



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA



DOENÇA DE NEWCASTLE:  
PADRONIZAÇÃO DE TESTES SOROLÓGICOS  
PARA O DIAGNÓSTICO EM AVESTRUZES (*Struthio  
camelus*) E AVALIAÇÃO SOROEPIDEMIOLÓGICA  
NOS ESTADOS DA BAHIA E DE SÃO PAULO

**Lia Fernandes**

Salvador – Bahia

2006



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA



**TESE DE DOUTORADO**

**DOENÇA DE NEWCASTLE:  
PADRONIZAÇÃO DE TESTES SOROLÓGICOS PARA O  
DIAGNÓSTICO EM AVESTRUZES (*Struthio camelus*) E  
AVALIAÇÃO SOROEPIDEMIOLÓGICA NOS ESTADOS DA  
BAHIA E DE SÃO PAULO**

**Lia Muniz Barretto Fernandes**

**Orientador: Profa. Dra. Songelí Menezes Freire  
Co-orientador: Dr. Luciano Doretto Júnior**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Imunologia, Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia, como requisito parcial para a obtenção do Título de doutora em Imunologia.

Salvador – Bahia

2006

Ficha Catalográfica elaborada pela

**Biblioteca do ICS / UFBA – Salvador – Bahia**

F363 Fernandes, Lia Muniz Barretto,  
Doenças de Newcastle: padronização de testes sorológicos para o  
diagnostico em avestruzes (*Struthio Camelus*) e avaliação soropidemiológica  
nos Estados da Bahia e de São Paulo / Lia Muniz Barretto Fernandes. –  
Salvador, 2006.  
105 f.; il.

Tese (doutorado) – Universidade Federal da Bahia, Instituto de Ciências  
da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Imunologia, 2006.

Orientadora: Profa. Dra. Songeli Menezes Freire.  
Co-Orientador: Dr. Luciano Doretto Júnior.

1. Doença de Newcastle. 2. Testes de Inibição da Hemaglutinação. 3.  
ELISA. 4. Immunoblotting. 5. Western Blotting. 6. Soroepidemiologia. 7.  
Struthioniformes I. Freire, Songeli Menezes. II. Doretto Júnior, Luciano. III.  
Universidade Federal da Bahia. Instituto de Ciências da Saúde. IV. Título.

CDU: 578.831

## *Agradecimentos*

*Aos meus pais e aos meus irmãos,*

*À família LASAB,*

*Ao GESAV,*

*Ao LABIMUNO,*

*Ao LANAGRO - Campinas,*

*À Dra. Songeli Menezes Freire,*

*Ao Dr. Luciano Doretto Júnior*

*Ao Dr. Roberto Meyer,*

*Ao Dr. Antônio Carlos Paulillo e Dr. Ruben Pablo Iturrino,*

*À Dra. Nilce Queiroz Gama e Dra. Elizabeth Santin,*

*À Agência de Defesa Agropecuária da Bahia (ADAB),*

*À Associação Baiana de Criadores de Avestruz,*

*Aos meus alunos e*

*À todas as pessoas que participaram da execução deste trabalho.*

*MUITO OBBRIGADA!*

## SUMÁRIO

Introdução	01
Revisão de Literatura	03
Justificativa	31
Objetivos	32
Material e Métodos	33
Resultados	44
Discussão	56
Conclusões	67
Referências	68
Anexos	83

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

### FIGURAS

- Figura 1** – curva “ROC” obtida utilizando-se os dados dos testes ELISA. **45**
- Figura 2.** Distribuição da reatividade sérica (densidade óptica) das amostras de avestruzes de plantéis da Bahia e de São Paulo, com o ELISA LASAB (ponto de corte de 0,165). **46**
- Figura 3.** Distribuição da reatividade sérica (densidade óptica) das amostras de avestruzes de plantéis da Bahia e de São Paulo, com o ELISA GUILDHAY (ponto de corte de 0,234). **46**
- Figura 4.** Distribuição da reatividade sérica (densidade óptica) das amostras de avestruzes de plantéis da Bahia e de São Paulo, com o ELISA IDDEX (ponto de corte de 0,190). **47**
- Figura 5.** Distribuição da reatividade sérica (densidade óptica) das amostras de avestruzes de plantéis da Bahia e de São Paulo, com o ELISA GUILDHAY-CAV (ponto de corte de 0,275). **47**
- Figura 6.** Distribuição da reatividade sérica (densidade óptica) das amostras de avestruzes de plantéis da Bahia e de São Paulo, com o ELISA IDDEX-CAV (ponto de corte de 0,150). **47**
- Figura 7.** Correlação entre a densidade óptica obtida no ELISA LASAB e os títulos obtidos na Inibição da Hemaglutinação utilizando-se hemácias de avestruz. **50**
- Figura 8.** Fotografia da eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) Da esquerda para a direita, visualiza-se a corrida do antígeno conforme preparação referida para esta técnica e reconhecimento das bandas pelos soros, padrões de peso molecular (PM) e o antígeno ultrafiltrado. **53**
- Figura 9.** Fotografia “Western blotting” mostrando o reconhecimento por soro de animal com sorologia positiva. À direita, padrões de peso molecular (PM). **54**
- Figura 10.** Fotografia da reação obtida no Dot-ELISA. À esquerda visualização da reação com concentrações diferentes do antígeno. À direita, reação obtida nos controles positivos e negativos. **54**
- Figura 11.** Resultados obtidos com o Dot-ELISA realizado com os soros de avestruzes do Estado de São Paulo. **55**

## TABELAS

- Tabela 1** – resultados obtidos com os cinco testes ELISA para as 9 amostras positivas e 9 negativas **44**
- Tabela 2.** Concordância entre os vários ELISA desenvolvidos para diagnóstico da Doença de Newcastle em avestruzes. **48**
- Tabela 3.** Concordância entre os vários HI desenvolvidos para diagnóstico da Doença de Newcastle em avestruzes. **49**
- Tabela 4.** Concordância entre os testes HI e ELISA desenvolvidos para diagnóstico da Doença de Newcastle em avestruzes. **51**
- Tabela 5.** Resultados obtidos nos testes de ELISA utilizados para diagnóstico da Doença de Newcastle em avestruzes. **52**
- Tabela 6.** Resultados obtidos nos testes de Inibição da Hemaglutinação utilizados para diagnóstico da Doença de Newcastle em avestruzes. **52**

## LISTA DE ABREVIATURAS

**APMV-1** – Paramixovirus aviário sorotipo 1

**DO** - Densidade Óptica

**DNC** – Doença de Newcastle

**ELISA** - Ensaio Imunoenzimático (Enzyme Linked-Immunosorbent Assay)

**HI** – Inibição da Hemaglutinação

**IPIIC** – Índice de Patogenicidade Intra-cerebral

**IPIV** – Índice de Patogenicidade Intra-venoso

**kDa** – Kilodaltons

**LANAGRO** – Laboratório Nacional Agropecuário

**LASAB** – Laboratório de Sanidade Avícola da Bahia

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

**OIE** – Organização Mundial de Saúde Animal

**PAGE** – Eletroforese em Gel de Poliacrilamida

**PBS** – Solução Salina Tamponada

**PNSA** – Programa Nacional de Sanidade Avícola

**SDS** – Docecil Sulfato de Sódio

**TMME** – Tempo Médio de Morte Embrionária

**UBA** – União Brasileira de Avicultura

**VDN** - Vírus da Doença de Newcastle



## RESUMO

Doença de Newcastle é uma enfermidade viral aguda, altamente contagiosa, que acomete aves de várias espécies, considerada como uma das doenças mais importantes para a indústria avícola moderna. Ferramentas para diagnóstico e controle estão disponíveis para galinhas, porém ainda não foram desenvolvidos testes específicos para avestruzes. O presente trabalho visou padronizar testes sorológicos para a detecção de anticorpos contra a Doença de Newcastle em avestruzes e avaliar a situação soropidemiológica de plantéis do estado da Bahia e de São Paulo. A padronização da técnica da Inibição da Hemaglutinação revelou interferência do tipo de eritrócito utilizado e demonstrou a necessidade do uso de hemácias da mesma espécie ou, alternativamente, de perus. Testes de ELISA indiretos foram desenvolvidos ou modificados para a utilização nesta espécie e, apesar de apresentarem alta correlação entre si, demonstraram baixa correlação com a HI. Foram desenvolvidos ainda os testes “western blot” e “dot-blot”, que podem auxiliar na avaliação da resposta imune e facilitar a implantação de programas de controle. As amostras séricas analisadas revelaram a presença de anticorpos e, a ausência de vacinação dos animais avaliados, reforça a hipótese de que as avestruzes estão em contato com o vírus vacinal ou vírus de campo.

**Palavras-chave:** Doença de Newcastle, Avestruzes, ELISA, Inibição da Hemaglutinação, Dot-blot, Western-blott

## **ABSTRACT**

Newcastle Disease is a highly contagious viral infection, which attacks several avian species, and represents one of the most important diseases for the modern poultry industry. Because of the relevance of the poultry industry in Brazil and the boom in ostrich rearing, it's necessary the development of control strategies and it depends on the development of practical and reliable tools for diagnosis. Such tools are available for chickens; however specific tests were not developed for ostriches yet. The aim of the present work is to standardize serological tests for the detection of antibodies against the Newcastle disease in ostriches and assess the seroepidemiological situation of flocks located in Bahia and São Paulo. The standardization of haemagglutination inhibition (HI) revealed interference of the type of used red blood cells and demonstrated the need of the use of erythrocytes of the same species or, alternatively, of turkeys. Indirect ELISA were developed or modified for this species and, in spite of they present high correlation amongst themselves, they demonstrated low correlation with HI. "Western blot" and "dot-blot" were developed, and that can be useful in evaluation of the immune response and to make possible the implantation of control programs. The samples analyzed revealed the presence of antibodies against NDV and, as these animals were not vaccinated, the hypothesis that the ostriches are in contact with the vaccine virus or wild virus is reinforced.

**Key words** –Newcastle disease, ostriches, ELISA, HI, Dot-Blot, Western-blot

## 1. Introdução

Enfermidade viral aguda e altamente contagiosa, a doença de Newcastle acomete praticamente todas as espécies de aves, já tendo sido comprovada a presença do seu agente etiológico em mais da metade das 50 ordens da classe *Avis* (FIELDS, 1996).

Embora descrita pela primeira vez na Ásia e logo a seguir confirmada na Inglaterra, na terceira década do século XX, a primeira descrição desta zoonose no Brasil data de 1953, com o isolamento viral realizado por Cunha e Silva em um surto verificado na cidade de Macapá. Estes pesquisadores atribuíram a importação de carcaças de frangos congelados vindos dos Estados Unidos, como fonte do vírus responsável por esta ocorrência (CUNHA; SILVA, 1955). A partir de então, a doença tem sido observada em todo o território nacional, trazendo significativas perdas econômicas para os avicultores brasileiros (HASTENREITER, 1976; ITO et al, 1986; DORETTO JÚNIOR; PAULILLO; 2006).

Tendo em vista a necessidade da sanidade dos plantéis e da importância econômica da produção de frangos de corte, que colocou o Brasil entre os maiores exportadores do mundo, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) instituiu em 1994 o Programa Nacional de Sanidade Avícola (PNSA), no qual a Doença de Newcastle se destaca como a principal enfermidade para as aves comerciais. Embora endêmica em várias regiões do país nas últimas décadas, em 2003 o governo brasileiro declarou a avicultura

comercial livre desta doença, com reconhecimento da Organização Mundial para a Sanidade Animal (OIE), a partir de um estudo oficial realizado em 2002.

A condição de “status” de livre para Doença de Newcastle no Brasil está permanentemente ameaçada em face à existência de múltiplos reservatórios domésticos, silvestres e migratórios que podem ter livre acesso às aves de criação comercial. Além disso, o rebanho de avestruzes no Brasil conta atualmente com mais de 200.000 cabeças, que são criadas de forma semi-extensiva, e estão distribuídas em todo o território nacional, muitas vezes em áreas próximas a criatórios avícolas industriais. Neste sentido, um programa de vigilância eficaz depende da pesquisa de métodos de diagnóstico confiáveis e exeqüíveis em laboratórios credenciados para tal.

Assim, o presente trabalho pretende contribuir para o conhecimento da atual situação soropidemiológica da Doença de Newcastle em avestruzes de plantéis da Bahia e de São Paulo, dois estados brasileiros que se destacam na criação destes animais, utilizando um teste sorológico convencional, aceito internacionalmente e preconizado pela OIE, embora associado a reações cruzadas e, adicionalmente apresentando alternativas para o diagnóstico sorológico com o desenvolvimento de testes imunoenzimáticos, além de adaptação também para este fim de testes disponíveis no mercado.

