases (INVITROGEN) e incubou-se a 42°C durante dois minutos; após adição de 50 U da enzima SuperScript (INVITROGEN), incubou-se a 42°C durante 50 minutos, e no final, a 70°C por 15 minutos em termociclador MJ RESEARCH®.

### 4.19 Determinação e avaliação da sensibilidade da reação de RT-PCR e semi-nested-RT-PCR para amplificação do gene F

Para a realização do teste de sensibilidade da RT-PCR e da semi-nested-RT-PCR utilizou-se RNA genômico da estirpe LaSota do VDN cultivado em LCA. Para estabelecer o limiar de sensibilidade para ambas reações foram feitas diluições seriadas de razão constante igual a 10 (1:1, $10^{-1}$ a $10^{-12}$) do LCA infectado com a estirpe LaSota do VDN em $H_2O$ DEPC autoclavada. A extração do RNA genômico foi executada para cada uma dessas diluições, pelo método do Trizol LS Reagent (INVITROGEN), seguindo as instruções de uso do fabricante, com adaptações descritas no item 4.17. O material extraído foi ressuspendido em 12 µL $H_2O$ DEPC e logo em seguida levado para a reação de transcrição reversa.

### 4.20 Avaliação da especificidade da reação de semi-nested-RT-PCR para amplificação do gene F

A especificidade da técnica de semi-nested-RT-PCR foi avaliada testando-se um painel de 4 vírus aviários heterólogos e não relacionados ao VDN e que foram obtidos a partir de amostras virais provenientes de vacinas vivas atenuadas como o

metapneumovírus aviário (estirpes PL e 119/95-BR), vírus da bronquite infecciosa (estirpe H-120), e virus da doença de Gumboro (estirpe S-706).

### 4.21 Reação em cadeia da polimerase (PCR) para amplificação do gene F

Para a amplificação da região codificadora do gene do sítio de clivagem da proteína F do VDN, foi realizada a PCR para um volume final de 50 μl. Para tanto, foram utilizados 0,2mM de dNTPs, 5 μL de tampão de PCR (10X), 20pmol de cada um dos oligonucleotídeos iniciadores, 1,5 mM de $MgCl_2$, 2,0 U da enzima Taq DNA polimerase (INVITROGEN), completando-se o volume (q.s.p) com água tratada com DEPC e adicionando-se 5 μL de cDNA viral obtido na RT. As temperaturas e os passos da PCR foram previamente otimizados, em função, principalmente, das características físico-químicos dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados no presente trabalho e utilizando-se um gradiente de temperaturas de anelamento. O programa que apresentou o melhor desempenho foi aquele que foi constituído por um primeiro ciclo de 95ºC por 5 min, seguido de outros 35 ciclos, cada um compreendendo três passos: 94ºC por 1 minuto, para desnaturação da dupla hélice do cDNA, 50ºC por 2 minutos, para o anelamento dos oligonucleotídeos iniciadores e 72ºC por 2 minutos e 30 segundos de extensão e, por último, um ciclo a 72ºC por 10 minutos de extensão final, em termociclador MJ RESEARCH®.

### 4.22 Reação de semi-nested-RT-PCR para amplificação do gene F

Foi realizada objetivando obter uma maior sensibilidade para detecção do VDN, proporcionada pela amplificação de um fragmento interno ao produto obtido na primeira técnica de PCR. Esse procedimento foi realizado utilizando-se 2,5µl de produto da primeira PCR, adicionado a um mix contendo Tampão de PCR 10x (INVITROGEN), dNTP 0,5mM, 10pmol de cada oligonucleotídeo (FIP1 E FIP2), cloreto de magnésio 1,5mM, 1U de Taq DNA Polimerase (INVITROGEN) e água DEPC, para um volume final da reação de 25µl. Para esta reação foi feito a diluição do produto da primeira PCR, sendo que a amostra de referência usada como controle positivo (estirpe LaSota do VDN em LCA) e as amostras de suabes cloacais

de pombos foram diluídas 40x. A mistura foi incubada no termociclador nas mesmas condições descritas para a reação de PCR, resultando em um fragmento com 196 pb.

### 4.23 Análise eletroforética dos produtos amplificados do gene F

A presença dos produtos das técnicas de RT-PCR e semi-nested-RT-PCR foi investigada através do sistema de eletroforese horizontal em gel de agarose. Para esta análise, foram adicionados 3 µL de tampão amostra em 4 µL de produto de PCR ou Semi-nested-PCR. Esta mistura foi adicionada no gel de agarose a 1% contendo tampão TBE 0,5x (Trisborato 0,045M e EDTA 0,001M, pH 8,2) e GelRed™ (SIGMA) como corante fluorescente de ácidos nucléicos, tendo sido feita a separação eletroforética após a aplicação de voltagem de 60V, por cerca de 4 horas, seguindo-se a visualização do gel em transiluminador com luz ultravioleta. As dimensões dos fragmentos foram inferidas com base na comparação feita com o eletroferograma gerado pelo marcador de tamanho de DNA, de 1kb DNALadder plus (INVITROGEN) o qual foi aplicado no gel juntamente com as amostras que foram analisadas, a cada corrida eletroforética.

### 4.24 Análise comparativa das técnicas de semi-nested-RT-PCR, HI e BFL-Con A-ELISA para o diagnóstico da infecção pelo VDN

Os cálculos de sensibilidade e especificidade da técnica de semi-nested-RT-PCR frente ao HI e frente ao BFL-Con A-ELISA foram feitos de acordo com Braile, D. M. & Godoy, M. F. (1999).

# 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

## 5.1 Especificidade do soro de galinha anti-VDN, usado como anticorpo detector no BFL-Con A-ELISA

Os resultados da análise por meio da técnica de “Western blotting” (Figura 1) evidenciaram que o soro hiperimune de galinhas preparado contra a estirpe LaSota do VDN apresentou elevada reatividade com os principais componentes antigênicos do VDN, isto é, com as proteínas estruturais hemaglutinina (HN), de nucleocapsídeo (NP) e de matriz (M) presentes na suspensão concentrada do VDN em LCA (canaleta 2) e não interagiu com outros componentes antigênicos do próprio LCA. Isso evidencia que essa preparação de soro hiperimune pode ser usada de forma segura e eficiente como anticorpo detector do VDN em diferentes métodos de ELISA, inclusive o que foi desenvolvido no presente trabalho.

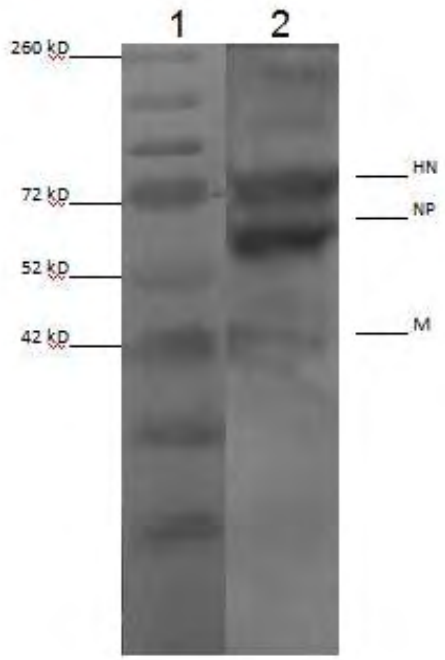


**Figura 1.** Membrana de Western com “pool” de soro de galinhas hiperimunizadas com a estirpe LaSota do VDN, para observar a reatividade desses anticorpos policlonais contra os principais antígenos virais. Na canaleta 1, 5 µL do Marcador de peso molecular (Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder, Fermentas); na canaleta 2, suspensão de LCA com a estirpe LaSota do VDN concentrada com PEG. HN- Hemaglutinia-Neuraminidase, NP- Nucleoproteína e M- Proteína de Matriz do VDN.

### 5.2 Padronização do BFL-Con A-ELISA

O teste de BFL-Con A-ELISA foi padronizado, a partir de uma titulação em bloco, colocando-se para reagir várias concentrações do reagente de captura (Con A), previamente adsorvido às cavidades da microplaca com diferentes diluições de antissoro detector (soro hiperimune policlonal de galinha) abrangendo as diluições de 1:250 a 1:1000, além de 2 diluições do VDN (1:2 e 1:4). Foram definidas como condições ideais para serem aplicadas ao teste BFL-Con A-ELISA a concentração ou as diluições que corresponderam a 1mg/ml da Con A, 1:1000 do antissoro detector e 1:2 do VDN. Nessas condições foram obtidas as maiores reatividades específicas do anti-soro detector de galinhas com o VDN e foi observada uma maior discriminação em relação ao soro negativo para o VDN proveniente de galinhas SPF.

### 5.3 Titulação de soros de pombos positivos e negativos para o VDN

A titulação de um “pool” de seis amostras de soro de pombos vacinados com a estirpe LaSota do VDN e um “pool” de seis amostras de soro de pombos não imunizados, revelou diluição ideal para os soros de pombos de 1:8 ($log_{10}$ = 0,903), que proporcionou perfis distintos de reatividade no BFL-Con A-ELISA, levando a uma maior discriminação entre os soros positivos e negativos para a presença de anticorpos contra o VDN (Figura 2). O soro de pombo positivo com uma titulação de HI de 7 ($log_2$), apresentou, nas diluições que foram testadas, reatividade que variou de um valor de PI de 97,78% até a um valor de PI de 0,80%. O soro de pombo negativo com um título HI $\leq$ 3 ($log_2$), demonstrou a atividade de inibição muito baixa sobre a reatividade dos anticorpos de detecção em todas as diluições séricas testadas (valores de PI $\leq$ 0,95%).

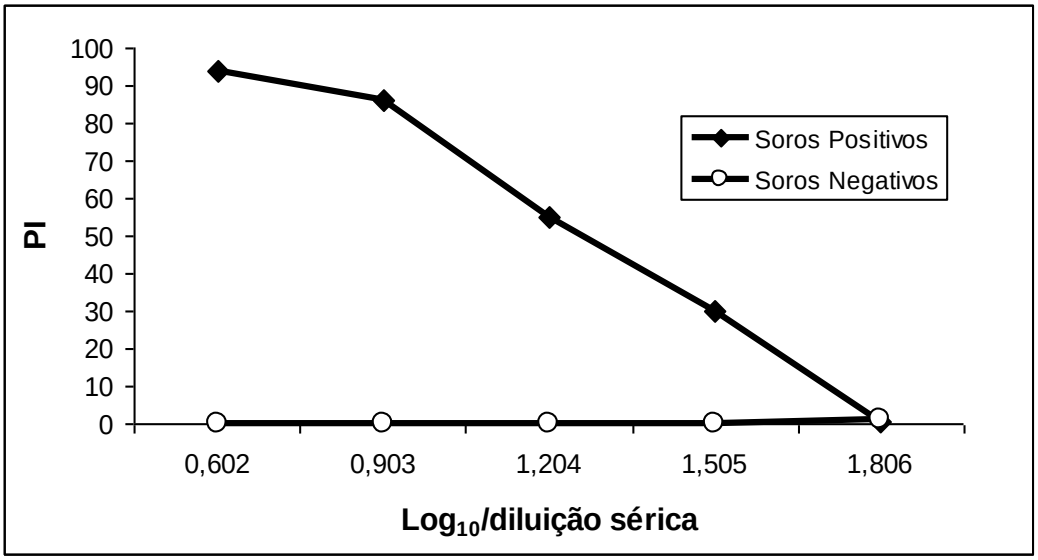


**Figura 2.** Detecção de anticorpos específicos para VDN em pools de soros de pombos imunizados (VDN +) e não-imunizados (VDN -) ensaiados por LPB-Con A-ELISA.