## **2. Revisão da Literatura**

### **2.1 Aspectos gerais da Doença de Newcastle**

Doença de Newcastle é uma infecção viral altamente contagiosa que acomete aves de diversas espécies, sendo considerada como uma das enfermidades mais importantes para a indústria avícola moderna, seja pelas perdas diretas verificadas na produção, seja pela imposição de barreiras na comercialização de produtos avícolas. Em países onde a avicultura é uma atividade importante, os custos com prevenção e controle são extremamente altos e, por outro lado, em países onde predomina a criação de aves em pequena escala, as perdas diretas causadas pela enfermidade podem ser consideradas um agravante ao problema da desnutrição (ALEXANDER, 2001). Além disso, apesar de não existirem levantamentos sobre a ocorrência da Doença de Newcastle em humanos no Brasil, existem evidências de que amostras vacinais e amostras virais de campo podem infectar e causar sinais clínicos no homem, como dores de cabeça, lacrimejamento, conjuntivite e edema de pálpebra (HERNANDEZ et al, 1987).

A grande variação observada no tipo e na severidade da doença tem causado problemas na nomenclatura adotada por cada país, principalmente quando do reconhecimento inicial da enfermidade. Sendo assim, a Doença de Newcastle já recebeu o nome de Pseudopeste aviária, Pseudovogel Pest, Atypische Geflugelpest, Pseudopoultry Plague, Avian Pest, Avian Distemper, Raniket

Disease, Tetelo Disease, Korean Fowl Plague e Avian Pneumoencephalitis (ALEXANDER, 1997).

O vírus da Doença de Newcastle (VDN) pertence à família *Paramyxoviridae* e é o único membro do gênero *Avulavirus*. Apesar dos isolados virais pertencerem ao mesmo sorotipo (*APMV-1*), há uma grande variação entre as diversas estirpes, no que se refere à patogenia (ALEXANDER, 1991; ZHUHUI *et al*, 2004). Assim, fatores tais como virulência da amostra, espécie acometida, “status” imunológico, predileção do vírus pelo sistema respiratório, sistema digestivo ou sistema nervoso central, causam grande variação na apresentação de sinais clínicos. Em função da diversidade observada na virulência entre as amostras, uma forma mais simples de classificação das estirpes foi adotada, baseada nos sinais clínicos e nas lesões observadas em galinhas (SWAINE; KING, 2003).

## **2.2 Aspectos históricos**

Apesar de existirem relatos de uma enfermidade com sinais clínicos semelhantes à Doença de Newcastle, na Ásia e no Leste Europeu, em meados do século XIX, as primeiras descrições científicas foram feitas em 1926, em Java, Indonésia, por Kraneveld, e em 1928, em Newcastle-upon-Tyne, Inglaterra, por Doyle (ALEXANDER; MANVELL, 2002). O nome Doença de Newcastle foi utilizado por Doyle, como forma de evitar um nome descritivo que pudesse levar à confusão com outras enfermidades (DOYLE, 1935).

Nos Estados Unidos, a descrição de ocorrência de uma doença respiratória associada a sinais nervosos, feita em 1930 por Beach e chamada de pneumoencefalite, foi posteriormente confirmada como Doença de Newcastle (LANCASTER, 1976). A disseminação mundial da Doença de Newcastle tem como hipótese a de que amostras de baixa virulência tenham sido veiculadas por aves migratórias e a de que galinhas estariam infectadas, sem apresentar sinais clínicos. De acordo com essas postulações, modificações na forma de criação e nos hospedeiros, propiciaram a ocorrência de outras formas clínicas (HANSON, 1972).

Alexander et al (1997) consideram que três panzootias tenham ocorrido desde a primeira identificação da doença. A primeira panzootia estaria relacionada com os surtos iniciais da enfermidade, seria originária do Sudeste Asiático e teria levado 30 anos para se disseminar mundialmente, sendo ainda importante no início da década de 60. A segunda panzootia teria surgido no Oriente Médio no final da década de 70, alcançando a maioria dos países até 1973, se disseminando mais rapidamente graças à revolução da avicultura industrial e à comercialização de produtos avícolas. Afetando drasticamente a indústria avícola na maioria dos países, a enfermidade passou a ser controlada por meio de vacinas e fiscalização mais rigorosa na importação de aves exóticas. Apesar disso, pombos criados para corridas, demonstrações ou alimentação, principalmente na Europa, foram ignorados como fontes em potencial do vírus. Estas foram as aves afetadas primariamente na terceira panzootia, que atingiu o Oriente Médio no final da década de 70 e chegou à Europa em 1981, se espalhando para todas as partes do mundo.

O surto de Doença de Newcastle ocorrido na Venezuela entre 1949 e 1950, com alta mortalidade nos animais afetados, foi a primeira identificação da enfermidade na América do Sul. Neste mesmo ano, aves no México foram acometidas pela doença com amostra altamente virulenta, levando a mortalidade de 100% (LANCASTER, 1976). No Brasil a primeira descrição foi efetuada em 1953, na cidade de Macapá, e os pesquisadores que relataram a ocorrência associaram a doença à importação de carne de frango congelada dos Estados Unidos (CUNHA e SILVA, 1955). A partir desta data a enfermidade passou a ser verificada em várias regiões do país, sempre associada a perdas importantes para os avicultores (ITO et al, 1986).

Os primeiros relatos de Doença de Newcastle em avestruzes foram feitos na década de 50, em animais mantidos em zoológicos. Os sinais observados nestes casos foram depressão geral e comprometimento do sistema nervoso central (ALEXANDER, 2000). Samberg et al (1989) descreveram um surto em criação de avestruzes em Israel, e enfatizaram o risco decorrente da proximidade existente entre a propriedade afetada e criatórios comerciais de galinhas. Países do Sul da África enfrentaram uma epizootia de Doença de Newcastle, entre 1993 e 1995. Várias espécies de aves domésticas foram acometidas e foram efetuados registros de casos em criações de avestruzes (ALLWRIGH, 1996).

A intensificação na comercialização internacional de avestruzes, verificada a partir da década de 90, suscitou apreensão nas autoridades sanitárias do mundo todo, levando a maioria dos países a criarem legislações específicas relacionadas ao tema. O fortalecimento da comercialização destes animais justamente no



momento em que ocorria uma epizootia na África pode ter favorecido a propagação da Doença de Newcastle para vários países importadores. A preocupação com questões de âmbito sanitário culminou com a inclusão das avestruzes no grupo das aves de criação comercial. Assim, os estruticultores passaram a ter que atender às normas dos programas da avicultura industrial. Entretanto, as diferenças existentes entre avestruzes e galinhas acendem discussões e motivam proposições de revisão na legislação, para que as normas sejam específicas para comercialização destes animais (ALEXANDER, 2000).

No Brasil, a importação de avestruzes infectadas com o vírus da Doença de Newcastle, em 1997, levou ao sacrifício de muitos animais e ao embargo das importações (DORETTO JÚNIOR, 2006). A partir deste acontecimento, estruticultores nacionais se mobilizaram e o setor passou a participar do Programa Nacional de Sanidade Avícola (PNSA), filiando-se a União Brasileira de Avicultura (UBA). A fiscalização da atividade deixou de ser da competência do IBAMA, passando para o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, em 2002 e as Normas para Criação de Avestruzes foram publicadas no ano seguinte, constando da Instrução Normativa número 2 (MAPA 2003; D'ÁVILA, 2005).

### **2.3 Situação Atual**

A Doença de Newcastle continua sendo um grande desafio para a indústria avícola mundial, a despeito de todos os esforços feitos para sua erradicação. A utilização de vacinas vivas nas criações comerciais dificulta os estudos de distribuição da enfermidade. Como apenas a forma aguda da doença é notificada

e registrada pelo Escritório Internacional de Saúde Animal (OIE) e pela Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), os dados obtidos por estas organizações podem não representar a real ocorrência da enfermidade (ALEXANDER, 2001).

A Doença de Newcastle continua sendo endêmica em muitos países da África (PFITZER et al, 2000), Ásia (HUA et al, 2005) e da América (KAPCZYNSKI; KING, 2005). No Brasil, apesar dos investimentos da indústria avícola na prevenção da Doença de Newcastle, existem ameaças permanentes, uma vez que essas medidas ainda não alcançaram as pequenas criações de galinhas, que vem aumentando significativamente, como uma proposta para geração de renda em pequenas propriedades e assentamentos rurais. Programas oficiais de incentivo e financiamento para aquisição e distribuição de aves de fundo de quintal geralmente negligenciam o controle desta e de outras enfermidades aviárias importantes (JORGE et al, 2000; SANTOS, 2005).

Além das galinhas criadas para subsistência, os reservatórios silvestres também são considerados importantes na manutenção do vírus circulante. Estudos de caracterização do vírus, realizados no Rio de Janeiro, alertaram para a importância da colaboração entre pesquisadores, com o propósito de viabilizar a implementação de um sistema integrado de vigilância, em consonância com o PNSA, incluindo o trabalho de esclarecimento sobre o controle da Doença de Newcastle (OLIVEIRA JÚNIOR et al, 2005).

O crescimento global da avicultura levou a grande expansão do número de aves e a criação de uma infra-estrutura de apoio à produção e exportação de avestruz em vários países. Hoje o maior exportador de carne de avestruz para países livres da Doença de Newcastle é a África do Sul. No entanto, vários países do continente africano, também exportadores de produtos e de animais, notificaram surtos da enfermidade nos últimos anos. Desse modo, o Zimbábue relatou, desde 1998, 45 surtos da Doença de Newcastle em galinhas na zona rural e um surto em avestruzes, demonstrando que a enfermidade é endêmica no país. Botswana também descreveu isolamento do vírus em avestruzes, provavelmente oriundo de criações de frangos (COOPER, 2005). Assim, a criação de avestruzes passou a ser mais um motivo de apreensão para os sanitaristas, preocupados com a prevenção e o controle da Doença de Newcastle. No Brasil a avicultura teve um crescimento notável na última década, e no primeiro momento de expansão da atividade, a distribuição de animais para várias regiões ocorreu sem que as medidas básicas de controle como quarentena, registro de procedência, isolamento das criações e monitoramento de doenças, fossem rigorosamente observadas.

A inclusão da avicultura no PNSA foi um passo importante, mas como ação isolada, não garante o cumprimento das medidas de biossegurança necessárias para evitar a disseminação da Doença de Newcastle. É necessário que haja uma fiscalização mais efetiva, principalmente visando evitar a promiscuidade entre espécies de aves diferentes. Os criadores de avestruz terão que se mobilizar, licenciar definitivamente seus criatórios, além de se

profissionalizar, se de fato desejarem continuar com a criação e planejar o escoamento da produção (MENDES, 2006).

## **2.4 Características do Vírus da Doença de Newcastle**

### **2.4.1 Classificação**

O vírus da Doença de Newcastle é classificado como Paramyxovirus aviário sorotipo 1, pertencente ao gênero *Avulavirus* e à família *Paramyxoviridae* (MAYO, 2002). As amostras do vírus podem ser classificadas de acordo com os sinais observados em galinhas. Assim existem as amostras altamente virulentas, amostras intermediárias e amostras de baixa virulência (LEEuw et al, 2005). Beard e Hanson (1984) criaram uma divisão das amostras de acordo com a patogenicidade em galinhas, definindo-as como formas, ou patótipos, da doença. Esta classificação identifica como forma de Doyle a apresentação aguda e letal, que afeta aves de todas as idades. A existência de hemorragias no trato digestório levou à denominação de Patótipo Velogênico Viscerotrópico. A forma de Beach é também aguda e letal e acomete aves em qualquer idade. Entretanto são observados sinais nervosos e respiratórios, que levaram à designação de Patótipo Velogênico Neurotrópico. A forma de Beaudette é mais branda do que as anteriores, porém ainda assim capaz de causar mortalidade em aves jovens que não possuem anticorpos. O patótipo é chamado de Mesogênico e amostras com essas características já foram usadas como vacinas. A forma de Hitchner pode apresentar sinais respiratórios bastante suaves, ou ser subclínica. Amostras desse patótipo, denominado Lentogênico, são comumente usadas como vacinas.

Um último patótipo, chamado de Lentogênico Entérico, se multiplica basicamente no intestino, não causa sinais clínicos e também é bastante utilizado em vacinas (ALEXANDER, 1991).