### 5.4 Determinação do ponto de corte do BFL-Con A-ELISA

Na aplicação dos ensaios imunoenzimáticos visando ao soro-diagnóstico da DN, torna-se fundamental a determinação de pontos de corte adequados para o estabelecimento de índices de sensibilidade e especificidade do teste (GREINER et

al., 1995), sendo mais recomendado a utilização do cálculo desse parâmetro por meio da análise por TG-ROC. As curvas de sensibilidade (Se) e especificidade (Sp) no BFL-Con A-ELISA foram definidas em função das PI dos soros testados para a determinação do ponto de corte. Através da análise TG-ROC, observou-se que o ponto de intersecção das duas curvas apresentou um ponto de equivalência (Se=Sp) de 0,95 e um valor de PI igual a 19,73%, que representa o ponto de corte do BFL-Con A-ELISA. (Figura 3). Portanto, amostras que apresentaram valores maiores ou iguais a 19,73% foram consideradas positivas e amostras com valores abaixo de 19,73% foram consideras negativas no teste de BFL-Con A-ELISA.

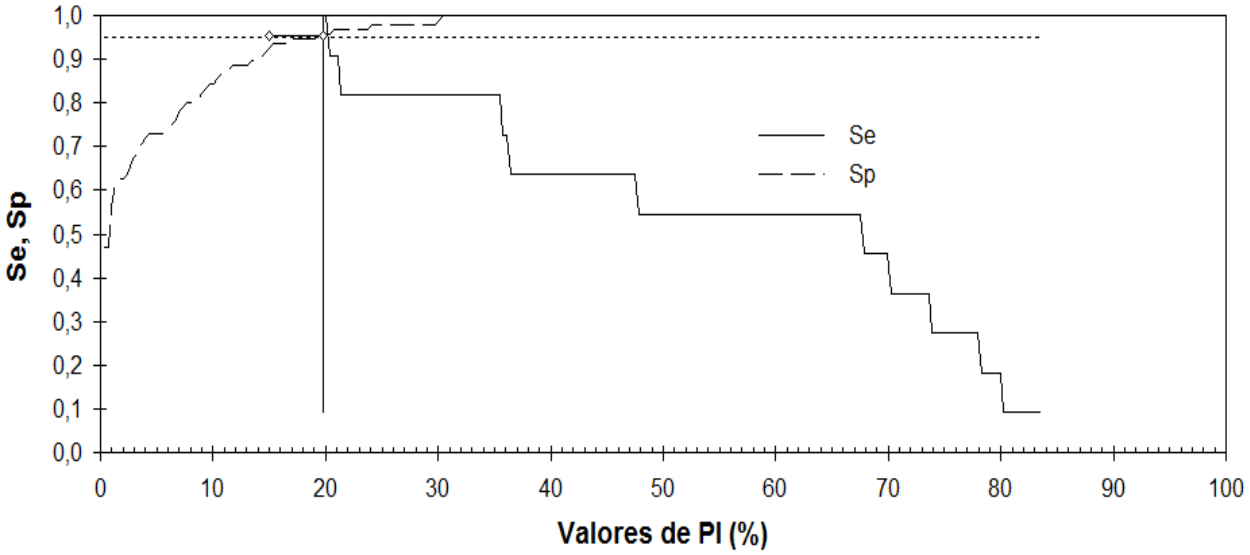


**Figura 3**. Curvas de sensibilidade (Se) e especificidade (Sp) do BFL-Con A-ELISA através da análise TG-ROC. O ponto de intersecção entre as duas curvas indica o ponto de corte para BFL-Con A-ELISA (PI = 19,730%), onde Se=Sp=0,95 (linha horizontal tracejada). O intervalo de confiança empregado foi de 95%.

### 5.5 Relações entre os resultados do BFL-Con A-ELISA e do teste de HI para a detecção de anticorpos anti-VDN nos soros de pombos

A análise de correlação dos testes de ELISA e de HI das 107 amostras de soros de pombos testadas proporcionou um coeficiente de correlação elevado e significante ($r$ =0,875; p< 0,0001) (Figura 4).

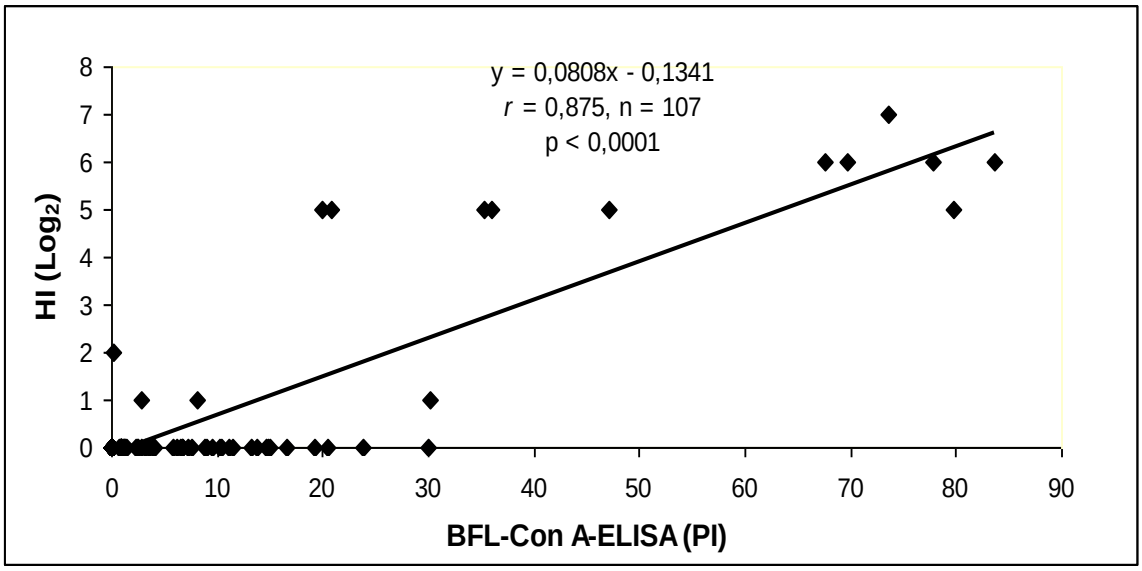


**Figura 4.** Análise de regressão linear entre os títulos obtidos nas reações de HI e BFL-Con A-ELISA com a determinação do coeficiente de correlação (*r*) e da equação da reta correspondentes.

No tocante à avaliação da correlação entre as técnicas de ELISA e de HI para a detecção de anticorpos contra o VDN, Sousa et al. (2000) ao avaliarem as concentrações de anticorpos anti-VDN em emas e avestruzes vacinados contra a DN, utilizando HI e um método de BFL-ELISA, similar ao desenvolvido no presente trabalho, exceto que usando anticorpos de captura ao invés da lectina Con A, obtiveram coeficiente de correlação elevado de 0,875 e indice kappa de 0,82. Esses achados conferem uma boa sustentação de que a substituição do anticorpo de captura pela Con A não apresentou diferenças significativas nos resultados em ambos os métodos de ELISA quando comparados com o HI, indicando que essa lectina pode ser utilizada com sucesso como reagente de captura no BFL-Con A-ELISA.

Ademais, na literatura, existem vários estudos de comparação de diferentes métodos de ELISA (indireto, competitivo, dentre outros) com o teste de HI para a detecção de anticorpos contra o VDN, nos quais foram obtidos coeficientes de correlação significantes entre essas técnicas. Assim, verifica-se que foram obtidos tanto valores de correlação superiores aos encontrados nesse estudo em soros de galinhas vacinadas contra o VDN por Witt et al. (1992) ($r$ = 0,95) e Richtzenhain et

al. (1993) (*r* = 0,96), como valores semelhantes (*r* = 0,85), os quais foram observados por Brown et al. (1990).

Bronzoni et al. (2005) realizaram também um estudo comparativo envolvendo o teste de ELISA indireto (Kit comercial) e o teste de Con A-S-ELISA, para a avaliação de 121 amostras de soros de frangos vacinados contra o vírus da bronquite infecciosa (VBI) e foi encontrada uma correlação igual a 0,85 e índice kappa igual a 0,80, que são valores muito semelhantes aos encontrados no estudo em tela.

Na análise comparativa entre o BFL-Con A-ELISA e o teste de HI (Tabela 1), foi verificado também que desses 107 soros analisados, 11 e 92 foram concordantes nesses dois métodos sorológicos e classificados como positivos e negativos, respectivamente, sendo que 4 soros foram negativos no teste de HI e positivos no BFL-Con A-ELISA, enquanto que nenhum soro apresentou reação negativa no teste de BFL-Con A-ELISA e foi positivo no teste de HI. De posse desses dados comparativos foi determinada a sensibilidade relativa do BFL-Con A-ELISA, que correspondeu a 100%, a especificidade relativa de 95,8%. Os valores preditivos negativos e preditivos positivos foram determinados e corresponderam respectivamente a 100% e 73,3%, enquanto que a acurácia foi de 96,3%. Ainda, a comparação entre esses dois testes sorológicos demonstrou uma alta concordância (k = 0,83) (Tabela 1).

Sousa et al. (1999), ao compararem o BFL-ELISA, para a detecção de anticorpos anti-VDN em amostras de soro de perdizes, com o teste de HI, obtiveram índices de sensibilidade relativa (96,82%), acurácia (94,50%), correlação (*r* = 0,8217) e a especificidade relativa (90,54%) inferiores aos encontrados no presente estudo. Porém, a determinação do ponto de corte foi baseado na média das percentagens de inibição observadas no BFL-ELISA acrescida de dois desvios-padrão, diferentemente do que foi utilizado no nosso estudo.

Em um outro trabalho de Sousa et al. (2000), quando o ponto de corte do ELISA foi determinado por análise com a mesma metodologia adotada nesse estudo (“software” TG-ROC), foram observados resultados um pouco menores de sensibilidade relativa (90,91%) e de especificidade relativa (91,18%) de um método de BFL-ELISA frente ao teste padrão HI, e ainda, o nível de acurácia entre os dois

testes foi de 91,02%, e os valores preditivos positivo e negativo foram de 93,02% e 88,57%, respectivamente. Não obstante, é válido ressaltar que os valores preditivos não são adequados índices para comparação de técnicas, pois dependem da prevalência da doença infecciosa.

**Tabela 1.** Comparação dos resultados obtidos nas técnicas de HI e BFL-Con A-ELISA para a detecção do VDN em soros de pombos domésticos e análises de validação do teste.

| **BFL-Con A-ELISA** | **HI** | | **Total** |
|---|---|---|---|
| | *Positivo* | *Negativo* | |
| *Positivo* | 11 | 4 | 15 |
| *Negativo* | 0 | 92 | 92 |
| **Total** | 11 | 96 | 107 |

Sensibilidade relativa = 11/11 x 100 = 100,0%; Especificidade relativa = 92/96 x 100 = 95,8%; Acurácia = (11 + 92)/107 x 100 = 96,3%; Valor Preditivo Positivo = 11/(11 + 4) x 100 = 73,3 %; Valor Preditivo Negativo = 92/(0 + 92) x 100 = 100,0%.

De qualquer sorte, pode-se antever a ocorrência de valor mais elevado de sensibilidade (100%) encontrado no estudo em tela ao se comparar o BFL-Con A-ELISA com o teste de HI, o que significa uma maior capacidade desse teste de ELISA em discriminar as aves infectadas das aves não-infectadas com o VDN. A maior sensibilidade do método BFL-ELISA com anticorpos monoclonais já havia sido relatada anteriormente na comparação com o teste de HI para a detecção de anticorpos anti-VDN em galinhas infectadas experimentalmente ou vacinadas com esse vírus (CZIFRA et al., 1996). Dessa forma, verifica-se que o método de BFL-Con A-ELISA aqui desenvolvido reproduz essa mesma característica, ao apresentar uma maior sensibilidade do que o teste de HI.