Os métodos tradicionais de detecção e diferenciação do vírus da Doença de Newcastle são baseados no isolamento viral usando ovos embrionados de galinha, seguidos de testes “*in vivo*” para a determinação da patogenicidade. Os testes usados rotineiramente para a definição dos patótipos são: Índice de Patogenicidade Intracerebral (IPIC) em pintos de um dia, Índice de Patogenicidade Intravenoso (IPIV), em aves com seis semanas de idade e Tempo Médio de Morte Embrionária (TMME), em embriões de galinhas. A denominação da Doença de Newcastle oficial, de acordo com a OIE é infecção pelo Paramixovírus aviário-1 com índice de patogenicidade intracerebral (IPIC) maior ou igual a 0,7. Apesar de serem amplamente utilizados, estes testes são laboriosos e demandam tempo para sua execução (ALDOUS; ALEXANDER, 2001; DORETTO JÚNIOR; PAULILLO, 2006).

O agrupamento de isolados de acordo com a virulência e com as características epidemiológicas das amostras tem sido empregado amplamente em caso de surtos. Entretanto, apesar dos testes de patogenicidade serem capazes de definir a virulência de um isolado, não possibilitam identificar as relações biológicas e epidemiológicas de amostras com a mesma virulência. Desta forma, painéis de anticorpos monoclonais produzidos contra amostras do vírus da Doença de Newcastle passaram a ser utilizados para associar os isolados de acordo com suas capacidades biológicas e epidemiológicas (RUSSELL; ALEXANDER, 1983). Anticorpos monoclonais são capazes de

distinguir pequenas variações na antigenicidade, por meio do reconhecimento da mudança na seqüência de aminoácidos que gera alteração nos epítopos contra os quais são dirigidos. Assim, eles permitem a detecção de diferenças entre amostras e até mesmo dentro de uma mesma sub-população (HANSON, 1988).

O uso da técnica de análise do polimorfismo de fragmentos com enzimas de restrição e o sequenciamento parcial de nucleotídeos levou à classificação das amostras do vírus da Doença de Newcastle em nove grupos (TSAI et al, 2004). A aplicação de técnicas de biologia molecular, por sua vez, tem possibilitado não apenas a identificação e caracterização das amostras do vírus, mas também tem sido uma ferramenta fundamental para a determinação da origem das amostras e da sua disseminação (ALDOUS; ALEXANDER, 2001).

#### **2.4.2 Morfologia e Estrutura do vírus da Doença de Newcastle**

A visualização do vírus da Doença de Newcastle por meio da microscopia eletrônica revela partículas pleomórficas, características deste gênero. Geralmente são observadas partículas arredondadas, que medem entre 100 a 500 nanômetros de diâmetro, mas ocasionalmente podem ser visualizadas partículas filamentosas, com 100 nanômetros de comprimento. A superfície do vírus é recoberta de projeções com aproximadamente oito nanômetros de comprimento (WATERSON, 1964).

Os *Paramyxovirus* são compostos por uma molécula de RNA fita simples com peso molecular de aproximadamente  $5 \times 10^6$  daltons. O sequenciamento de

nucleotídeos do genoma do vírus da Doença de Newcastle revelou que o mesmo consiste de 15.186 nucleotídeos (OIE, 1996). Sanson (1988) descreveu seis proteínas codificadas pelo genoma viral: Proteína L, polimerase associada ao nucleocapsídeo; HN, responsável pela atividade da hemaglutinina e neuraminidase, que formam os dois tipos de projeções vistas na superfície das partículas virais; F, proteína de fusão que constitui as menores projeções de superfície; NP, proteína do nucleocapsídeo; P, proteína fosforilada associada ao nucleocapsídeo e proteína M, a proteína da matriz. A eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) revelou que a comparação dos polipeptídeos obtidos para Paramyxovirus aviários pode ser utilizada para identificação de sorogrupos (NAGY; LOMNICZI, 1984).

O vírus da Doença de Newcastle é envelopado e duas proteínas de membrana tem papéis bastante importantes na relação com o hospedeiro: a proteína Hemaglutinina-Neuraminidase (HN), envolvida na adsorção e liberação da célula alvo e a proteína de Fusão (F), mediadora da fusão do envelope viral com as membranas da célula. A proteína F é sintetizada como um precursor, a F0, e só tem a capacidade de fusão após a clivagem em dois polipeptídeos: F1 e F2. Entretanto, além da clivagem de F0, ainda é fundamental a ação de HN para que ocorra a fusão (LEEJW et al, 2005).

A proteína HN desempenha papel importante na infecção viral. Esta proteína é responsável pelo reconhecimento dos receptores que contém ácido siálico na superfície da célula; pela promoção da fusão da proteína F, que possibilita a penetração do vírus e também pela remoção do ácido siálico das novas partículas

virais, evitando que ocorra auto-aglutinação do vírus. A demonstração desta dependência confirmou a hipótese de que a virulência do vírus de Newcastle é multigênica (HUANG et al, 2004).

### **2.4.3 Replicação viral**

O vírus da Doença de Newcastle usa as proteínas por ele codificadas para transcrição e replicação de seu genoma, e utiliza proteínas do hospedeiro para translação, tradução e transporte (PEEPLES, 1988). O início da replicação do vírus da Doença de Newcastle se dá a partir da ligação do vírus aos receptores na célula-alvo, por meio da ação do polipeptídeo HN. A ligação da proteína HN ao receptor na célula-alvo gera uma mudança conformacional, que têm como consequência a exposição da proteína de fusão na membrana da célula (STONE-HULSLANDER; MORRISON, 1997). A seguir, a proteína F promove a fusão da membrana do vírus com a membrana da célula do hospedeiro, possibilitando a entrada do nucleocapsídeo. A replicação intracelular ocorre no citoplasma da célula invadida. A transcrição ocorre por meio da ação da polimerase (transcriptase), que produzirá moléculas capazes de atuarem com RNA mensageiros e utilizarem os mecanismos da própria célula para tradução das proteínas e do genoma viral. As proteínas sintetizadas em uma célula infectada são transportadas para a membrana celular, que se modifica. O alinhamento do nucleocapsídeo próximo a essas regiões modificadas culmina na liberação de novas partículas virais a partir da superfície da célula (PEEPLES, 1988).



## 2.5 Patogenia

Os diferentes patótipos do vírus da Doença de Newcastle também podem ser diferenciados por meio da seqüência de aminoácidos que apresentam na região de clivagem do precursor da proteína de fusão (F0) para a formação das proteínas F1 e F2, ligadas por pontes dissulfeto. Como já foi dito anteriormente, essa fusão é passo necessário para possibilitar a união do envelope viral à membrana do hospedeiro. A proteína F0 das amostras virulentas possui dois pares de aminoácidos básicos no sítio de clivagem, que podem ser rompidos por proteases do hospedeiro, encontradas na maioria dos tecidos. A proteína F0 das amostras não virulentas, por sua vez, possui dois únicos aminoácidos básicos no sítio de clivagem que só podem ser clivados em células que contenham enzimas semelhantes à tripsina (PHAM et al, 2005). Estudos moleculares realizados em grande número de isolados do vírus da Doença de Newcastle levaram a OIE a admitir que Doença de Newcastle pode ser definida como uma infecção em aves causada pelo *Paramyxovirus* sorotipo 1 que possui múltiplos aminoácidos básicos (arginina ou lisina) na região terminal C da proteína F2 e o aminoácido fenilalanina no resíduo 117 (terminal N da proteína F1) (WILKS, 2002).

Brown et al (1999) relataram a ocorrência de replicação viral intensa no interior de macrófagos, com subsequente disseminação para vários órgãos, principalmente para o tecido linfóide, quando aves eram infectadas com amostras velogênicas. Partículas virais intactas foram observadas, por meio de microscopia eletrônica, em macrófagos exibindo padrões de apoptose e, apesar da capacidade de indução de apoptose e lise de várias células neoplásicas pelo vírus

da Doença de Newcastle ser objeto de estudo para terapia do câncer, existe um número limitado de estudos sobre a importância da apoptose na patogênese da Doença de Newcastle em aves (LAM, 1996).

Kommers et al (2002) realizaram estudo visando determinar a relação entre a patogênese e a apresentação clínica de seis isolados do vírus da Doença de Newcastle em galinhas. Aves foram inoculadas via intraconjuntival e, posteriormente, foram realizadas avaliações clínicas, necropsias com verificação das lesões macroscópicas, exames histopatológicos, imunohistoquímica para nucleoproteína, hibridização *in situ* e estudos de apoptose. Os resultados obtidos demonstraram que amostras de baixa virulência causam alterações microscópicas apenas no local da aplicação e no sistema respiratório. A detecção da nucleoproteína viral também só foi possível no local de aplicação do vírus. As amostras de alta virulência causaram lesões no cérebro, traquéia, além dos locais de aplicação e a nucleoproteína viral pôde ser recuperada de vários órgãos. Como as primeiras células a apresentarem proteína viral foram os macrófagos, considerou-se a importância do envolvimento dessas células na replicação e disseminação do vírus.

## **2.6 Epidemiologia**

### **2.6.1 Hospedeiros**

Além das espécies aviárias, a infecção pelo vírus da Doença de Newcastle têm sido descrita também em outras espécies, incluindo répteis e o homem.

Aparentemente a replicação do vírus nestes hospedeiros não tem importância epidemiológica para a ocorrência da doença em aves (SPREADBROW, 1999).

A susceptibilidade à enfermidade parece afetar virtualmente todas as espécies de aves. O vírus já foi detectado em 27 das 50 ordens de aves existentes. Até o momento, 241 espécies aviárias tiveram registro de infecção pelo vírus, sendo observada ampla variação na apresentação de sinais clínicos (KALETA; BALDAUF, 1998). Foram realizados isolamentos do vírus em aves migratórias, em aves aquáticas, em aves silvestres, em aves criadas em gaiolas, em aves de competição e, obviamente, em aves de criação comercial, incluindo pombos e avestruzes (SENNE et al, 1983; PANIGRAHY et al, 1993).

Jorgensen et al (1998) destacaram a necessidade de intensificação dos estudos relacionados à epidemiologia, patogênese e diagnóstico da Doença de Newcastle em avestruzes. A possibilidade de avestruzes atuarem como portadoras não aparentes do vírus da Doença de Newcastle e a importância do monitoramento sorológico também foi ressaltada por Koch et al (1998).

### **2.6.2 Transmissão**

A transmissão da Doença de Newcastle de ave para ave está associada à inalação ou ingestão de partículas virais. Apesar da via respiratória ser amplamente usada para a aplicação de vacinas, com resultados positivos comprovados, a disseminação da enfermidade por aerossol depende de condições ambientais favoráveis, tais como temperatura, umidade e concentração

de aves. Existem questões ainda não respondidas a respeito da capacidade de aerossóis se manterem viáveis a ponto de gerar infecção, porém em casos onde o ambiente é favorável, como no surto de Doença de Newcastle ocorrido na Irlanda do Norte em 1973, essa forma de disseminação foi comprovada (McFERRAN, 1989). Spradbrown (1999) argumenta que nas pequenas criações de galinhas, a disseminação pelo ar é uma forma importante de manutenção do vírus na propriedade. Além disso, as formas mais brandas da doença podem ocorrer durante anos, sem que seja feita notificação. A transmissão por meio da ingestão de partículas virais, no entanto, é facilmente demonstrada e acredita-se que o patótipo entérico assintomático seja transmitido apenas desta maneira (ALEXANDER, 2001). Em avestruzes, a ingestão de partículas virais tem sido aceita como a principal forma de infecção (HUCHZERMEYER, 1996).

### **2.6.3 Disseminação**

As aves silvestres são uma fonte importante do vírus da Doença de Newcastle sendo demonstrado que elas podem ajudar a disseminar amostras que já estejam presentes em criações domésticas de determinada região (DEGEFA et al, 2004; WOBESER et al, 1993). A alta densidade em criatórios comerciais e a localização de plantéis em áreas de concentração de aves silvestres têm sido apontadas como responsáveis pelo aumento significativo da transmissão da Doença de Newcastle (VERWOERD, 1995).

A maioria das ocorrências de Doença de Newcastle em plantéis comerciais de avestruzes descritas até o momento provavelmente tem sua origem em aves

domésticas (MANVELL et al, 1996). Estudos de patogenicidade realizados em isolados da África do Sul e Botswana demonstraram, respectivamente, que as fontes de infecção eram galinhas e aves silvestres (SEAL et al, 1998). Amostras isoladas na Dinamarca e analisadas por técnicas moleculares sugeriram ter origem em outras espécies de aves domésticas (JORGENSEN et al, 1998). Não existem relatos até o momento de situações em que as avestruzes tenham introduzido o vírus, servindo como fonte de infecção para galinhas (ALEXANDER, 2000).