Por outro lado, deve-se considerar também que o máximo valor de sensibilidade (100%) encontrado para o BFL-Con A-ELISA provavelmente seja

decorrente do número reduzido de amostras séricas positivas que foram detectadas em ambos os testes empregados nesse estudo. Outro fator que pode ter contribuído para isso é a maior homogeneidade no grupo de pombos, uma vez que essas aves foram capturadas em uma mesma região e, portanto, podem de fato apresentar uma menor freqüência de aves positivas para o VDN (10,3%).

Por outro lado, verifica-se que essa frequência de positividade para o VDN entre aves de vida livre, em especial os pombos, foi quase duas vezes maior do que observado em um levantamento sorológico anteriormente realizado (SOUZA et al., 2010). Assim, foi encontrada uma taxa de 5,5% de pombos positivos para anticorpos contra o VDN pelo teste de HI em 109 amostras de soros de pombos capturados na mesma região que a do presente estudo (SOUZA et al., 2010), não obstante tenha que se considerar que a diferença observada (2x) entre essas soropositividades para o VDN, possa ter sido proporcionada pela menor sensibilidade do teste de HI em detectar anticorpos contra o VDN (CZIFRA et al., 1996).

Além disso, uma taxa de soroprevalência de 10% para o VDN foi observada para aves silvestres de diferentes espécies, incluindo pombos, capturadas na Suíça, sendo que os anticorpos anti-VDN foram detectados por um método de BFL-ELISA com anticorpo monoclonal (SCHELLING et al.,1999). No entanto, soroprevalência bem mais elevada (43,3%) foi encontrada em lotes de pombos vacinados ou não contra o VDN e mantidos em criações comerciais em Taiwan, China, através do uso do teste de HI (TSAI & LEE, 2006). Essa diferença marcante entre as taxas de soropositividade para o VDN em pombos provavelmente se deve ao fato de que 70% dos lotes de pombos amostrados no trabalho anterior serem vacinados rotineiramente contra o VDN, enquanto que no presente estudo, os pombos são de vida-livre e não vacinados contra esse vírus.

No presente estudo, foi encontrado um valor preditivo positivo moderado (73,3%) e um valor preditivo negativo bastante elevado (100%). Esses valores, provavelmente, foram decorrentes da menor prevalência da doença de Newcastle na população de pombos amostrados. Portanto, quanto menor for a prevalência da doença, menor será o valor preditivo do resultado positivo e maior o valor preditivo do resultado negativo. Outro fator, que também contribuiu para um elevado valor preditivo negativo, foi a sensibilidade de 100% encontrada, já que quanto maior valor

desta, maior será o valor preditivo negativo, isto é, maior será a probabilidade de, perante um resultado negativo, não haver doença (PEREIRA, 1995). De qualquer maneira, valores preditivos maiores, significam uma elevada probabilidade de que o teste de um determinado soro pelo ensaio de referência (HI) resultará em resultado semelhante ao encontrado pelo ensaio sob investigação (BFL-Con A-ELISA) (KOCH et al., 1998).

A especificidade (95,8%), encontrada para o BFL-Con A-ELISA é comparável com as observadas com outros métodos competivos de bloqueio de fase líquida do ELISA anteriormente desenvolvidos (CZIFRA et al., 1996, SOUSA et al., 2000). Essa elevada especificidade pode ser devido à utilização do reagente de captura, Con A e, especialmente, dos anticorpos detectores policlonais provenientes dos soros hiperimunes de galinha, os quais proporcionaram reatividades mais específicas com os principais antígenos do VDN nesse formato de reação imunoenzimática e, conseqüentemente, contribuíram para que fosse atingida esse maior valor de especificidade relativa.

Em suma, o BFL-Con A-ELISA desenvolvido no presente estudo demonstrou que a lectina Con A, quando adsorvida à superfície das cavidades das microplacas, é capaz de se ligar com antígenos do VDN presentes em suspensões não purificadas desse vírus, imobilizando-os nessa fase sólida e deixando livres os seus principais epítopos para reagir com os anticorpos detectores ou com os anticorpos anti-NDV específicos das amostras de soros teste. De fato, já havia sido descrita a capacidade da Con A capturar de forma eficiente o vírus da bronquite infecciosa (VBI) na superfície de cavidades de microplacas de ELISA, passo este que foi fundamental para o desenvolvimento de um outro método de ELISA, baseado no formato de sanduíche (S-ELISA-Con A). Esse método de S-ELISA-Con A foi usado de forma bem sucedida tanto para a detecção do VBI como de anticorpos anti-VBI específicos (BRONZONI et al., 2005). Adicionalmente, o soro de galinhas hiperimunizadas com suspensões não purificadas do VDN em líquido córion-alantóide que foi usado como anticorpo detector no BFL-Con A-ELISA pode ter contribuído também para promover uma elevada especificidade na interação com os antígenos do VDN previamente capturados na primeira fase desse ensaio sorológico. Essa inferência encontra respaldo nos resultados da análise de Western-

blotting que foi feita com esse mesmo soro hiperimune de galinhas, tendo sido evidenciado reações específicas dos anticorpos policlonais com as principais proteínas estruturais do VDN e ausência de reatividade com os componentes antigênicos do líquido córion-alantóide de ovos SPF. Todas essas propriedades dos reagentes desse método de ELISA permitiram uma determinação efetiva da competição pelos antígenos do VDN entre os anticorpos detectores e aqueles presentes nas amostras de soros teste de pombos, nesse formato de ELISA de bloqueio de fase líquida. Consequentemente foi possível se fazer uma determinação mais acurada dos níveis de anticorpos anti-VDN, calculado, nesse caso, como valores de PI.

### 5.6 Avaliação de combinações dos oligonucleotídeos iniciadores na Técnica de RT-PCR para a detecção do gene F do VDN

Todas as combinações de oligonucleotídeos por nós testadas se revelaram efetivas para gerar produtos amplificados na reação de PCR, ao utilizar amostra de referência positiva (estirpe LaSota do VDN). Na canaleta 2, está apresentado o resultado da PCR realizada com uma combinação dos oligonucleotídeos de sentido positivo FEP1 e de sentido negativo FEP2, que amplificou produtos com tamanho esperado de 1659 pb. Na canaleta 3, está o resultado da PCR com uma combinação de oligonucleotídeos de sentido positivo FIP1 e de sentido negativo FIP2, a qual gerou um produto amplificado com tamanho esperado de 196 pb. Na canaleta 4 está apresentado o produto amplificado quando foram usados os oligonucleotideos iniciadores, de sentido positivo FEP1 e de sentido negativo FIP2, sendo obtido um produto amplificado com um tamanho de 448 pb. Por fim, na canaleta 5, está demonstrado o resultado da amplificação quando a PCR foi realizada com os oligonucleotÍdeos iniciadores de sentido positivo FIP1 e de sentido negativo FEP2, tendo sido gerado um produto amplificado de 1406 pb (Figura 5).

No presente trabalho, foram escolhidos e testados para a primeira reação de PCR e para a reação de semi-nested-RT-PCR, respectivamente, os oligonucleotídeos de sentido positivo FEP1 e de sentido negativo FIP2, a qual gerou um primeiro produto amplificado de 448 pb, e os oligonucleotídeos de sentido positivo FIP1 e de sentido negativo FIP2, que amplificou um produto de 196 pb.

Essas combinações de oligonucleotídeos resultaram em amplificações de fragmentos menores do que as combinações anteriormente testadas, o que, em teoria, tornaria o teste mais sensível para a detecção do gene F do VDN.

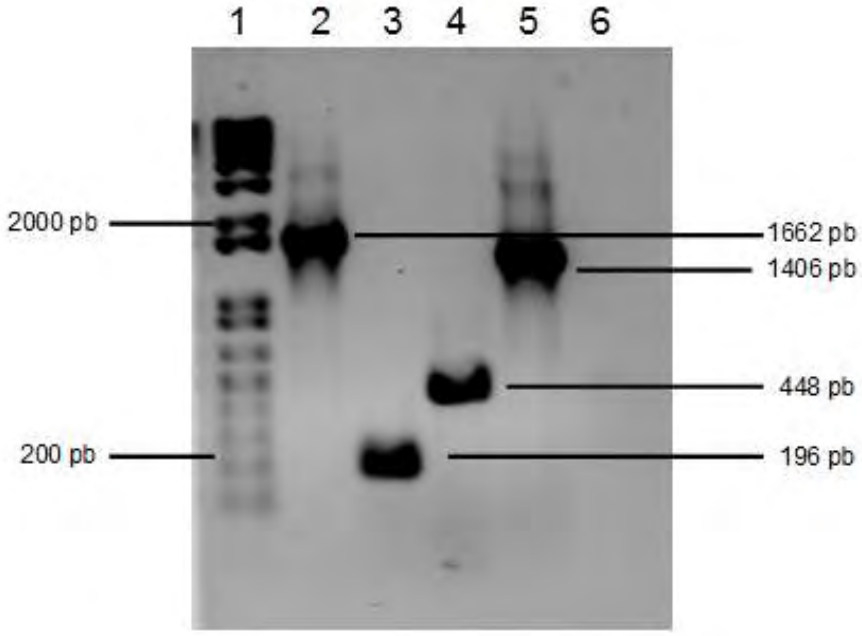


**Figura 5.** Resultados da avaliação de combinação de oligonucleotideos iniciadores técnica de PCR para amplificação de regiões do gene F do VDN, visualizados em gel de agarose (1% tampão TE). Canaleta 1, 8,6 µL do Marcador molecular 1Kb plus DNA Ladder (INVITROGEN). Canaleta 2, FEP1/ FEP2; Canaleta 3, FIP1/FIP2; Canaleta 4, FEP1/FIP2; Canaleta 5. FEP2/FIP1; Canaleta 6, controle negativo da reação.

### 5.7 Sensibilidade Analítica da Técnica de semi-nested-RT-PCR para a detecção do VDN

A técnica de RT-PCR, utilizando os oligonucleotídeos iniciadores FEP1 e FIP2, para a detecção do gene F do VDN em amostras de líquido córion-alantóide (LCA) infectado com a estirpe de referência LaSota do VDN foi capaz de amplificar o fragmento desejado, com um limiar de detecção efetivo até a sexta diluição ($10^{-6}$) do LCA (Figura 6). Já a técnica de semi-nested-RT-PCR, utilizando os oligonucleotídeos iniciadores FIP1 e FIP2, mostrou-se mais sensível e apresentou um limiar de detecção efetivo até a décima diluição ($10^{-10}$) (Figura 7), o que representa uma sensibilidade de 1000 vezes maior do que a PCR. Estudos anteriores demonstraram uma maior sensibilidade das técnicas de nested ou de

semi-nested-PCR sobre a técnica convencional de PCR para a deteção do VDN, embora tenha-se o inconveniente de aumentar o risco de contaminação da amostra (ALDOUS & ALEXANADER, 2001, KHO et al., 2000).

Zhang et al. (2010) desenvolveram uma semi-nested RT-PCR utilizando oligonucleotídeos para a amplificação de uma região do gene F abrangendo o sítio de clivagem da proteína F do VDN, e obtiveram uma sensibilidade de $10^{-3}$ para a primeira PCR e de $10^{-6}$ para a semi-nested RT-PCR. Já no estudo realizado por Kho et al. (2000) foi relatado uma sensibilidade até a diluição $10^{-4}$ para a PCR, e uma diluição de $10^{-6}$ para a nested- RT-PCR desenvolvida para a detecção do gene F do VDN. Esses dados confirmam a maior sensibilidade do semi-nested-PCR quando comparada com a PCR simples, tal como foi observado na técnica de semi-nested-RT-PCR desenvolvida no presente estudo. Entretanto, deve-se ressaltar que a capacidade de detecção do VDN em maiores diluições encontradas no estudo em tela quando comparado aos demais trabalhos citados acima, possivelmente foi decorrente do alto título do LCA infectado com a estirpe LaSota, em que na técnica de HA foi igual a 10 ($log_2$).