Durante a ocorrência de surtos, no entanto, o principal agente de disseminação tem sido o homem. Seu papel como difusor está associado à transferência de partículas do vírus de um local para outro, seja por meio de sapatos, de roupas, equipamentos e veículos (AWAN et al, 1994).

## **2.7 Aspectos clínicos e patológicos**

A Doença de Newcastle pode levar a uma grande variedade de sinais clínicos dependendo da amostra do vírus, espécie do hospedeiro, idade, estado imunológico, interação com outros agentes infecciosos, estresse ambiental e social, forma de exposição e dose do agente infeccioso (ALEXANDER; MANVELL, 2002). Em galinhas, as amostras altamente virulentas são classificadas de acordo com o período de incubação e o tropismo. A forma velogênica viscerotrópica está associada a altos índices de mortalidade, apatia, debilidade, diarreia esverdeada e aquosa, edema de cabeça e pescoço e prostração. A forma velogênica neurotrópica causa morte em grande número de

aves do lote, precedida de sinais respiratórios como tosse, espirros, dispnéia, respiração acelerada, descarga nasal e ocular, seguida da manifestação de sinais nervosos como queda de asas, arrastamento de pernas, depressão, torcicolo, opistótono, tremores musculares, convulsões e tremores (VIANNA et al, 2000). A forma mais branda da doença em galinhas, causadas por amostras classificadas como mesogênicas, é caracterizada por respiração acelerada, dispnéia e presença de secreção respiratória, podendo estar associada também, em algumas situações, pelo comprometimento do sistema nervoso central (OLIVEIRA JÚNIOR et al, 2005).

Samberg et al (1989) descreveram sinais nervosos e alta mortalidade em avestruzes com idade entre cinco e 9 meses, em surto de Doença de Newcastle ocorrido em criação comercial em Israel. Allwright (1996) relatou diferença marcante entre os sinais observados em avestruzes jovens e adultas acometidas pela enfermidade na África. Aves infectadas, com menos de seis meses de idade, apresentavam doença hiperaguda, com sinais nervosos e morte súbita. Aves adultas apresentavam taxa de mortalidade mais baixa, sem comprometimento do sistema nervoso. Huchzermeyer (1994) também observou sinais nervosos em aves jovens e identificou como lesão *post-mortem* mais freqüente o edema na região da cabeça.

Em galinhas, as lesões macroscópicas freqüentemente observadas no trato respiratório são edema da cabeça, presença de catarro nos seios nasais, na região do tecido intersticial da garganta e na traquéia. Podem ser visualizadas hemorragias e ulcerações na laringe e descamação do epitélio traqueal. O

espessamento dos sacos aéreos pode ser observado principalmente quando existe associação com agentes secundários como *Mycoplasma sp* (OLIVEIRA JÚNIOR, 2003). No trato digestório, podem ser encontradas hemorragias petequiais e equimoses na mucosa do proventrículo e do intestino. Pode ocorrer também peritonite sero-fibrinosa e petequial (ALEXANDER; MANVELL, 2002). Frequentemente são observadas hemorragias no coração e aumento do volume do pericárdio, levando a uma severa pericardite e peri-hepatite com exsudato fibrinoso. No sistema reprodutivo pode ser observada a degeneração e flacidez dos folículos ovarianos (FOREIGN ANIMAL DISEASE, 1998).

## **2.8 Imunidade na Doença de Newcastle**

A resposta imune inicial à infecção pelo vírus da Doença de Newcastle é mediada por células e detectável entre dois a três dias após a inoculação de vacinas vivas (GHUMMAN et al, 1976). No entanto, demonstrou-se posteriormente que a resposta celular isoladamente não era capaz de conferir proteção contra a infecção pelo vírus da Doença de Newcastle. O papel da imunidade celular na proteção contra a Doença de Newcastle foi investigado por meio de estratégias onde a resposta mediada pelas células de defesa foi avaliada sem interferência da resposta humoral. Os resultados obtidos demonstraram que a resposta celular específica contra o vírus da Doença de Newcastle por si só não é suficiente. A presença de anticorpos neutralizadores do vírus ou inibidores da hemaglutinação é necessária para gerar proteção contra a Doença de Newcastle (REYNOLDS ; MARAQA, 2000).

Anticorpos capazes de proteger contra a infecção pelo vírus da Doença de Newcastle têm sido medidos nos testes de vírus-neutralização (VN). Anticorpos direcionados contra os glicopeptídeos de superfície hemaglutinina e neuraminidase e também à proteína F, podem neutralizar o vírus da Doença de Newcastle. Anticorpos monoclonais específicos para os epitopos da proteína F têm sido capazes de induzir maior neutralização do que os dirigidos contra HN em testes *in vitro* e *in vivo*. Os títulos de anticorpos dependem da amostra infectante, mas geralmente o pico da resposta humoral é alcançado dentro de três a quatro semanas. Anticorpos inibidores da hemaglutinação podem ser detectados por até um ano depois da exposição em aves acometidas pela forma mesogênica ou após uma série de imunizações (ALLAN et al, 1978). Anticorpos contra o vírus da Doença de Newcastle têm sido encontrados nas secreções respiratórias e intestinais, sendo IgG e IgA as principais imunoglobulinas identificadas. Apesar da imunidade local não ter ainda sua forma de atuação totalmente esclarecida, no caso de infecção pelo vírus da Doença de Newcastle, experimentos com inoculação viral em sítios diferentes, demonstraram sua eficácia protetora (MALKINGSON; SMALL; 1977).

## **2.9 Vacinação contra Doença de Newcastle**

### **2.9.1 Vacinação contra Doença de Newcastle em Galinhas**

Os programas de vacinação aplicados a plantéis comerciais são geralmente regulamentados pelos planos nacionais de defesa sanitária animal e planejados diante da avaliação da situação da doença no país. A avaliação prévia de fatores



como presença da imunidade passiva materna; persistência de imunidade; via de aplicação; estado nutricional das aves; interferência de outros agentes infecciosos; tamanho dos lotes; condições climáticas; histórico e custo da vacinação é essencial para que seja organizado um programa de vacinação. Sendo assim, o plano de vacinação deve se adequar às diferentes situações de desafio sanitário em determinada região, além de ser específico para cada situação e maleável para atender às demandas existentes durante o período de produção. Diante de todas essas variáveis, é inviável a aplicação de um programa único de vacinação que seja capaz de atender de maneira geral às diferentes situações de desafios de campo (JAENISCH, 2003).

Existem no mercado vacinas vivas e vacinas inativadas, indicadas para utilização em situações distintas, apresentando vantagens e desvantagens que devem ser ponderadas antes de sua aplicação. As vacinas vivas podem ser produzidas a partir de estirpes lentogênicas com variações de patogenicidade. Obviamente, assim como a resposta imune aumenta com a aplicação de vacinas com estirpes mais patogênicas, aumenta também o risco de reações vacinais mais severas. Assim, para obter bom nível de proteção minimizando o impacto sobre as aves, os programas geralmente se baseiam no uso seqüencial progressivo de vacinas com vírus cada vez mais patogênico, ou vacinas vivas seguidas de vacinas inativadas. Vacinas inativadas são utilizadas principalmente em matrizeiros, para garantir a transferência de imunidade das reprodutoras para a progênie, e em criatórios de poedeiras comerciais, que têm vida mais longa. Essas vacinas têm como principal inconveniência necessidade de aplicação por meio de injeção individual (ALEXANDER, 1991). A vacinação de galinhas em

criações para subsistência tem sido objeto de estudo. A utilização de vacinas termoestáveis, aplicadas por via ocular, tem demonstrado resultados positivos, e parece ser uma alternativa viável em regiões onde a manutenção da vacina refrigerada é complicada (NASSER et al 2000).

### **2.9.2 Vacinação contra Doença de Newcastle em Avestruzes**

A longevidade, a forma de criação e o tamanho dos animais têm sido apontados como fatores importantes a serem considerados como diferenciais na avaliação das causas de limitações do sucesso na vacinação de avestruzes, especialmente quando comparados aos problemas relacionados aos programas de vacinação de galinhas (ALEXANDER, 2000).

Algumas pesquisas têm demonstrado a capacidade de algumas vacinas induzirem resposta protetora em avestruzes. VERWOERD (2000) avaliou a eficácia e risco da aplicação da vacina inativada La Sota. Animais vacinados foram avaliados durante seis meses. O período de viremia observado em aves vacinadas pré-abate foi de 9 a 11 dias e aparentemente as aves não carregavam o vírus em seus tecidos após este período.

O risco de transmissão de amostras velogênicas por meio da exportação de carne de avestruzes de áreas endêmicas motivou a realização de experimentos visando avaliar a produção de anticorpos contra o vírus. Blignaut et al (2000) demonstraram que a vacina La Sota viva, aplicada por via ocular, ou a vacina La Sota inativada, aplicada por via subcutânea, são bem toleradas pelas aves.

Verificaram também que a inoculação de diferentes volumes de vacina, em animais com idade entre 2,5 a 14 meses, gerava resposta dose-dependente. Os resultados destes estudos demonstraram que a implantação de procedimentos adequados de vacinação garante a segurança da não transmissão por meio da carne de avestruzes. Como o vírus não persiste nos músculos de aves imunizadas após o período inicial de viremia, a vacinação de aves pelo menos um mês antes do abate e uma inspeção ante-mortem rigorosa, podem prevenir a transmissão da Doença de Newcastle (HUCHZERMEYER, 1997).

No Brasil, a vacinação sistemática contra a Doença de Newcastle é facultativa, não sendo recomendada sua utilização em ratitas, salvo se a situação epidemiológica local a indicar (MAPA, 2003).

## **2.10 Diagnóstico laboratorial**

O diagnóstico laboratorial da Doença de Newcastle é essencial para dar suporte na decisão de imposição de medidas de controle a serem tomadas diante da suspeita de surto. Uma vez que os sinais clínicos e as lesões causadas pela infecção não são patognomônicos, e diante da variação de amostras e hospedeiros, a realização de provas laboratoriais é fundamental para confirmação da ocorrência da doença e para determinação da patogenicidade da amostra. A detecção direta do vírus pode ser efetuada por imunohistoquímica, imunoperoxidase e hibridização "in situ" (BROWN et al, 1999). O isolamento e identificação do vírus são considerados método de diagnóstico definitivo (ALEXANDER, 1991).

### **2.10.1 Isolamento e Caracterização Viral**

Apesar do vírus da Doença de Newcastle se propagar em muitos sistemas de cultura de células, a utilização de ovos embrionados de galinha é praticamente universal, para a realização do isolamento viral. Ovos embrionados livres de agentes específicos (SPF) com 9 a 11 dias de incubação são inoculados na cavidade alantóica com material suspeito tratado com antibióticos. Os ovos são incubados e a morte dos embriões é verificada a cada 12 horas. Ovos com embriões mortos têm seu fluido cório-alantóico coletado e procede-se o teste da atividade hemaglutinante. Em caso de reação positiva, realiza-se a prova de inibição da hemaglutinação com soro positivo padrão para determinação da especificidade. Se o vírus da Doença de Newcastle é encontrado, a identificação do isolado pode ser efetuada por meio da técnica de neutralização viral e a caracterização obtida por meio de testes de patogenicidade, inoculando aves susceptíveis ou ovos embrionados (CUNNINGHAM, 1966; HANSON, 1980; ALEXANDER; MANVELL, 2002).

### **2.10.2 Técnicas moleculares**

As técnicas moleculares possibilitaram um grande avanço na caracterização dos patótipos das amostras do vírus da Doença de Newcastle, destacando-se a hibridização de ácidos nucleicos, análise de RNA genômico viral e o uso de anticorpos anti-peptídeos de regiões HN (hemaglutinina-neuraminidase) e F (proteínas de fusão) (YUSOFF; TAN, 2001).

Vários tipos de PCR, incluindo PCR-RFLP e PCR convencional com hibridização com sondas de oligonucleotídeos, têm sido desenvolvidos nos últimos anos para diagnóstico da Doença de Newcastle (KANT *et al*, 1997; GOHM *et al*, 2000; ALDOUS *et al*, 2001). O PCR com hibridização é o que apresenta maior sensibilidade, porém a mutação em sítios reconhecidos pelas sondas pode gerar falsos negativos, criando a necessidade da utilização de várias sondas e tornando o teste mais trabalhoso e caro (ALI; REINOLDS, 2000; ALDOUS *et al*, 2001). Pham *et al* (2005) desenvolveram PCR em tempo real para detecção de infecção pelo vírus da Doença de Newcastle, com tempo médio de realização de uma hora e de fácil execução. As técnicas moleculares de diagnóstico 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).