Ainda é necessário salientar que durante os experimentos nenhum dos testes ou suas repetições apresentaram amplificação dos controles negativos na técnica de semi-nested-RT-PCR, demonstrando-se que foram efetivos os cuidados com a manipulação do ácido nucléico das diferentes amostras, obtendo-se resultados positivos somente para o VDN.

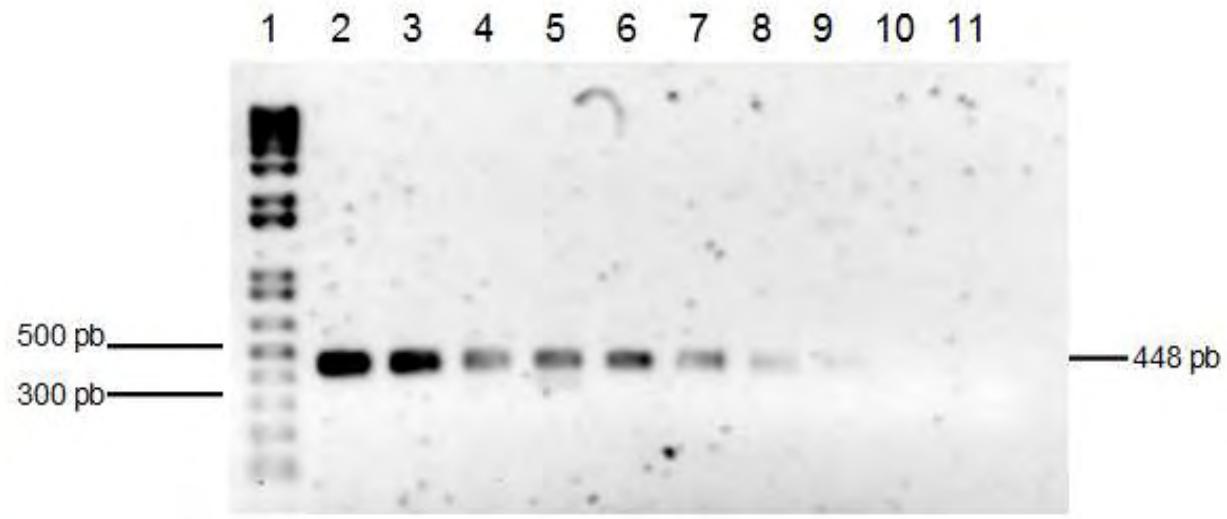


**Figura 6.** Visualização do eletroforograma em gel de agarose (1% tampão TE), de diferentes diluições da amostra padrão LaSota do VDN para a reação de PCR realizada com os oligonucleotideos iniciadores FEP1 e FIP2. Canaleta 1, 8,6 µL do Marcador molecular 1Kb plus DNA Ladder (INVITROGEN). Canaletas de 2 a 10, as diluições: 1:1, $10^{-1}$, $10^{-2}$, $10^{-3}$, $10^{-4}$, $10^{-5}$, $10^{-6}$, $10^{-7}$, $10^{-8}$. Canaleta 11, controle negativo da reação.

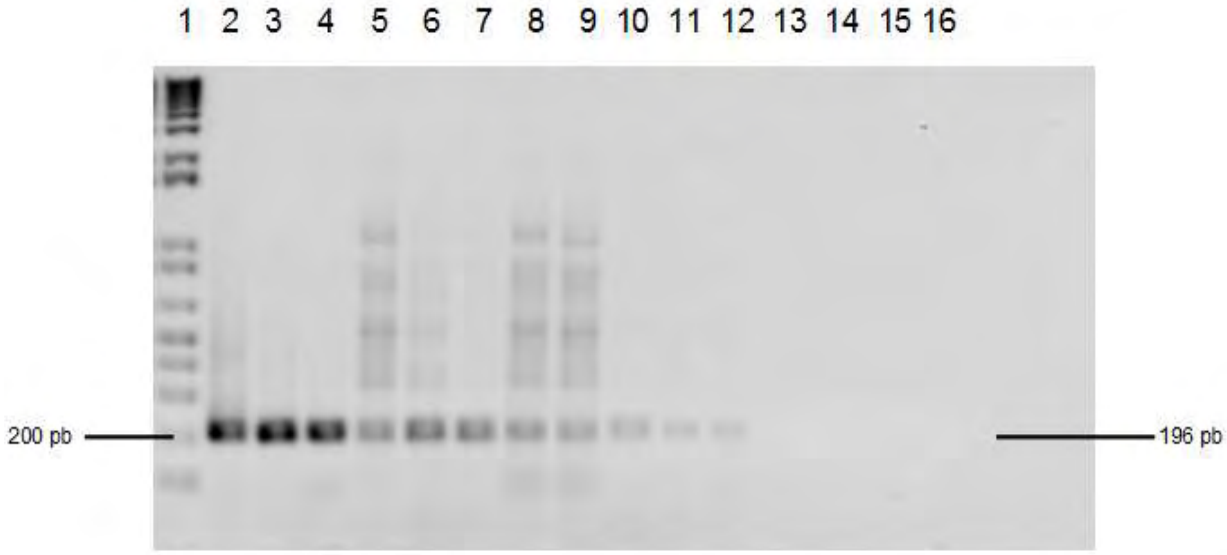


**Figura 7.** Visualização do eletroforograma em gel de agarose (1% tampão TE), de diferentes diluições da amostra padrão LaSota do VDN para a reação de semi-nested-RT-PCR realizada com os oligonucleotideos iniciadores FIP1 e FIP2. Canaleta 1, 8,6 µL do Marcador molecular 1Kb plus DNA Ladder (INVITROGEN). Canaletas de 2 a 14, as diluições: 1:1, $10^{-1}$, $10^{-2}$, $10^{-3}$, $10^{-4}$, $10^{-5}$, $10^{-6}$, $10^{-7}$, $10^{-8}$, $10^{-9}$, $10^{-10}$, $10^{-11}$, $10^{-12}$. Canaletas 15 e 16, controle negativo da reação.

### 5.8 Especificidade Analítica da Técnica de semi-nested-RT-PCR para a detecção do VDN

Na Figura 8, está apresentado o resultado do teste de especificidade da técnica de semi-nested-RT-PCR, utilizando-se os oligonucleotídeos FIP1 e FIP2. Verifica-se que houve amplificação do fragmento esperado de 196 pb do gene da proteína F apenas na amostra de referência estirpe LaSota do VDN e não houve amplificação desse mesmo fragmento em nenhuma das amostras de vírus heterólogos testadas: metapneumovírus aviário (estirpes 119/95-BR e PL), vírus da bronquite infecciosa (estirpe H-120), e vírus da doença de Gumboro (estirpe S-706). Analisando esse resultado, pode-se considerar que essa técnica foi específica para a detecção do VDN, o que indica que os oligonucleotídeos não se combinaram com seqüências do genoma dos vírus heterólogos testados, nem levaram à amplificação desses vírus. Nesse sentido, é correto supor que a seleção dos oligonucleotídeos aqui empregados foi apropriada, já que tais reagentes se constituem em parâmetro de fundamental importância para conferir especificidade e sensibilidade à técnica de semi-nested-RT-PCR. Para corroborar com essa inferência, Pham et al. (2005) que haviam definido a sequência de bases do par de iniciadores FIP1 e FIP2, obtiveram a mesma especificidade analítica encontrada nesse estudo, tanto na técnica de RT-PCR em tempo real, como de PCR convencional, sendo que esse mesmo conjunto de iniciadores foi usado por nós em combinação apropriada com um novo iniciador (FEP1) para o desenvolvimento dessa nova abordagem de diagnóstico molecular, isto é, a técnica de semi-nested-RT-PCR.

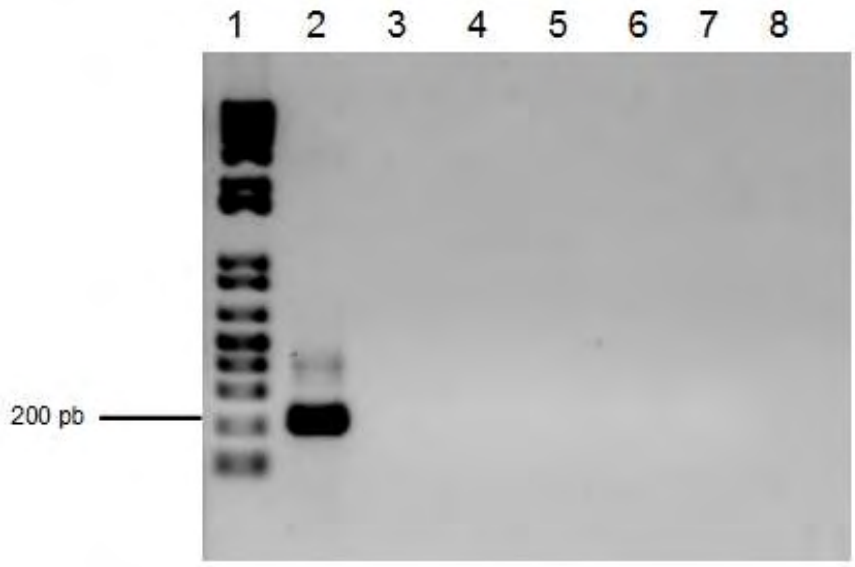


**Figura 8.** Visualização do eletroforograma em gel de agarose (1% tampão TE), do teste de especificidade da técnica de semi-nested-RT-PCR realizada com os oligonucleotideos iniciadores FIP1 e FIP2. Canaleta 1, 8,6 µL do Marcador molecular 1Kb plus DNA Ladder (INVITROGEN). Canaleta 2, amostra de referência estirpe LaSota do VDN, Canaleta 3, pneumovírus aviário (119/95-BR), Canaleta 4, vírus da bronquite infecciosa (H-120), Canaleta 5, gumboro (cepa S-706), Canaleta 6, pneumovírus aviário (cepa PL), Canaleta 7 e 8, controle negativo.

### 5.9 Aplicação da Técnica de semi-nested-RT-PCR para a detecção do VDN em amostras de pombos de vida-livre

Das 101 amostras de suabes cloacais colhidas de pombos de vida livre, nenhuma amostra se mostrou positiva para o VDN após a primeira PCR, realizada com os oligonucleotídeos externos (FEP1 e FIP2), enquanto que nove amostras apresentaram-se positivas, após a realização do semi-nested-RT-PCR, com os oligonucleotídeos internos (FIP1 e FIP2), a qual proporcionou a amplificação a partir dessas amostras de produtos com aproximadamente 196 pb (Figura 9). Este é o tamanho esperado para o produto amplificado do gene F do VDN, quando são usados os oligonucleotídeos iniciadores FIP1 e FIP2 (PHAM et al., 2005). Ademais, o fato de só terem sido detectadas amostras positivas na reação de semi-nested-RT-PCR sugere tanto que essas amostras são portadoras de concentrações mais reduzidas do VDN, como também que essa metodologia é detentora de um maior grau de sensibilidade, tal como era esperado (KHO et al., 2000, OKINO, 2007),

sobretudo quando ela é comparada com técnicas de PCR convencional. Essa maior sensibilidade por sua vez, pode ser relacionada aos oligonucleotídeos externos e internos que foram utilizados, os quais possivelmente tornaram a amplificação do gene alvo mais sensível (KHO et al. 2000, PHAM et al., 2005).