### **2.10.3 Técnicas sorológicas**

A presença de anticorpos específicos no soro fornece poucas informações a respeito da amostra infectante, mas pode ser suficiente para definição de estratégias de controle e extremamente útil para confirmar o sucesso de programas de vacinação. Uma ampla variedade de testes foi desenvolvida para detectar anticorpos contra o vírus da Doença de Newcastle, entre eles a imunodifusão radial, hemólise radial, neutralização em placa e a inibição da hemaglutinação (HI) (ALEXANDER; MANVELL, 2002). Dentre todos os testes padronizados, o teste de HI é ainda o teste sorológico convencional utilizado

como referência, apesar de existirem falhas na reprodutibilidade entre laboratórios (FOLITSE et al, 1998).

O ELISA tem substituído a reação de HI como técnica sorológica de escolha para monitoramentos e estudos de soroprevalência da Doença de Newcastle, principalmente devido à possibilidade de automação e à disponibilidade de kits comerciais padronizados. Entretanto, com as vacinas utilizadas atualmente, é impossível diferenciar aves infectadas e aves vacinadas (YUSOFF; TAN, 2001). Existem vários relatos de desenvolvimento de ELISA e de ELISA modificados baseados na utilização do vírus como antígeno com resultados variáveis em termos de sensibilidade, especificidade e correlação com HI (MIERS et al, 1983; SNYDER et al, 1983; WILSON et al, 1984).

A utilização de testes sorológicos para ratitas tem sido abordada por vários autores, mas não existe consenso com relação à aplicabilidade das técnicas utilizadas para galinhas. Apesar da inibição da hemaglutinação ser a técnica recomendada pela OIE, há descrição da possibilidade de ocorrência de hemaglutinação inespecífica de soro de outras espécies com hemácias de galinha e sugestão da utilização de hemácias da mesma espécie da amostra teste. A alternativa para laboratórios que não dispõem de hemácias da mesma espécie seria a pré-adsorção com hemácias de galinha (OIE, 1996).

Allwright (1996) comparando os testes HI e ELISA padronizado com conjugado biotinilado produzido em coelho, considerou que a ocorrência de falsos negativos era extremamente alta no teste de HI e sugeriu que o ELISA deveria ser

utilizado para detecção de anticorpos contra Doença de Newcastle em avestruzes. Williams et al (1997) compararam o ELISA indireto desenvolvido por eles para detecção de anticorpos contra o vírus da Doença de Newcastle em avestruzes e o teste de HI. Encontrando uma alta incidência de falsos negativos no teste de HI, os autores submeteram as amostras a pré-tratamento, aquecendo a 56°C e incubando posteriormente com kaolin, mas verificaram perdas da sensibilidade do teste. No entanto, Cadman et al (1997) também utilizando o tratamento prévio do soro para evitar reações inespecíficas na técnica de HI, relataram uma boa correlação com o ELISA desenvolvido, apesar de identificarem também queda da sensibilidade relacionada ao pré-tratamento do soro.

Outros autores, no entanto, obtiveram bons resultados utilizando HI para detecção de anticorpos contra o vírus da Doença de Newcastle em avestruzes. Koch et al (1998) relataram resultados bastante próximos utilizando as técnicas HI, ELISA com conjugado anti-avestruz biotilado e neutralização viral (VN).

Bolte et al (1999) também descreveram correlação excelente entre VN e HI, sugerindo que os dois métodos poderiam servir para monitoramento vacinal nestes animais. No entanto, a utilização da VN como técnica de rotina tem como limitação o fato de ser laboriosa, além de demandar tempo e exigir a manutenção de vírus vivo no laboratório.

Sousa et al (2000) desenvolveram ELISA de bloqueio em fase líquida para detecção e quantificação de anticorpos para Doença de Newcastle em avestruzes

e emas, utilizando o teste de HI como referência e também verificaram excelente correlação entre as duas técnicas.

Atualmente não existe no mercado kit de ELISA comercial ou conjugado produzido por empresas de imunorreagentes para uso em avestruzes.



### **3. Justificativa para esta investigação**

A Doença de Newcastle constitui-se numa das enfermidades mais importantes para a avicultura em todo o mundo. O impacto econômico, relacionado a perdas na produção e à limitação da comercialização, demanda vigilância epidemiológica constante, buscando a erradicação da doença e a manutenção da condição de área livre da enfermidade. A avicultura industrial brasileira ocupa papel de destaque mundial e depende do desenvolvimento de estratégias de controle eficientes para esta doença, que devem estar baseadas em informações relativas à situação no campo e na caracterização das amostras circulantes. A criação de avestruzes é uma atividade em franca expansão no país e no estado da Bahia, com pretensão de acesso ao mercado mundial. A susceptibilidade desta espécie ao vírus da Doença de Newcastle e as diferenças relacionadas à epidemiologia e à patogenia, quando comparadas com galinhas, requerem monitoramento constante, utilizando ferramentas confiáveis e práticas, visando incrementar as medidas de biossegurança.

## **4. Objetivos**

### **4.1 Objetivo Geral:**

- Padronizar e comparar métodos de diagnóstico da Doença de Newcastle em avestruzes e mensurar a sua prevalência no estado da Bahia e São Paulo.

### **4.2 Objetivos específicos:**

- Avaliar a eficiência das técnicas sorológicas Inibição da Hemaglutinação (HI) e ELISA no diagnóstico da Doença de Newcastle em avestruzes.
- Verificar a presença de anticorpos contra a Doença de Newcastle em avestruzes de plantéis dos estados da Bahia e São Paulo.
- Desenvolver testes sorológicos imunoenzimáticos para o diagnóstico da Doença de Newcastle.

## **5. Material e Métodos**

### **5.1 Soros de avestruzes criadas do estado da Bahia**

Amostras séricas de 340 avestruzes, provenientes de diferentes criatórios distribuídos em várias regiões no estado da Bahia, foram avaliadas para verificação da presença de anticorpos contra o vírus da Doença de Newcastle. Os animais selecionados pertenciam a diferentes faixas etárias e não apresentavam sinais clínicos. Os soros foram armazenados a -20°C até o momento da utilização.

### **5.2 Soros de avestruzes criadas no Estado de São Paulo**

Amostras séricas de 140 avestruzes, de diferentes idades e sem sinais clínicos, criadas em propriedades no estado de São Paulo, foram avaliadas para verificação da presença de anticorpos contra o vírus da Doença de Newcastle. Os soros foram armazenados a -20°C até o momento da utilização.

### **5.3 Amostras com sorologia comprovada (“padrões-ouro”)**

Amostras séricas de nove avestruzes comprovadamente positivas, através do isolamento do VDN e amostras de nove avestruzes comprovadamente negativa, sadias nas quais o referido patógeno não foi isolado foram usadas para a definição de parâmetros como sensibilidade, especificidade, valor preditivo e determinação do ponto de corte de cada teste sorológico. As amostras foram gentilmente cedidas pelo MAPA (LANAGRO – Campinas).

#### **5.4 Preparo do extrato antigênico**

Foram utilizados três preparados antigênicos para os testes sorológicos:

- Para os testes de inibição de hemaglutinação usou-se o antígeno fornecido pelo LANAGRO - Campinas, obtido de material da cavidade alantóide de ovos embrionados infectados com o mesmo vírus, estirpe La Sota inativada padronizada;

- Para a sensibilização das placas de microtitulação, para o “western blotting” utilizou-se como antígeno a vacina viva atenuada produzida pelo Laboratório BIOVET<sup>®</sup>, onde o material liofilizado para 100 doses imunizantes foi ressuspenso em 0,5 mL de água destilada, adicionado tween-20 num percentual final de 1%, submetido a três ciclos de aquecimento a 56°C em banho-Maria por 15 minutos e congelamento a -20 °C por igual tempo. Para os testes “ELISA” este material foi dialisado por uma noite contra tampão PBS 0,15M, pH 7,2 e a seguir por três horas com tampão carbonato-bicarbonato 0,5M, pH 9,6.

- Para a impregnação de membranas de nitrocelulose para o “dot-ELISA”, utilizou-se como antígeno a vacina viva estirpe La Sota produzida pelo Laboratório BIOVET<sup>®</sup>, onde o material liofilizado para 100 doses imunizantes foi ressuspenso em 0,5 mL de água destilada e aquecido a 56°C por 15 minutos em banho-Maria.

#### **5.5 Preparo do conjugado anti-IgG de avestruz**

A preparação do conjugado anti-IgG de avestruz teve início com a imunização de dois caprinos.

### **5.5.1 Produção de anti-IgG de avestruz em caprinos**

Como mencionado acima, utilizou-se dois caprinos adultos, os quais foram imunizados com IgG de avestruz. Os protocolos da imunização e obtenção de IgG de avestruz são descritos a seguir.

### **5.5.2 Obtenção de IgG de avestruz**

Ao volume de 3 ml de um “pool” de soros de três avestruzes adicionou-se 1,5 ml de uma solução saturada de sulfato de amônia, sob leve agitação, à temperatura ambiente, por uma hora. Após centrifugação por 30 minutos, a 2000g, desprezou-se o sobrenadante e o precipitado foi ressuspensão em 1 mL de PBS 0,15M, pH 7,2. Este material foi dialisado por 24 horas, contra 1 L do mesmo PBS, com três trocas durante este período. A seguir, este material foi submetido à cromatografia em coluna de QAE-Sephadex A-50, eluída com tampão EDTA 0,5M, pH 8,5. Coletou-se o eluato correspondente ao primeiro pico determinado espectrofotometricamente ( $A_{280}$ ), procedendo-se a seguir a dosagem de proteína.

### **5.5.3 Imunização de caprinos**

Dois caprinos machos adultos foram imunizados de acordo com o seguinte esquema: inoculação no dia zero de 500 ng de IgG de avestruz num volume ajustado para 0,5 mL, homogeneizado com igual volume de Adjuvante Completo de Freund e injetado via sub-cutânea, em dois pontos; inoculação de igual quantidade de antígeno nos dias 14, 28 e 42, sendo que homogeneizado em igual quantidade de Adjuvante Incompleto de Freund. No dia 50 coletou-se sangue para obtenção do soro e testou-se por imunodifusão bidimensional, com soro

total de avestruz e com a fração obtida em cromatografia. Em ambos os casos foi possível se observar a linha de precipitação. O soro de um dos animais reagiu apenas com o soro de avestruz não diluído, enquanto que o outro apresentou título de 1:8.

#### **5.5.4 Preparo e titulação do conjugado**

O conjugado foi preparado segundo o protocolo modificado a partir da técnica original de Wilson e Nakane (1978), como se segue: dissolveu-se 4mg de peroxidase tipo VI (SIGMA) em 1mL de água destilada. Adicionou-se 0,2mL de periodato de sódio 0,1M recém-preparado. A mistura foi agitada à temperatura ambiente por 20 minutos e dialisada por 24 horas contra 500mL de tampão acetato 1mM pH 4,4, a 4°C. Após a diálise, o pH foi ajustado para 9,0 com 20mL de tampão carbonato de sódio 0,2M pH 9,5. A seguir adicionou-se 8mg de IgG caprina anti-IgG de avestruz, purificada segundo o mesmo protocolo descrito anteriormente para a purificação de IgG de avestruz com a adição de nova precipitação em sulfato de amônia, agora a 50%, ressuspensa em 1mL de tampão carbonato de sódio 0,01M pH 9,5 e dialisada contra 500 mL deste último tampão, A mistura foi agitada por duas horas à temperatura ambiente, após o que adicionou-se 0,1mL de boridrato de sódio a 4mg/mL. Após 2 horas de repouso a 4°C, dialisou-se este material contra PBS 0,01M, pH7,4, por 24 horas, a 4°C. Adicionou-se 10 mg de soroalbumina bovina para cada 1 mg de conjugado. Procedeu-se a titulação deste conjugado pela técnica “ELISA” indireto conforme descrição no primeiro protocolo apresentado adiante, utilizando-se dois soros positivos e outros dois negativos, cedidos pelo LANAGRO (Campinas, SP) diluídos 1:100, 1:200, 1:400 e 1:800 e incubados em poços de placas de

poliestireno sensibilizadas com antígenos do vírus da Doença de Newcastle, marca IDDEX. Testou-se o referido conjugado nas diluições de 1:500, 1:1.000, 1:2.000, 1:5.000 e 1:10.000, obtendo-se valores capazes de melhor discriminar quando diluídos em 1:2.000.

## **5.6 Protocolos dos testes “ELISA” desenvolvidos**

Os ensaios imunoenzimáticos desenvolvidos são todos do tipo ELISA indireto, onde se busca a detecção de anticorpos da classe IgG. Os resultados obtidos em cada teste desenvolvido / modificado foram comparados entre si.