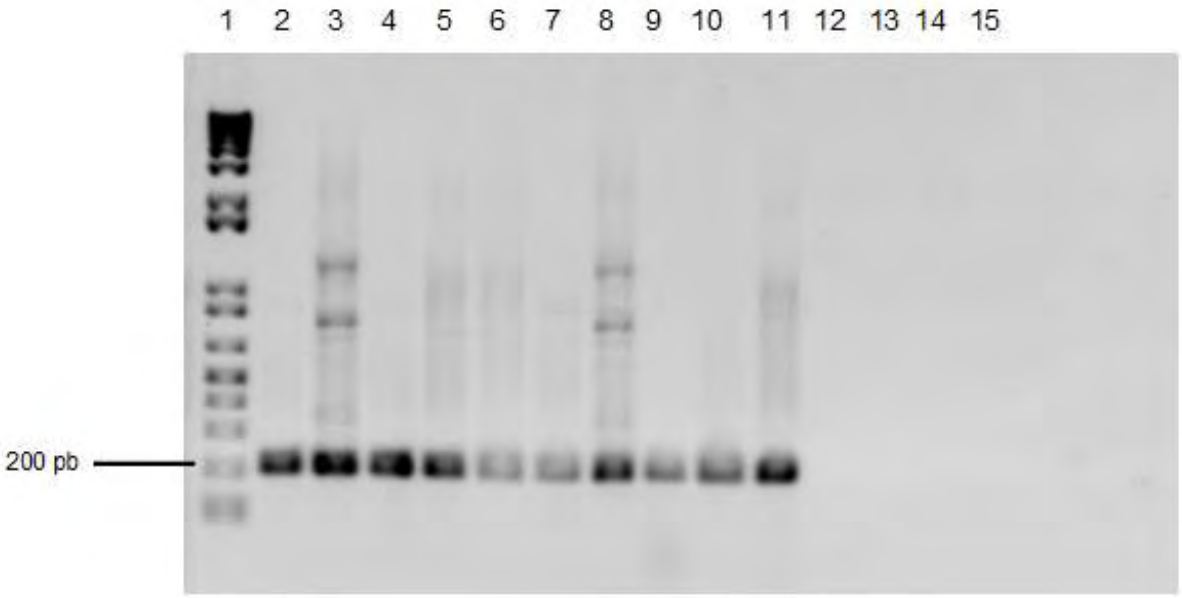


**Figura 9.** Visualização do eletroforograma em gel de agarose (1% tampão TE), das amostras positivas para a técnica de semi-nested-PCR. Canaleta 1, 8,6 µL do Marcador molecular 1Kb plus DNA Ladder (INVITROGEN). Canaletas 2 a 11, amostras positivas de pombos, Canaleta 12 e 13, controles negativos.

Desse modo, em 8,9% das aves analisadas pela reação de semi-nested-RT-PCR foram confirmadas a presença do VDN. Embora possam se tratar de condições epidemiológicas bem diversas para a infecção com o VDN, a freqüência de positividade encontrada no presente estudo é superior a encontrada por Boynukara et al. (2013), que utilizando a técnica de PCR em tempo real para o diagnóstico do VDN, constatou a presença desse vírus em 5,18% de um total de 540 aves, nas quais estavam inclusas 22 espécies selvagens e migratórias capturadas na Turquia. Uma porcentagem menor de aves positivas para o VDN foi também encontrada por Thomazelli et al. (2010), que constataram a presença do VDN em 2% de um total de 100 pinguins capturados na Antártida, e cujas amostras de suabes cloacais foram examinadas por meio da técnica de PCR em tempo real para o gene M do VDN.

No entanto, e em contraste a esses resultados da técnica de tempo real de RT-PCR, Tan et al. (2004) comprovaram a maior sensibilidade para a detecção do VDN na técnica de PCR em tempo real, e encontraram um limite de detecção de 10 pg de DNA para a técnica de PCR em tempo real, enquanto que para as técnicas nested-RT-PCR e de PCR convencional, esses limites foram de 1 e 10 ng de DNA, respectivamente.

Além disso, deve-se ressaltar que um resultado positivo na técnica de sorodiagnóstico é um sinal indicativo de que a ave teve contato prévio com o agente, seja ele de natureza patogênica ou vacinal, porém isso não é necessariamente indicativo da doença, particularmente em se tratando de pombos, espécie considerada resistente a determinadas estirpes de VDN (ALEXANDER, 1991; CARRASCO et al., 2008; STONE et al., 1989). Por sua vez, a presença de anticorpos anti-VDN em aves de vida livre também pode ser atribuída à exposição a estirpes vacinais lentogênicas, ou à recuperação de infecção ocasionada por uma estirpe mesogênica do VDN, ou ainda, a anticorpos de origem materna (PAREDE & YOUNG, 1990).

Muito provavelmente, os pombos utilizados no presente trabalho apresentavam um comportamento de vida que incluía um contato mais freqüente a locais onde se encontram aves de criação, como galinhas e frangos, que usualmente são submetidas a programas vacinais rotineiros contra o VDN, podendo inclusive ter relações diretas e/ou indiretas, como contato com fezes e utilização de mesmo comedouro ou bebedouro. Assim, a detecção de uma porcentagem relativamente maior do VDN em comparação a outros trabalhos citados na literatura utilizando aves de vida livre parece estar relacionada com a infecção dessas aves por estirpes vacinais lentogênicas do VDN. A elucidação disso poderá ser feita com o sequenciamento de nucleotídeos dos produtos amplificados do gene F que foram obtidos no presente estudo, seguido das análises filogenéticas apropriadas.

Silva et al. (2006) isolou VDN vacinal de passeriformes (tico-tico) capturados em fazendas comerciais de frangos de corte no estado de Pernambuco, bem como detectou anticorpos anti-VDN nestas mesmas espécies de aves, sugerindo que os tico-ticos tenham se infectado pela ingestão de partículas virais provenientes da água usada para vacinação desses criatórios. Da mesma forma que passeriformes

podem se infectar com linhagens vacinais do VDN, a recíproca pode ocorrer e, assim, os passeriformes podem levar o VDN, em circulação, para as criações de galinhas ou frangos de corte.

No Brasil, pesquisadores já relataram a presença do VDN, a qual foi detectada pela técnica de RT-PCR, em aves selvagens (DEMÉTRIO, 2002), sendo que, em um outro estudo, foi também observada a presença de anticorpos anti-VDN em galinhas domésticas não vacinadas (OLIVEIRA JR. et al., 2003). Por outro lado, em uma pesquisa realizada com amostras fecais de diversas espécies de psitaciformes e passeriformes, oriundos de animais silvestres apreendidos por tráfico em Itanhaém-SP, e utilizando a técnica de RT-PCR, não houve amplificação de material genético desse agente em nenhuma das amostras analisadas (SAIDENBERG et al., 2006). Ainda, uma outra investigação também relata o insucesso no isolamento do VDN a partir de amostras colhidas de aves de fauna nativa, tanto as de cativeiro como as de vida livre, incluindo, no caso, papagaios, cacatuas e periquitos, que conviviam com uma galinha com doença de Newcastle, e da qual foi isolada uma amostra de alta patogenicidade desse agente, sugerindo que essas espécies de aves silvestres eram refratárias à infecção pelo VDN (JOHNSON et al., 1986).

A propósito, Denadai et al. (2011) demonstrou experimentalmente que periquitos-australianos (*Melopsittacus undulatus*) não manifestaram sinais clínicos nem alterações patológicas quando desafiados com uma amostra do VDN patogênica para galinhas; contudo, essas aves infectaram-se, permaneceram no estado de portador e foram capazes de transmitir o vírus para galinhas SPF até 19 dias após a infecção experimental. Algumas outras espécies de aves também se apresentaram susceptíveis à infecção com estirpe do VDN virulenta para galinhas e, ao mesmo tempo, mostram-se refratárias à doença clínica após infecção com o VDN, como ocorre com as galinhas d' Angola (*Numida meleagridis*) (PAULILLO et al., 2005 a), perdizes (*Rhynchotus rufescens*) (PAULILLO et al., 2005 b), codornas (*Coturnix coturnix japonica*) (LIMA et al., 2004), pombos (CARRASCO, 2008) e patos (*Anas platyrhynchos*) (FRANZO et al., 2004). Todos esses dados da literatura servem para realçar a importância das aves de vida livre como potencial reservatório

da infecção de VDN para aves domésticas e de criações industriais, como galinhas e frangos.

### 5.10 Comparação dos resultados obtidos nas técnicas BFL-Con A-ELISA, HI e semi-nested-RT-PCR para o diagnóstico da infecção pelo VDN

Na análise comparativa entre os resultados obtidos no HI, BFL-Con A-ELISA e semi-nested-RT-PCR para o diagnóstico da infecção pelo VDN, foram verificados que de 101 amostras de pombos analisadas por essas técnicas, três aves foram positivas para anticorpos anti-VDN no teste de HI, seis aves foram positivas para anticorpos anti-VDN no teste de BFL-Con A-ELISA e nove aves foram positivas na técnica de semi-nested-RT-PCR (Tabela 2). A partir desses dados foram determinadas a sensibilidade e a especificidade relativas da técnica de semi-nested-RT-PCR frente aos testes de HI e de BFL-Con A-ELISA. Nesse sentido, quando o teste de HI foi utilizado como referência, o semi-nested-RT-PCR apresentou sensibilidade relativa de 100% e especificidade relativa de 93,9%; já, quando o BFL-Con A-ELISA foi utilizado como referência, a sensibilidade relativa foi de 100%, e a especificidade relativa de 96,8% (Tabela 3).

**Tabela 2.** Comparação dos resultados obtidos nas técnicas de BFL-Con A-ELISA, HI e semi-nested-RT-PCR para a detecção do VDN em 101 amostras de pombos.

| | Semi-nested-RT-PCR | | HI | |
|---|---|---|---|---|
| | *Positivos* | *Negativos* | *Positivos* | *Negativos* |
| BFL-Con A-ELISA | | | | |
| *Positivos* | 6 | 0 | 3 | 3 |
| *Negativos* | 3 | 92 | 0 | 95 |
| HI | | | | |
| *Positivos* | 3 | 0 | | |
| *Negativos* | 6 | 92 | | |

**Tabela 3.** Sensibilidade relativa e especificidade relativa do teste de semi-nested-RT-PCR comparado com os testes de HI e BFL-Con A-ELISA.

| | Semi-nested-RT-PCR comparado com HI | Semi-nested-RT-PCR comparado com BFL-Con A-ELISA |
|---|---|---|
| Sensibilidade (%) | 100 | 100 |
| Especificidade (%) | 93,9 | 96,8 |

De fato, as técnicas sorológicas aplicadas no presente trabalho apresentaram uma menor sensibilidade para detectar a infecção pelo VDN, quando comparadas com a técnica de semi-nested-RT-PCR, o que, em princípio era esperado, pois, via de regra, as técnicas de biologia molecular têm apresentado uma sensibilidade maior do que as técnicas sorológicas, quando esses procedimentos são usados para o diagnóstico de diferentes tipos de agentes infecciosos (MARTINS et al., 2000). Nesse sentido, os métodos moleculares apresentam uma sensibilidade que pode ser de 100 a 1000 vezes superior a dos métodos sorológicos de detecção viral (MARTINS et al., 2000). Tal característica apresentada é um dos grandes diferenciais das técnicas moleculares, já que amostras contendo agentes que perderam a infectividade, ainda podem ser detectadas por essas técnicas, sobretudo pelo método de semi-nested-RT-PCR (CARRASCO et al., 2008; KHO et al., 2000). No entanto, devido à alta sensibilidade, várias medidas e cuidados necessitam ser adotados durante o processamento das amostras por tal metodologia, a fim de se evitar a contaminação cruzada com os fragmentos de DNA amplificados e re-amplificados e, por conseguinte, a geração de resultados falso-positivos (KHO et al., 2000; OIE, 2012).

Nesse mesmo contexto, foi relatado na literatura que o RT-PCR duplex para o VDN apresentou maior sensibilidade que o HI, sendo um teste eficiente no monitoramento do vírus em aves migratórias e silvestres (SOARES, 2002). Já em uma pesquisa realizada com amostras de soros de irerês (*Dendrocygna viduata*), utilizando a técnica de HI, foi detectada a presença de anticorpo contra o VDN em

85,7% das amostras. No entanto, a pesquisa de genoma viral por RT-PCR não revelou a presença do agente nas amostras de suabes traqueais ou cloacais nessa mesma espécie de aves (DEMÉTRIO, 2002). De qualquer forma, apesar de o HI ser considerado como teste oficial de detecção da DN, as técnicas de ELISA e de biologia molecular vêm sendo mais utilizadas, devido a sua maior especificidade e sensibilidade e até mesmo praticidade (WILLIANS et al., 1997; VIANNA et al., 2000).

Outro fator que pode ter contribuído para a detecção de um maior número de aves positivas no semi-nested-RT-PCR é o fato de que a máxima eliminação viral através das fezes ocorre nos primeiros dias da infecção com o VDN e a produção de anticorpos circulantes detectáveis aumenta em um prazo mais prolongado. Desta forma, foi possível detectar nos pombos, genoma viral em amostras de suabes cloacais, mesmo na ausência de anticorpos detectáveis pela técnica de HI e BFL-Con A-ELISA. Esses dados são comprovados por Carrasco et al. (2008) que realizaram uma infecção experimental em pombos domésticos, e observaram que, após 21 dias da infecção, todas as aves desenvolveram anticorpos anti-VDN detectáveis pelo teste de HI, e que a eliminação viral ocorreu logo no 5º dia da infecção, persistindo até 24º dia pós-infecção, sem apresentar sinais clínicos. O pico de eliminação viral, observado por esses autores, ocorreu entre o 11º e 13º dia da infecção, período em que foi possível detectar pela técnica de RT-PCR convencional para amplificação de uma região do gene F, a presença do genoma do VDN nas amostras de suabes cloacais de todos os pombos.

De qualquer forma, para efeito de diagnóstico do VDN, apenas os resultados da sorologia não são suficientes, devendo ser acompanhados pela aplicação de outras técnicas de diagnóstico direto desse agente, como as de biologia molecular para verificar a presença do material genético do agente etiológico. Ademais, alguns estudos demonstram que mesmo com o uso de técnicas de biologia molecular podem ocorrer falhas, tendo em vista que a eliminação do VDN é intermitente.

Diante de todo o exposto acima, nenhuma técnica alcança, na realidade, uma plena eficiência de diagnóstico para um dado agente infeccioso, sendo que os possíveis fatores que mais estão envolvidos na manutenção do agente em uma população são: presença de aves portadoras; introdução de aves susceptíveis;

multiplicidade de espécies aviárias (aves comerciais x aves de vida livre) e heterogenicidade de estirpes do VDN (AWAN et al., 1994).

Concluindo, deve ser ressaltado que tanto o teste de BFL-Con A-ELISA e a técnica de semi-nested-RT-PCR, desenvolvidos e aplicados no presente estudo, revelaram-se capazes de detectar a infecção pelo VDN em pombos de vida-livre e podem ser usados separadamente, ou idealmente em conjunto, ou ainda associados com os métodos tradicionais de diagnóstico laboratorial do VDN (HI, isolamento do VDN em ovos embrionados, inoculação em pintos SPF para avaliar a patogenicidade dos isolados do VDN). Além disso, a técnica de semi-nested-RT-PCR apresenta uma vantagem adicional de possibilitar que o produto gênico amplificado (região codificadora do sítio de clivagem da proteína F do VDN) possa ter os seus nucleotídeos seqüenciados, permitindo ao acesso a uma informação extra, ou seja, de determinar a seqüência deduzida de aminoácidos desse local e levantar inferências sobre o potencial de patogenicidade da estirpe do VDN que está causando esse processo infeccioso na ave da qual foi obtida a amostra para ser analisada (ALDOUS & ALEXANDER, 2001; KE et al., 2001; YU et al., 2001).

## 6. CONCLUSÕES

Em face dos resultados encontrados no presente estudo e por todo o exposto no item Discussão, pode-se concluir que:

**6.1** A técnica de BFL-Con A-ELISA desenvolvida e aplicada nesse estudo foi capaz de detectar e mensurar com eficiência anticorpos contra o vírus da doença de Newcastle em soros de pombos, o que ficou caracterizado pelos elevados níveis de sensibilidade, especificidade, acurácia e concordância em relação ao teste padrão de HI, caracterizando, dessa forma, o grande potencial de aplicação desse método de ELISA no imunodiagnóstico da infecção pelo VDN em pombos e em outras espécies de aves de vida-livre.

**6.2** A reação de semi-nested-RT-PCR desenvolvida nesse trabalho mostrou-se bastante eficiente na detecção da região codificadora do sítio de clivagem da proteína F do VDN, tanto em amostras de líquido córion-alantóide como de suabes cloacais de pombos, o que é respaldado pelas suas elevadas sensibilidade e especificidade, o que indica o potencial para ser aplicada no diagnóstico direto do VDN em diferentes tipos de amostras biológicas.

**6.3** A comparação entre as técnicas HI, BFL-Con A-ELISA e semi-nested-RT-PCR, revelou que essa última foi mais sensível para a detecção da infecção pelo VDN em amostras colhidas de pombos de vida-livre, podendo ser utilizada com vantagens, associada ou não a esses métodos sorológicos, no diagnóstico laboratorial desse patógeno viral.

## REFERENCIAS

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

ALEXANDER, D.J.; RUSSELL, P.H.; PARSONS, G.; ELZEIN, E.M.; BALLOUH, A.; CERNIK, K.; ENGSTROM, B.; FEVEREIRO, M.; FLEURY, H.J.; GUITTET, M.; KALETA, E.F.; KIHM, U.; KOSTERS, J.; LOMNICZI, B.; MEISTER, J.; MEULEMANS G.; NEROME, K.; PETEK, M.; POKOMUNSKI S, POLTEN, B., PRIP, M.; RICHTER R; SAGHY, E.; SAMBERG, Y.; SPANOGHE, L.; TUMOVA, B. Antigenic and biological characterization of avian paramyxovirus type 1 isolates from pigeons—an international collaborative study. **Avian Pathology,** v.14, p.365–376, 1985.

ALEXANDER, D. J. Newcastle disease. In: PURCHASE, H. G.; ARP, L. H.; DOMERMUTH, C. H.; PEARSON, J. E., eds. **A laboratory manual for the isolation and identification of avian pathogens**. 3.ed. Kennet Square, PA: American Association of Avian Pathologists. p.114-20, 1989.

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

ALEXANDER, D.J. Newcastle disease and other paramyxovirus infections. In: **Diseases of Poultry.** 10th ed. Ames: Iowa State University Press, p. 541-569, 1997.

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

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

ALEXANDER, D.J. **Thecnology Review: Newcastle Disease**. Roma, FAO. p161, 2004.

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

AL-GARIB, S.O.; GRUYS, E.; GIELKENS, A.L.; KOCH, G. Detection of antibody-forming cells directed against Newcastle disease virus and their immunoglobulin class by double immunoezime histochemistry. **Avian Diseases**, v.47, n.2, p.453-457, 2003.

ALLAN, W.H.; LANCASTER, J.E.; TOTH, B. Newcastle Disease Vaccine. **Food and Agriculture Organization on the United Nation**. Rome, Italy, 1978.

ARAÚJO, F. A. A.; VIANNA, R.S.T.; WADA, M.Y.; SILVA, E.V.; DORETTO, L.; CAVALCANTE, G.C. Inquérito sorológico em aves migratórias and residentes de Galinhos/RN para detecção do vírus da Febre do Nilo Ocidental and outros vírus. **Boletim Eletrônico Epidemiológico** 2004. Disponível em: http://portal.saude.gov.br/ portal/arquivos/pdf/ Boletim_eletronico_02_ano04.pdf Acesso em dezembro de 2012.

ARNS, C. W.; SPILKI, F.; ALMEIDA, R. S.; DEZENGRINI, R. Paramyxoviridae. In: FLORES, E. F. **Virologia Veterinária**. Santa Maria, Ed UFSM, p 659-687, 2007.

AWAN, M.A.; OTTE, M.J.; JAMES, A.D. The epidemiology of Newcastle disease in rural poultry: a review. **Avian Pathology**, v.23, p.405-423, 1994.

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

BARBEZANGE, C.; JESTIN, V. Development of a RT nested-PCR test detecting pigeon Paramyxovirus-1 directly from organs of infected animals. **Journal of Virological Methods**, v.106, p.197-207, 2002.

BEARD, C. W. Velogenic Newcastle disease. **USDA, ARS, Southeast Poultry Research Laboratory.** Athens, GA. 2008. Disponível em http:www.vet.uga.edu/VPP gray book 02/fod/vnd.php Acesso em janeiro de 2013.

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

BOX, P.G.; HOLMES, H.C.; WEBB, K.J. Significance of antibody to avian paramyxovirus 3 in chickens. **The Veterinary Record**, p.122-423, 1988.

BOYNUKARA, B.; GÜLHAN, T.; ÇÖVEN, F.; KİZİROGLU, I, DURMUS, A. Determination of Newcastle disease vírus among wild bird populations in Lake Van basin, Turkey. **Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences**, v.37, 2013.

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 Outubro de 2012.

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

BRONZONI, R.V.M.; MONTASSIER, M.F.S.; PEREIRA, G.T.; GAMA, N.M.S.Q.; SAKAI, V; MONTASSIER, H.J. Detection of infectious bronchitis virus and specific anti- viral antibodies using a Concanavalin A-Sandwich-ELISA. **Viral Immunololy,** v. 18, p. 569-578, 2005.

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

CADMAN, H. F.; KELLY, P.J.; DE ANGELIS, N.D.; ROHDE, C.; COLLINS, N.; ZULU, T. Comparison of enzyme-linked immunosorbent assay and hemagglutination inhibition test for the detection of antibodies against Newcastle disease virus in ostriches (*Struthio camelus*). **Avian Pathology,** v.26, p.357-363, 1997

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

CARDOSO, A. O. T.; SOUSA, R.L.M., OLIVEIRA, C.; STRINGHINI, G.; PINTO, A. A. A liquid phase blocking ELISA for the detection of antibodies against infectious bronchitis virus. **Brazilian Journal of Medical Biology Research**, v.32, p.747–752, 1999.

CARRASCO, A. O. T.; SEKI, M.C.; FREITAS, T. R.; PAULILLO, A.C., PINTO, A.A. Experimental infection of Newcastle Disease virus in pigeons (*Columba livia*):

Humoral antibody response, contact transmission and viral genome shedding. **Veterinary Microbiology**, v.129, p.89-96, 2008.

CARRASCO, A. O. T.; SEKI, M.C.; SOUSA, R.L.M.; RASO, T.F.; PINTO, A.A. Protection levels of vaccinated pigeons *(Columbia Lívia)* against a highly pathogenic Newcastle disease virus estrain. **Tropical Animal Health Production**, v. 41, p.1325-1333, 2009.

CAVANAGH, D. Innovation and discovery: the application of nucleic acid-based technology to avian virus detection and characterization. **Avian Pathology**, v.30, p.581-598, 2001.

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

COLLINS, M.S.; BASHIRUDDIN, J.B.; ALEXANDER, D.J. Deduced amino acid sequences at the fusion protein cleavage site of Newcastle disease viruses showing variation in antigenicity and pathogenicity. **Archives Virolology**, v.128, p.363–370, 2003.

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

COUCEIRO, J. N.; MACHADO, R.D.; COUCEIRO, E.S. Prevalência do vírus da doença de Newcastle em uma comunidade de aves ornamentais. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro. v.10, p.31-33, 1990.

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, p. 493–499, 2002.

CROSS, G. M. Newcastle disease. In: ROSSKOPF JR., W. J & WOERPEL, R. W. The veterinary clinics of north America. **Pet Avian Medicine**. v. 21, n. 6, p. 1231-1239, 1991.