**5.6.1.** O protocolo do ELISA IDDEX-CAV (kit IDDEX e conjugado anti-avestruz) foi assim executado: placas de poliestireno já sensibilizadas com NDV, marca “IDDEX”, foram incubadas com 50 µl/poço dos soros testes diluídos a 1:400 em PBS-T contendo 1% de leite desnatado durante 45 minutos. Após seis lavagens em PBS-T, adicionou-se às placas 50µL de imunoglobulina de cabra anti-imunoglobulina G de avestruz, conjugada à peroxidase, preparada conforme protocolo já descrito e diluída a 1:2.000 em PBS-T. As placas foram incubadas a 37°C por 45 minutos. Em seguida foram novamente lavadas seis vezes em PBS-T e incubadas por 15 minutos à temperatura ambiente e ao abrigo da luz, com 50 µL/poço da solução reveladora tendo como cromógeno o TMB e já preparada pelo mencionado fabricante “IDDEX”. A reação foi interrompida acrescentando 25 µL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 4 N. A leitura foi feita em leitor de ELISA marca “BIO RAD” modelo PR 2100, com filtro de 620 nm de comprimento de onda da luz.

**5.6.2** No protocolo do ELISA GUILDHAY utilizou-se todos os reagentes do “kit” da marca “GUILDHAY” e os intervalos de incubação também seguiram as indicações do referido fabricante, a saber, 30 minutos à temperatura ambiente tanto para a incubação das amostras como para o conjugado e 15 minutos para o cromógeno. Este “kit” utiliza um conjugado com fosfatase alcalina e como cromógeno, uma solução de monofosfato de fenolftaleína (PMP), com a leitura sendo feita em leitor automático de ELISA, marca “BIOTEK”, com filtro de 550 nm de comprimento de onda da luz.

**5.6.3** O protocolo do ELISA IDDEX foi realizado com o “kit” da marca “IDDEX”, utilizando-se todos os seus reagentes e seguindo-se também todas as suas recomendações de execução, com a leitura final realizada em fotolorímetro automático para ELISA, marca “BIO RAD” modelo PR 2100, com filtro de 620 nm de comprimento de onda da luz.

**5.6.4** O protocolo do ELISA GUILDHAY-CAV (kit GUILDHAY e conjugado anti-avestruz) foi executado segundo a descrição do item 5.7.1, ou seja, utilizando o mesmo conjugado com peroxidase anti-IgG de avestruz, tendo como diferença a utilização de placas dos “kits” marca “GUILDHAY”, já sensibilizadas com antígenos do vírus da Doença de Newcastle pelo fabricante. A leitura foi feita em fotolorímetro automático para ELISA, marca “BIO RAD” modelo PR 2100, com filtro de 620 nm de comprimento de onda da luz.

**5.6.5** O protocolo do ELISA LASAB, foi desenvolvido no Laboratório de Sanidade Avícola da Bahia (LASAB), utilizando como antígeno a vacina viva



estirpe La Sota, produzida pelo Laboratório “BIOVET”, tratado conforme descrição anterior e diluído em 1:500 em tampão carbonato-bicarbonato 0,05M, pH 9,6, colocado em placas de poliestireno “high binding”, marca “COSTAR”, no volume de 100  $\mu$ L em cada um dos seus 96 poços e deixado a 4°C overnight. Após duas lavagens com PBS-T, colocou-se as amostras, o “branco” e os controles positivos e negativos (estes últimos em duplicatas) num volume de 50  $\mu$ L/poço a 1:200 em PBS-T contendo 1% de leite desnatado durante 45 minutos. Após seis lavagens em PBS-T20, adicionou-se às placas 50 $\mu$ L de imunoglobulina de cabra anti-imunoglobulina G de avestruz, conjugada à peroxidase e diluída a 1:2.000 em PBS-T contendo leite desnatado a 1%. As placas foram incubadas a 37°C por 45 minutos. Em seguida foram novamente lavadas seis vezes em PBS-T20 e incubadas por 15 minutos à temperatura ambiente e ao abrigo da luz, com 50  $\mu$ L/poço da solução reveladora tendo como cromógeno o TMB e já preparada pelo mencionado fabricante “IDDEX”. A reação foi interrompida acrescentando 25  $\mu$ L de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 4 N. A leitura foi feita em leitor de ELISA (marca “BIO RAD”, modelo PR 2100), usando filtro de 620 nm de comprimento de onda.

### **5.7 Protocolo do “Dot-ELISA”**

O antígeno preparado conforme descrição anterior foi aplicado sobre membrana de nitrocelulose (marca “MILLIPORE”), num volume de 25  $\mu$ L, utilizando-se equipamento “Biodot” (marca “BIO RAD”), submetido à pressão negativa com bomba de vácuo, por tres minutos. A seguir a membrana foi bloqueada com PBS 0,15M, pH7,2, contendo 5% de leite em pó desnatado (“MOLICO, NESTLÉ”), por 2 horas, à temperatura ambiente e sob agitação. Após

três lavagens de 5 minutos com PBS-T, cada ponto de aplicação do antígeno foi recortado e incubado em tubo de ensaio, com 0,5 mL dos soros positivos e negativos diluídos 1:100 com PBS-T contendo 1% de leite em pó desnatado (“MOLICO, NESTLÉ”), por uma hora à temperatura ambiente, sob agitação. Após lavagem como já descrito, procedeu-se incubação por uma hora sob agitação, com antissoro anti-IgG de avestruz conjugado com peroxidase, diluído em 1:1000 com o mesmo diluente dos soros. Após nova lavagem colocou-se 0,5 mL do cromógeno 4-cloro-1-naftol, dissolvido em metanol e diluído em PBS, contendo 0,33 µL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por mL. A reação foi interrompida aos 10 minutos, através de lavagem com água destilada. Foram testadas as 140 amostras provenientes do estado de São Paulo.

## **5.8 Protocolo do SDS- PAGE e do “Western Blotting”**

### **5.8.1 SDS-PAGE**

O preparado antigênico (vírus da Doença de Newcastle vivo, estirpe La Sota, preparado vacinal da marca BIOVET<sup>®</sup>), após haver sido ressuspenso e tratado conforme descrito anteriormente, foi fracionado por eletroforese vertical em gel desnaturante de poliacrilamida. O sistema utilizado foi o descontínuo, composto de um gel de empilhamento preparado com acrilamida-bisacrilamida 4% (29,2%-0,8%), SDS 10%, persulfato de amônia 0,05%, temed 0,05%, tris-HCl 0,5 M, pH 6,8. Esse gel foi aplicado sobre gel de corrida constituído por acrilamida-bisacrilamida 12% (29,2%-0,8%), 1,5M tris-HCl pH8.8, SDS 10% , persulfato de Amônia 0,05%, temed 0,05%, tris-HCl 1,5 M, pH 8,8. A eletroforese foi realizada em tampão de migração contendo tris 0,124 M, glicina 0,96 M, SDS 0,5%, pH

8.3, durante 3 horas, numa corrente de 30mA. As proteínas presentes no gel foram visualizadas por coloração com azul de coomassie R-250 (marca BIO RAD).

### **5.8.2. "Western Blotting"**

Soros selecionados por "ELISA" foram analisados por "Western Blotting" com o extrato antigênico para a análise do perfil de reconhecimento antigênico das bandas protéicas. As proteínas separadas, foram transferidas eletricamente para uma membrana de nitrocelulose (marca MILLIPORE), em tampão de transferência contendo tris 0,25 M, glicina 0,193 M e 20% de metanol. Após a transferência, a membrana foi corada com uma solução aquosa de vermelho Ponceau S (marca SIGMA), descorada em água destilada e cortada em tiras de aproximadamente 3mm. As tiras, após descoloração, foram bloqueadas com leite desnatado a 5% em PBS-T0, por 12 horas a 4º C. Os soros foram diluídos, de acordo com o padronizado, a 1:50 em PBS-T contendo 1 % de leite desnatado ("MOLICO, NESTLÉ"), durante 1 hora a 37º C. A seguir foram incubadas durante 1 hora, a 37º C, com conjugado de cabra anti-IgG de avestruz, previamente descrito, diluído 1:100 em PBS-T contendo 1% de leite desnatado. A revelação das bandas foi feita com de 4-cloro-1-naftol e peróxido de hidrogênio, em PBS. Alternativamente realizou-se esta mesma técnica substituindo-se o antissoro anti-IgG de avestruz pelo antissoro anti-IgG de galinha marcado com peroxidase (marca "BETHYL").

A leitura foi realizada verificando-se as bandas coradas e comparando-as ao perfil de peso molecular para descrição do padrão de reconhecimento dos soros de galinha e de avestruz.

### **5.9 Técnica da Inibição da Hemaglutinação**

Para determinação dos títulos de anticorpos anti-NDV no soro de avestruzes foi utilizada a técnica da microtitulação beta em microplacas rígidas de 96 poços, com fundo em “U” (marca CORNING). Diante da possibilidade de interferência de reações inespecíficas, decorrentes de hemaglutininas presentes no soro de avestruzes foi realizada microtitulação com soro previamente incubado com hemácias de galinha. Suspensão de hemácias de galinha a 10% foi adicionada a cada amostra de soro, permanecendo sob incubação durante 30 minutos a 4°C, de acordo com o recomendado por Allan et al (1978). Procedeu-se então a centrifugação, coletando-se o soro e realizando a técnica da microtitulação beta em seguida. Com auxílio de pipetador multicanal calibrado (25 µL) efetuou-se a titulação do antígeno, de maneira a obter-se 4 unidades hemaglutinantes em 25 µL. Amostras de soros foram testadas em duplicata, submetidas à diluição seriada em razão 2 (até 1:4096), em PBS pH 7,2, na microplaca, e incubadas com 25 µL do antígeno, durante 30 minutos a 4°C. Posteriormente foi adicionada suspensão de hemácias a 1% e efetuada nova incubação por mais 30 minutos a 4°C e procedeu-se à leitura após deposição total de hemácias nos controles. O título foi expresso mediante o número de unidades hemaglutinantes usadas pela recíproca de maior diluição do soro que foi capaz de inibir completamente a hemaglutinação e transformado em log de base 2, segundo a técnica publicada por Doretto Júnior (1997). Os testes também foram

realizados com hemácias de avestruzes e hemácias de perus, sendo o antígeno titulado para cada um dos ensaios realizados. O ponto de corte utilizado para este teste foi de 1:8, de acordo com o preconizado pela OIE.

### 5.10 Análise Estatística

O ponto de corte para os testes de ELISA foi definido através da curva ROC (*receiver operator characteristic*) ou curva operacional relativa. Esta análise se baseia numa curva onde são colocados os valores de corte, tendo no eixo das ordenadas a sensibilidade e no eixo das abscissas a taxa de falso positivo (ou seja, 1 menos o valor da especificidade). O ponto de corte ideal é o que permite uma maior especificidade, sem perda de sensibilidade (GREINER *et al.*, 1995; XU & GREINER, 1997). Os cálculos da sensibilidade e especificidade foram feitos usando-se os resultados obtidos com os soros testados, de acordo com as fórmulas seguintes:

$$\text{Sensibilidade} = \frac{\text{positivos verdadeiros}}{\text{positivos verdadeiros} + \text{falsos negativos}}$$

$$\text{Especificidade} = \frac{\text{negativos verdadeiros}}{\text{falsos positivos} + \text{negativos verdadeiros}}$$

Os valores preditivos positivo e negativo foram de acordo com as fórmulas:

$$\text{Valor preditivo positivo} = \frac{\text{positivos verdadeiros}}{\text{positivos verdadeiros} + \text{falsos positivos}}$$

$$\text{Valor preditivo negativo} = \frac{\text{negativos verdadeiros}}{\text{falsos negativos} + \text{negativos verdadeiros}}$$

Os testes estatísticos utilizados foram feitos através do programa SPSS versão 9.0.