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

CVELIC-CABRILO, V.; MAZIJA, H.; BIDIN, Z.; RAGLAND, W.L. CORRELATION of hemagglutination inhibition and enzyme-linked immunosorbent assays for antibodies to Newcastle disease virus. **Avian Pathology**, v. 21, 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, 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, p. 526-565, 1998.

DEGEFA, T.; DADI, L.; YAMI, A.; GMARIAM, K.; NASSIR, M. Techinical and economic evaluation of different methods of Newcastle disease vaccine administration. **Journal Veterinary Medical**, v.51, p.365-369, 2004.

DENADAI, J.; PAULILLO, A.C.; MARTINS, G.R.V.; SCHIMIDT, E.M.S.; CARRASCO, A.T. Relevance of budgerigars (*Melopsittacus undulatus*) in experimental epidemiology of Newcastle disease. **International Journal of Poultry Science.** v.9, p.691-693, 2011.

DEMÉTRIO, C. Levantamento sorológico e pesquisa do vírus da doença de Newcastle em irerês migratórios, *Dendrocygna viduata* (Anseriformes: Anatidae), na cidade de São Paulo, Brasil. Dissertação (Mestrado em Ciências Biomédicas-Microbiologia) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2002.

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

DORETTO JR., L.; ORSI, M.A.; GALLETTI, M.C.M. Isolamento do vírus da DN em flamingo (Phoenicopterus ruber) importado pelo Brasil. **Brazilian Journal of Poultry Science**, p.86, 1999.

DOYLE, T.M. Newcastle disease of fowls. **Journal of Comparative Pathology,** v..48, p 1-20, 1935.

DUPIN, N.; BUFFET, M.; MARCELIN, A.G.; LAMOTTE, C.; GORIN, I.; AIT-ARKOUB, Z., TRÉLUYER, J.M.; BUI, P.; CALVEZ, V.; PEYTAVIN, G. HIV and antiretroviral drug distribution in plasma and fat tissue of HIV- infected patients with lipodystrophy. **AIDS**, v. 16, n. 18, p. 2419-2424, 2002.

ENGVALL, E.; PERLMANN, P. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G. **Immunochemistry**, v.8, p.871-4, 1972.

ESTERHUYSEN, J. J.; PREHAUD, C.; THOMSON, G.R. A liquid-phase blocking ELISA for detection of antibodies to rabies virus. **Journal Virologycal Methods**, v.51, p.31-42, 1995.

FANSON, B.G.; OSMACK, P.; DI BISCEGLIE, A.M. A comparison between the phenol-chloroform method of RNA extraction and the QIAamp viral RNA kit in the extraction of hepatitis C and GB virus-C/hepatitis G viral RNA from serum. **Journal Virologycal Methods**, v.89, p.23-27, 2000.

FRANZO, V. S.; GAMA, N. M. S. Q.; SILVA, P. L.; ARTONI, S.M.B.; AMOROSO, L.; PAULILLO, A. C. Importância dos patos (*Anas platyrinchus*) na epidemiologia experimental da doença de Newcastle. **Brazilian Journal of Poultry Science**, Suplemento 6, p. 190, 2004.

GHUMMAN, J.S.; WIGGINS, A.D., BANKOWSKI, R.A. Antibody response and resistence of turkeys to Newcastle disease vaccine strain LaSota. **Avian Disease**, v.20, n.1, p.1-8, 1976.

GILLIAN, G. Envelope glycoproteins of HIV-1, HIV-2 and SIV purified with Galanthus nivalis agglutinin induce strong immune response. **AIDS Reseach Human Retrovirol**, v.9, p.431-438, 1993.

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, p. 143-152, 2000.

GREINER, M; SOHR. D.; GÖBEL, 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**, v.185, p.123-132, 1995.

GROVES, D.J.; MORRIS, B.A. Veterinary sources of nonrodent monoclonal antibodies: interspecific and intraspecific hybridomas. **Hybridoma**, v. 19, n. 3, p. 201-214, 2000.

HERNÁNDEZ, M. S. Pesquisa serologica sobrre el vírus de la enfermedad de Newcastle em obreros avícolas y um grupo control. **Revista Cubana de Higiene e Epidemiologia,** v.25, n.1, p. 77-84, 1987.

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,** v.78, n.8, p.4176-4184, 2004.

ICTV – The International Committee on Taxonomy of viruses. Disponível em: <**http://www.ncbi.nim.nih.gov/ICTV/**>. Acesso em janeiro de 2012.

ITO, M.N.K.; Prestes, A.A.; Niciporciukas, M.C. Newcastle disease vírus: some biological characteristcs of twelves samples isolated in Brazil. **Revista da Faculdade Medicina Veterinária e Zootecnia,** USP. v.23, n. 1,p. 47-53, 1986.

JACKWOOD, M. W.; KWON, H.M.; HILT, D.A. Infectious bronchitis virus detection in allantoic fluid using the polymerase chain reaction and a DNA probe. **Avian Diseases**, Kennett Square, v.36, n.2, p.403-409, 1992.

JEON, W.; LEE, E.K.; LEE, Y.J.; JEONG, O.; KIM, Y.J.; KWON, J.H.; CHOI, K.S Protective efficacy of commercial inactivated Newcastle disease virus vaccines in chickens against a recent Korean epizootic strain. **Journal Veterinary Science**, v.9, n.3, p.295-300, 2008.

JESTIN, V.; JESTIN, A. Detection of Newcastle Disease Virus of RNA in infected allantoic fluids by in vitro enzymatic amplification (PCR). **Archives of Virology,** v.118, p.151-161, 1991.

JOHNSON, D. D.; Couvillion, C.E.; Pearson, J.E. Failure to demonstrate viscerotropic Newcastle disease in psittacine birds in the Republic of the Philippines. **Avian Diseases**, v. 30, n. 4, p. 813-815, 1986.

JORGE, M. A. 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.

JULY, J. R.; PANETTA, J. C.; BOTTINO, J. A. **Atualização em Avicultura e Ornitopatologia**. São Paulo. p.121-127, 1971.

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

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

KAPCZYNSKI, D.R.; WISE, M.G.; KING, D.J. Susceptibility and protection of naïve and vaccinated racing pigeons (*Columba livia*) against exotic Newcastle disease virus from California 2002-2003 outbreak. **Avian Diseases,** v.50, n.336, p.336-341, 2006.

KE, G.M.; LIU, H.J.; LIN, M.Y.; CHEN, J.H.; TSAI, S.S.; CHANG, P.C. Molecular characterization of Newcastle disease viruses isolated from recent outbreaks in Taiwan. **Journal of Virological Methods**, v.97, p.1-11, 2001.

KOTHLOW, S.; HÄUSLAIGNER, R.; KASPERSA, B.; GRUNDBC, C. Evaluation of Newcastle disease virus immunoassays for waterfowl using a monoclonal antibody specific for the duck immunoglobulin light chain. **Avian Pathology**, v. 37, p. 323-328, 2008.

KHO, C.L.; MOHD-AZMI, M.L.; ARSHAD, S.S.; YUSOFF, K. Performance of an RT nested-PCR ELISA for detection of Newcastle disease virus. **Journal of Virological Methods**, v.86, p.71-83, 2000.

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 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**, v.143, p.10-12,1998.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during assembly of the head of $T_4$ bacteriophage. **Nature**, v. 227, p. 680-681, 1970.

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

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

LEE, J.; SUNG, H.W.; CHOI, J.G.; LEE, E.K.; YOON, H.; KIM, J.H.; SONG, C.S. Protection of chickens from Newcastle disease with a recombination baculovirus subunit vaccine expressing the fusion and hemaggutinin-neuraminidase proteins. **Journal of Veterinary Science,** v.9, n.3, p.301-308, 2008.

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

LEEUW, O. S.; KOCH, G.; PEETERS, B.; HARTOG, L.; RAVENSHORST, N. Virulence of newcastle disease virus is determined by the clivage site of the fusion protein and by both stem region and globular head of the hemagglutinin-neuraminidase protein**. Journal General Virology**, v. 86, p. 1759-1769, 2005.

LEGAY, V.; SAILLEAU, C.; DAUPHIN, G.; ZIENTARA, S. Construction of an internal standard used in RT nested PCR for Borna Disease virus RNA detection in biological samples. **Veterinary Research**. v.31, p.565-572, 2000.

LIMA, F. S.; SANTIN, E.; PAULILLO, A.C.; DORETTO JR, L.; MORAES, V.M.B.; SCHOCKEN – ITURRINO, R.B. Japanese quail (*Coturnix coturnix japonica*) as Newcastle disease vírus carrier. **Internacional Journal of Poultry Science**, v. 3, n. 7, p. 483-484. 2004.

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

MARTINS, L.C.; PASCHOAL, I.A.; VON NOWAKONSKI, A.; SILVA, S.A.; COSTA, F.F.; WARD, L.S. Nested-PCR using MPB64 fragment improves the diagnosis of pleural and meningeal tuberculosis. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical,** v.33, p. 253-257, 2000.

MAYO, M.A. Virus taxonomy. **Archives of Virology**, v.147, p.1071–1076, 2002.

MCFERRAN, J.B. Control of Newcastle disease in Northern Ireland. Proceedings – Avian Exotic Disease Control Seminar. **Animal Health Report 2 NSW Agriculture & Fisheries**, Glenfield, NSW, Australia. p.16-21,1989.

MCMILLIAN, B.C.; REHMANI, S.F.; HANSON, R.P. Lectin Binding and the carbohydrate moieties present on Newcastle virus strains. **Avian Diseases**, v.30, p.340-344, 1985.

MONNE, I.; BEATO, M.S.; CAPUA, I.; MANDOLA, M.L. Pigeon paramyxovirus isolated from a robin in Italy. **The Veterinary Record,** v.18, p.384, 2006.

NISHIZAWA, M.; PAULILLO, A.C.; NAKAGHI, L.S.O.; NUNES, A.D.; CAMPIONI, J.M.; DORETTO JR, L. Newcastle disease in pekin ducks : response to experimental vaccination and challenge. **Brazilian Journal of Poultry Science,** v.09, 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 Veterinaria e Zootecnia**, v.54, 2002.

OFFICE INTERNATIONAL EPIZOOTIES DISEASE INFORMATION. (OIE). Newcastle Disease, In: Manual of standarts for diagnostic tests and vaccines. 2008. Disponível em: http://www.oie.int/eng/info/hebdo/AIS_59.HTM #Sec8 Acesso em dezembro de 2012.

OKINO, C.H. Desenvolvimento da técnica de RT-PCR em tempo real para detecção e diferenciação de estirpes do vírus da Bronquite Infecciosa das Galinhas.

Jaboticabal, 2007. Dissertação de mestrado - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias do Campus de Jaboticabal – UNESP, Jaboticabal, 2007.

OLIVEIRA JR, J.G.; PORTZ, C; LOUREIRO, B.O; SCHIAVO, P.A.; FEDULLO, L.P.L.; MAZUR, 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, 2003.

OLIVEIRA JR, J.G.; SCHIAVOII, P.A.; DORETTO JR, L.; ORSI, M.A.; MAZUR, 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, 2005.

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

OHTA, M.; KAWASU, S.; TSUJI, N. Rapid and sensitive method for detection of newly isolated *Babesia* parasite (*Babesia* spp.) in the antecipated vector-tick using the polymerase reaction technique. **Journal of Protozoology**, v. 5, p.108-117, 1995.

PANIGRAHY, B.; SENNE, D.A.; PEARSON, J.E.; MIXSON, M.A.; CASSIDY, D.R. Occurrence of velogenic viscerotropic Newcastle disease in pet and exotic birds in 1991. **Avian Diseases,** v.37, p.254-258, 1993.

PANSHIN, A.; SHIHMANTER, E.; WEISMAN, Y.; ORVELL, C.; LIPKIND, M. Antigenic heterogeneity amongst the field isolates of Newcastle Disease Virus (NDV) in relation to the vaccine strain. Part II: studies on viruses isolated from domestic birds in Israel. Comparative Immunology, **Microbiology and infectious Diseases**. v. 25, p.173-85, 2002.

PAULILLO, A.C.; JÚNIOR, L.D. Doença de Newcastle. In: BERCHIERI JUNIOR, A.; MACARI, M. (Eds.). **Doenças das aves**. Campinas: FACTA. p.267-276, 2009.

PAREDE, L.; YOUNG, P. L. The pathogenesis of Velogenic Newcastle Disease Virus infection of chickens of different ages and different levels of immunity. **Avian Diseases**, v.34, p.803-808, 1990.

PARKER, N.; MAKIN, C. A.; CHING ,C. K.; ECCLESTON, D.; TAYLOR, O. M.; MILTON, J. D.; RHODES, J. M. A new enzyme-linked lectin/mucin antibody sandwich assay (CAM 17.1/WGA) assessed in combination with CAM 19-9 and peanut lectin binding assay for the diagnosis of pancreatic cancer. **Câncer,** v.70. p.1062-1068, 1992.

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

PERALES, C. Monitoring sequence space as test for the target of selection viruses. **Journal of Molecular Biology**, v. 345, p. 451-459, 2005.

PEREIRA, M. G. Epidemiologia: teoria e prática. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A., Cap. 17: Aferição dos eventos, p.358-375, 1995.

PERSING, D. In vitro nucleic amplification techniques. In: Diagnostic molecular microbiology-principles and applications. Washington: Library of Congress in Publication Data. Cap. 3, p.51-87, 1993.

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. **Archives of Virology**, Austria, v. 149, 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, p. 1646-1650, 2005.

PHILLIPS, J.M. Vaccination against Newcastle disease: na assessment of haemagglutination inhibition titres obtained from field samples. **Veterinary Record** v.93, p.577-83, 1973.

REBOUÇAS, N.A. Biologia molecular aplicada à medicina: fundmentos teóricos e práticos, 1 Ed., São Paulo: Universidade de São Paulo, p.66, 2001.

REED, L.J; MUENCH, A. A simple method of estimating fifty per cent end points. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 27, p.7-193, 1938.

REHMANI, S.F. Newcastle disease vaccination: A comparasion of vaccines and routes of administration in Pakistan. **Preventive Veterinary Medicine,** v.25, p.241-248, 1996.

REYNOLDS, D.L.; MARAQA, A.D. Protective immunity against Newcastle disease: the role of cell-mediated immunity. **Avian Diseases**, v.44, n.1, p.145-154, 2000.

RHODES, J.M.; MILTON, J.D. Quantification of intestinal mucins. *In*: Rhodes, J.M., Milton, J.D**.** Lectin Methods and Protocols, **Humana Press**, Totowa, New Jersey, p. 255-261, 1998.

RICTHZENHAIN, J. L.; PAULILLO, A.C.; PINTO, A.A.; KRONKA, S.N. Relation between the hemaglutination inhibition test and indirect ELISA in serologic monitoring of laying Hens submitted to different sytems of vaccination against Newcastle disease. **Revista Microbiologia**, São Paulo, v.24, p.187-91, 1993.

SAIDENBERG, A. B. S.; SINHORINI, J. A.; DUARTE, V. V.; GUIMARÃES, M. B.; FERREIRA, A. J. P. Detecção de Paramixovírus tipo 1 e Influenza tipo A em passeriformes e psitaciformes mantidos em cativeiro na cidade de Itanhaém-SP. In: X CONGRESSO E XV ENCONTRO DA ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE VETERINÁRIOS DE ANIMAIS SELVAGENS. 2006. São Pedro. **Anais...** São Pedro, p. 72, 2006.

SALLE, C. T. P. Doença de Newcastle. In: IX CURSO BÁSICO DE SANIDADE AVÍCOLA FORT DODGE. Jaguariúna. **Anais.** Jaguariúna, p. 50-73, 2002.

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

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

SANTOS, B. M; MARTINS, N. R. S; RESENDE, M; GOUVEIA, A. M. G. Resposta imune conferida pelas amostras LaSota e VG-GA do vírus da doença de Newcastle. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.48, n.6, p.645-656, 1996.

SANTOS, C. H. C.; SILVA, E. N. Métodos de diagnósticos laboratoriais microbiológicos e sorológicos. In: BERCHIERI JUNIOR, A.; MACARI, M. (Eds.). **Doenças das aves**. Campinas: FACTA. p.171-182 , 2009.

SCHELLING, E.; THUR, B.; GRIOTA, C.; AUDIGE, L. Epidemiological study of Newcastle disease in backyard poutry and wild bird populations in Switzerlan. **Avian Pathology**, v.28, p 263-272, 1999.

SEAL, B. S.; 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**, v. 36, p.1141-1145, 1998.

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

SENNE, D. A.; PEARSON, J. E.; MILLER, L. D.; GUSTAFSON, G. A. Virus isolations from pet birds submetted for importation into the United States. **Avian Diseases**, v.27, p.731-744, 1983.

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

SHARMA, J.M. The avian immune system. In: Disease of Poultry, 11 Ed., Towa State Press, p.5-16, 2003.

SHARON, N.; LIS, H. Legume lectins – a large family of homologous proteins. **Journal FASEB**, v.4, p.3198-3208, 1990.

SIBILLE, P.; AVRAMÉAS, A. MORAILLON, A.; RICHARDSON, J.; SONIGO, P.; PANCINO, G.; STROSBERG, A. D. Comparison of serological tests for the diagnosis of feline immunodeficiency virus infection of cats. **Veterinary Microbiology** v.45, p.259-267, 1995.

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

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

SILVA, J. S. A; MOTA, R. A.; VILELA, S. M. O.; DORETTO, J. L.; PINHEIRO J. J. W.; SILVA, L. G. B. 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 Ciências Avícolas**, v. 8, n. 2, p. 125-129, 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 Identifield in non-comercial farms. **Archives of Virology.**, DOI: 10.1007/s00705-008-0269-5, 2008.

SNYDER, D. B.; MARQUARDT, W. W.; MALLINSON, E. T.; RUSSEK, E. Rapid serological profiling by enzyme-linked immunosorbent assay. I. Measurement of antibody activity titer against Newcastle disease virus in a single serum dilution. **Avian Diseases**. v.27, p. 161-170, 1983.

SOARES, P. B. M. Padronização da RT-PCR dúplex para detecção dos vírus da Influenza A e doença de Newcastle em aves migratórias. Dissertação- Universidade de São Paulo, São Paulo, 2002.

SOUSA, R. L. M.; CARDOSO, T.C.; PAULILLO, A.C.;. MONTASSIER, H.J.; PINTO, A.A. Antibody response to Newcastle disease vaccination in a flock of young partridges (*Rhynchotus rufescens*). **Journal of Zoo Wildlife Medicine**, v.30, p.459–461, 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**, v.7, n.6, p.940 - 944, 2000.

SOUSA, E.; BERCHIERI, A. J.; PINTO, A. A.; MACHADO, R. Z.; CARRASCO, A. O.; MARCIANO, J. A.; WERTHER, K. Prevalence of *Salmonella* spp. Antibodies to *Toxoplasma gondii*, and Newcastle Disease Virus in Feral Pigeons (*Columba livia*) in the City of Jaboticabal, Brazil. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**. v. 41 (4), p.603-607, 2010.

SPREADBROW, P.B. Thermostable Newcastle disease vaccines for use in village chickens. In: **First INFPD/FAO Electronic Conference on Scope and Effect of Family Poultry and Development**, Guèye E.F. (Ed). 1999.

STONE, H. D. Efficacy of oil-emulsion vaccines prepared with Pigeon Paramyxovirus –1, Ulster and LaSota Newcastle Disease Viruses. **Avian Diseases**, v..33, p.157-162, 1989.

SWAYNE, D.E.; KING, D.J. Avian influenza and Newcastle disease. **JAVMA**, v.222, n.11, 2003.

TAN, S. W.; OMAR, A. R.; AINI, I.; YUSOFF, K.; TAN, W. S. Detection of Newcastle disease virus using a SYBR Green I real time polimerase chain reaction. **Acta Virology.**, Prague, v.48, n.1, p.23-28, 2004.

TERREGINO, C.; CATTOLI, G.; GROSSELE, B.; BERTOLI, E.; TISATO, E.; CAPUA, I. Characterization of Newcastle disease virus isolates obtained from Eurasian collared doves (*Streptopelia decaocto*) in Italy. **Avian Pathology,** v.32, p.63-68, 2003.

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

THOMAZELLI, L.M.; ARAUJO, J.; OLIVEIRA, D.B.; SANFILIPPO, L.; FERREIRA, C.S.; BRENTANO, L.; PELIZARI, V.H.; NAKAYAMA, C.; DUARTE, R.; HURTADO, R.; BRANCO, J.O.; WALKER, D.,;DURIGON, E.L. Newcastle disease virus in penguin from King George Island on the Antarctic region. **Veterinary Microbiology**. v.146, n.155-160, 2010.

TORO, H.; Hoerr, F.J.; FARMER, K.; DYKSTRA, C.C.; ROBERTS, S.R.; PERDUE, M. Pigeon paramyxovirus: association with common avian pathogens in chickens and serologic survey in wild birds. **Avian Diseases**. v.49, p.92–98, 2005.

TOWBIN, H.T.; STAEHELIN, T.; GORDON, J. Eletrophoretic transfer of protein from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Produce and some applications. **Proceedind National Academic. Science**., USA, Washington, v. 76, n. 1, p. 4350-4354, 1979.

TSAI, H.J.; LEE, C.Y. Serological survey of racing pigeons for selected pathogens in Taiwan. **Acta Veterinária Hungarica**. v.54, p 179-189, 2006.

VERNOERD, D. J. Ostrich diseases. **Rev. Sci. Tech. Off Int. Epiz.**, 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 Medicina Veterinária**, v. 22, n. 4, 2000.

YU, L.; WANG, Z.; JIANG, Y.; CHANG, L.; KWANG, J. Characterization of newly emerging Newcastle disease virus isolate from people's Republic of China and Taiwan. **Journal of Clinical Microbiology.** v.39, n.10, p.3512-3519, 2001.

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

WILLIANS, R.; BOSHOFF, C.H.; VERWOERD, D.; SCHOEMAN, M. Detection of antibodies to Newcastle disease virus in ostriches (*Struthio camelus*) by an indirect ELISA. **Avian Diseases**., 41: 864-9, 1997.

WITT, J. J.; DAVELAAR, F.G.; BRAUNIUS, W.W. Comparion 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. **Avian Pathology**, v. 21, p.651-58, 1992.

XU, H.; LOHR, J.; GREINER, M. The seletion of ELISA CUT-off points for testing antibody to Newcastle disease by two-graph receiver operating characteristic (TG-ROC) analysis. **Journal Immunological Methods**. v.208, p61-64, 1997.

ZHANG, L.; Pan, Z.; GENG, S.; CHEN, X.; HU, S; LIU, H.; WU, Y.; JIAO, X. Corresponding author contact information Sensitive, semi-nested RT-PCR amplification of fusion gene sequences for the rapid detection and differentiation of Newcastle disease virus. **Research in Veterinary Science**, v.89, p.282-289, 2010.

ZHOU, E. M.; CHAN, M.; HECKERT, R.A.; RIVA, J.; CANTIN, M.F. Evaluation of a competitive ELISA for detection of antibodies against avian influenza virus nucleoprotein. **Avian Diseases**, v. 42, p. 517–522, 1998.

ZHUHUI, H.; 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 Virology**, v.78, n.8, p.4176-4184, 2004.