## 6. Resultados

### 6.1 Comparação entre os testes ELISA utilizados para diagnóstico da Doença de Newcastle em Avestruzes

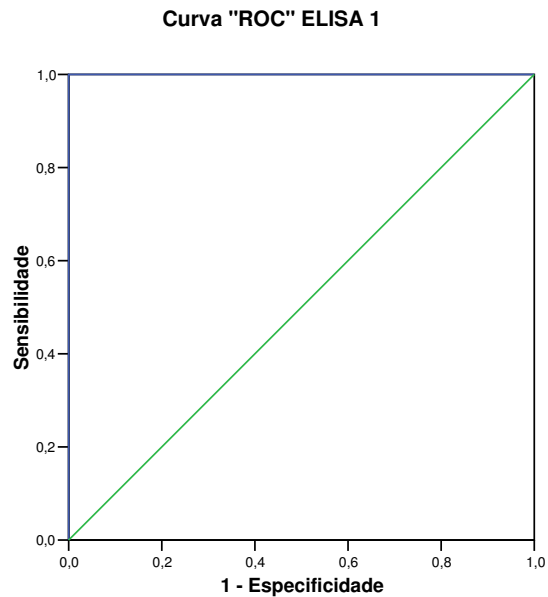
A tabela 1 apresenta os resultados obtidos com os soros positivos e negativos, determinados como padrão-ouro, ou seja, pelo isolamento do vírus da Doença de Newcastle, para os cinco testes ELISA.

**Tabela 1** – resultados obtidos com os cinco testes ELISA para as 9 amostras positivas e 9 negativas

	<b>Soros positivos padrão-ouro</b>	<b>Soros negativos padrão-ouro</b>	<b>Total</b>
<b>Positivos no ELISA</b>	<b>9</b>	<b>0</b>	<b>9</b>
<b>Negativos no ELISA</b>	<b>0</b>	<b>9</b>	<b>9</b>
<b>Total</b>	<b>9</b>	<b>9</b>	<b>18</b>

A avaliação destes resultados indica valores de 100% para a sensibilidade, especificidade, para o valor preditivo positivo e para o valor preditivo negativo para todos os cinco testes ELISA padronizados.

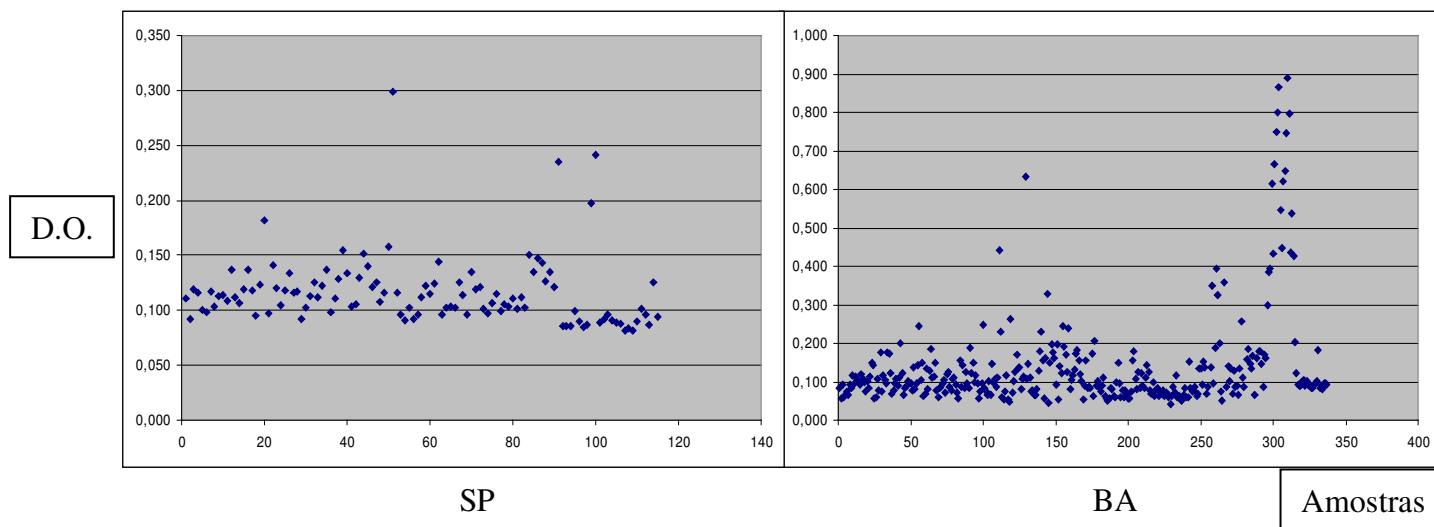
A figura 1 apresenta a curva “ROC” que também se comportou da mesma maneira para todos os mencionados testes, que permitiu a definição do ponto de corte.



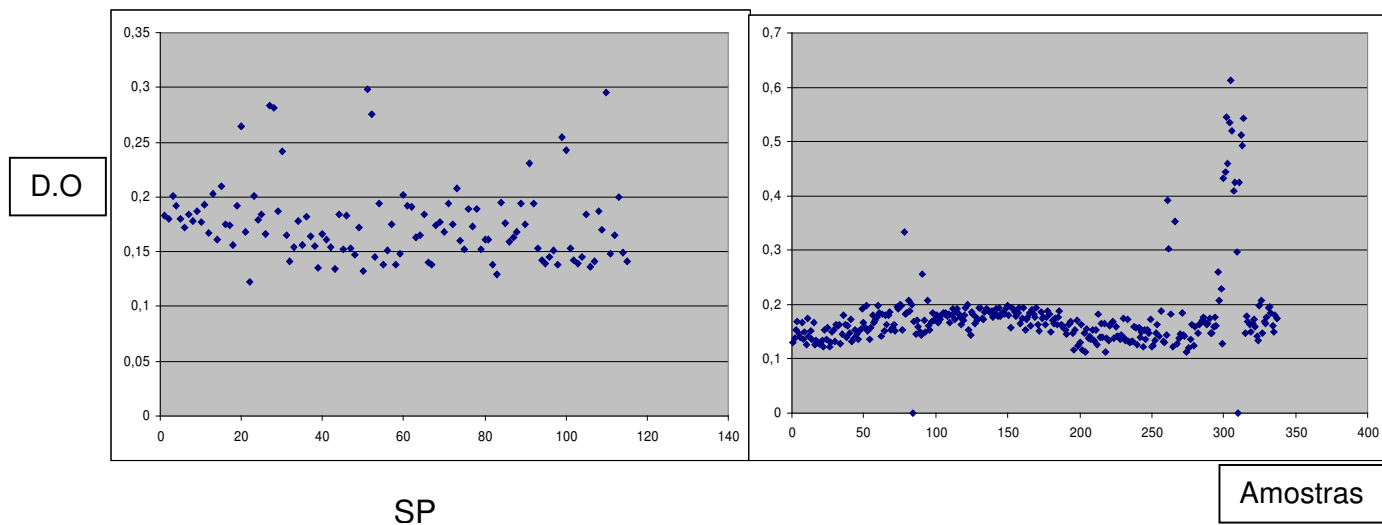
**Figura 1** – curva “ROC” obtida utilizando-se os dados dos testes ELISA.

A comparação entre os ELISA utilizados revelou boa correlação entre os cinco testes desenvolvidos. Devido ao elevado número de amostras testadas utilizou-se cinco placas para cada tipo de ELISA desenvolvido, estabeleceu-se o coeficiente de variação entre as placas de cada teste, obtendo-se sempre percentuais abaixo de 9,3%. Foram determinados os pontos de corte para cada teste usando como referência soros de animais comprovadamente positivos e negativos. Para o ELISA LASAB o ponto de corte para obtenção de 100% de sensibilidade e especificidade foi de 0,165. Para o ELISA GUILDHAY, o ponto de corte definido para a mesma sensibilidade e especificidade foi 0,234. Para o ELISA IDDEX, o ponto de corte para sensibilidade e especificidade de 100% foi 0,190. Para o ELISA GUILDHAY com conjugado anti-avestruz (GUILDHAY-CAV), o ponto de corte foi 0,275 e para o ELISA IDDEX com conjugado anti-avestruz (IDDEX-CAV) o ponto de corte foi 0,150. Tomando como base os soros

As figuras 2, 3, 4, 5 e 6 mostram a distribuição de D.O. obtida com cada um dos cinco testes ELISA padronizados, quando os soros dos animais da Bahia e de São Paulo foram testados.

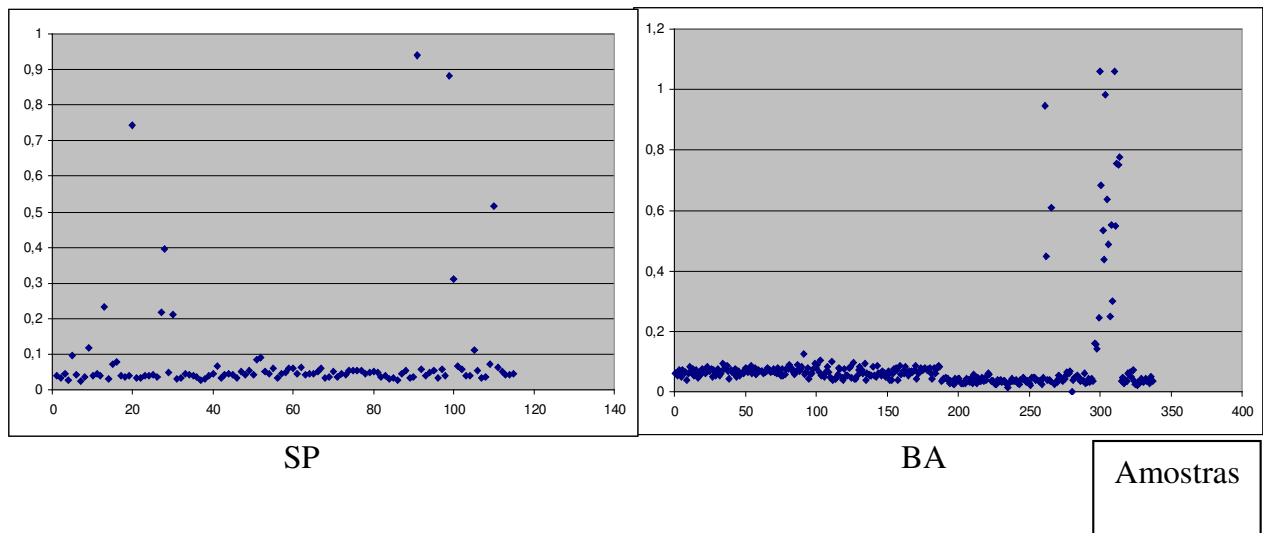


**Figura 2.** Distribuição da reatividade sérica (densidade óptica) das amostras de avestruzes de plantéis da Bahia e de São Paulo, com o ELISA LASAB (ponto de corte de 0,165).

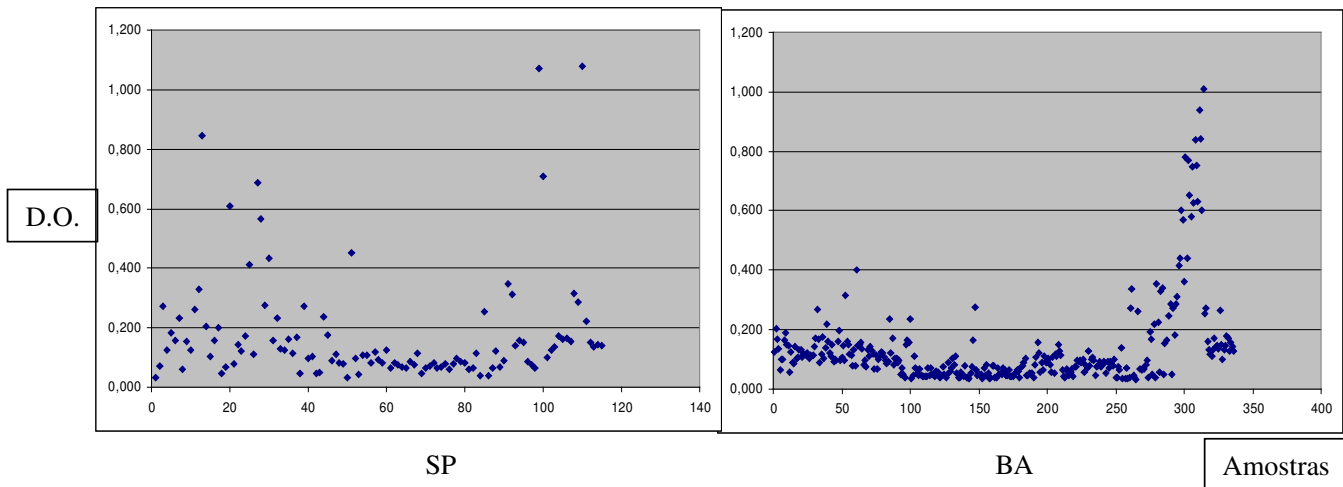


**Figura 3.** Distribuição da reatividade sérica (densidade óptica) das amostras de avestruzes de plantéis da Bahia e de São Paulo, com o ELISA GUILDHAY (ponto de corte de 0,234).

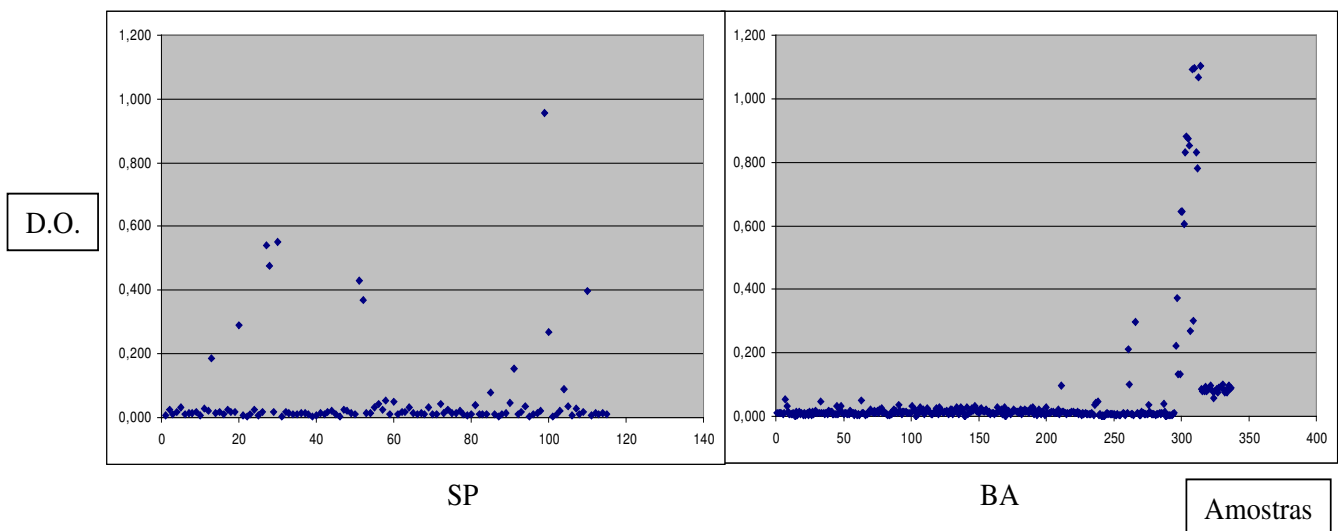




**Figura 4.** Distribuição da reatividade sérica (densidade óptica) das amostras de avestruzes de plantéis da Bahia e de São Paulo, com o ELISA IDDEX (ponto de corte de 0,190).



**Figura 5.** Distribuição da reatividade sérica (densidade óptica) das amostras de avestruzes de plantéis da Bahia e de São Paulo, com o ELISA GUILDHAY-CAV (ponto de corte de 0,275).



**Figura 6.** Distribuição da reatividade sérica (densidade óptica) das amostras de avestruzes de plantéis da Bahia e de São Paulo, com o ELISA IDDEX-CAV (ponto de corte de 0,150).

A comparação entre os ELISA desenvolvidos, com a determinação do número de amostras com resultados positivos e negativos e os valores de *kappa* demonstraram maior concordância entre os testes GUILDHAY e IDDEX com conjugado antiavestruz (IDDEX CAV) e IDDEX e IDDEX com conjugado antiavestruz (IDDEX CAV), como pode ser observado na tabela 2.

**Tabela 2.** Concordância entre os vários ELISA desenvolvidos para diagnóstico da Doença de Newcastle em avestruzes.

<b>Comparação ELISA</b>	<b>Positivos nos dois testes</b>	<b>Negativos nos dois testes</b>	<b>Valor de <i>kappa</i></b>
GUILDHAY x IDDEX	30	423	k=0,95
GUILDHAY x IDDEX CAV	32	424	k=0,98
GUIDHAY x GUIDHAY CAV	33	412	k=0,82
GUILDHAY x LASAB	29	424	k=0,93
IDDEX x IDDEX CAV	31	425	k=0,98
IDDEX x GUILDHAY CAV	31	412	k=0,79
IDDEX x LASAB	31	426	k=0,96
IDDEX CAV x GUILDHAY CAV	32	412	k=0,80
IDDEX CAV x LASAB	29	425	k=0,95
GUILDHAY CAV X LASAB	29	412	k=0,75

## 6.2 Comparação entre os testes de Inibição da Hemaglutinação para diagnóstico da Doença de Newcastle em Avestruzes utilizando hemácias de diferentes espécies

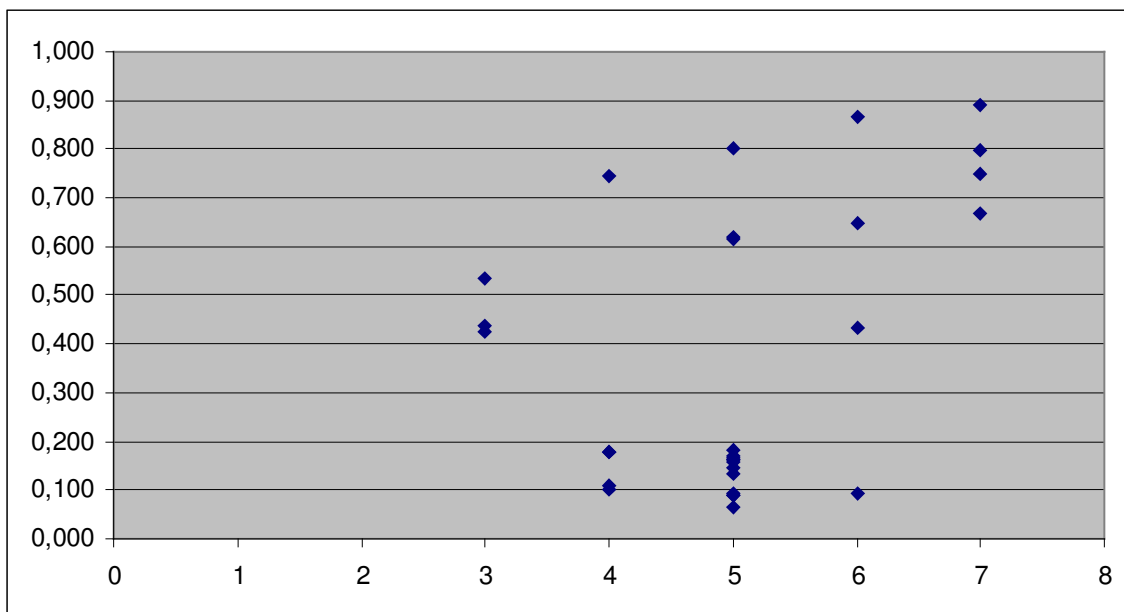
A comparação entre os resultados obtidos no testes da Inibição da Hemaglutinação, utilizando hemácias de espécies diferentes demonstrou concordância entre hemácias de avestruzes e hemácias de perus. No entanto, a comparação entre os resultados obtidos para hemácias das demais espécies demonstrou baixa concordância

**Tabela 3.** Concordância entre os vários HI desenvolvidos para diagnóstico da Doença de Newcastle em avestruzes.

Comparação HI	Positivos nos dois testes	Negativos nos dois testes	Valor de kappa
Hemácias galinha x galinha soro inativado	42	32	k=0,11
Hemácias galinha x avestruz	42	0	k=0,00
Hemácias galinha x peru	42	9	k=0,03
Hemácias galinha soro inativado x avestruz	155	0	k=0,00
Hemácias galinha soro inativado x peru	155	9	k=0,39
Hemácias avestruz x peru	178	9	k=1,00

### 6.3 Comparação entre os ELISA e a Inibição da Hemaglutinação para diagnóstico da Doença de Newcastle em Avestruzes

A comparação entre os ELISA e a Inibição da Hemaglutinação demonstrou baixa concordância entre os testes, como pode ser observado na tabela 4. Quando resultados obtidos com hemácias de avestruzes e aqueles obtidos com hemácias de galinha ou hemácias de galinha em soro pré-incubado (inativação) são comparados, verifica-se melhor correlação com uso de hemácias da mesma espécie. Verifica-se também maior correlação entre resultados obtidos com hemácias de avestruz e os obtidos após pré-incubação do soro e uso de hemácias de galinha. Apesar da variação nos valores de títulos obtidos na Inibição da hemaglutinação, todas as amostras positivas no ELISA LASAB apresentavam títulos acima de 1:8 na HI (figura 7).



**Figura 7.** Correlação entre a densidade óptica obtida no ELISA LASAB e os títulos obtidos na Inibição da Hemaglutinação utilizando-se hemácias de avestruz.

**Tabela 4** – Concordância entre testes HI e ELISA para diagnóstico da Doença de Newcastle em Avestruzes

**Concordância HI e ELISA utilizados para Doença de Newcastle em avestruzes**

Comparação ELISA x HI diferentes hemácias	Positivos nos dois testes	Negativos nos dois testes	kappa
LASAB x Hemácias Galinhas	31	181	k=0,24
LASAB x Hemácias Galinhas soro tratado	42	48	k=0,08
LASAB x Hemácias Avestruz	57	1	k=0,00
IDDEX x Hemácias Galinhas	19	206	k=0,24
IDDEX x Hemácias Galinhas soro tratado	19	51	k=0,39
IDDEX x Hemácias Avestruz	18	1	k=0,00
GUILDHAY x Hemácias Galinhas	17	206	k=0,22
GUILDHAY x Hemácias Galinhas soro tratado	17	51	k=0,00
GUILDHAY x Hemácias Avestruz	16	1	k=0,00
IDDEX CAV x Hemácias Galinhas	17	206	k=0,22
IDDEX CAV x Hemácias Galinhas soro tratado	17	51	k=0,02
IDDEX CAV x Hemácias Avestruz	17	1	k=0,00
GUILDHAY CA V x Hemácias Galinhas	22	200	k=0,23
GUILDHAY CAV x Hemácias Galinhas soro tratado	25	47	k=0,01
GUILDHAY CAV x Hemácias Avestruz	32	1	k=0,00

## 6.4 Soroepidemiologia da Doença de Newcastle em avestruzes da Bahia e de São Paulo

A partir da determinação do ponto de corte em cada um dos ELISA utilizados foi determinada a porcentagem de animais positivos, levando aos resultados observados na tabela 5.

**Tabela 5.** Resultados obtidos nos testes de ELISA utilizados para diagnóstico da Doença de Newcastle em avestruzes.

Procedência Amostras	ELISA LASAB	ELISA GUILDHAY	ELISA GUILDHAY CAV	ELISA IDEXX	ELISA IDEXX CAV
<b>Bahia</b>	339/61 (17,9%)	338/17 (5%)	339/38 (11,2%)	313/19 (6%)	339/20 (5,9%)
<b>São Paulo</b>	105/5(4,7%)	106/9 (8,5%)	116/15 (12,9%)	106/9 (8,5%)	115/11 (9,6%)

Considerando o ponto de corte para o teste de Inibição da Hemaglutinação 3,0 (expresso em  $\log_2$ ), correspondendo a diluição de 1:8, conforme recomendações de ALEXANDER (1989) e CADMAN *et al*, 1997, títulos iguais ou maiores foram considerados positivos e títulos menores foram considerados negativos, temos os resultados visualizados na tabela 6.

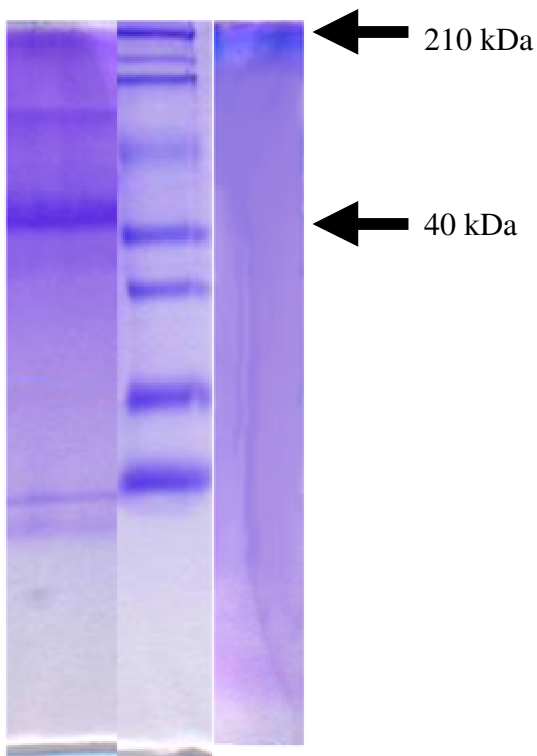
**Tabela 6.** Resultados obtidos nos testes de Inibição da Hemaglutinação utilizados para diagnóstico da Doença de Newcastle em avestruzes.

Procedência Amostras	HI hemácias galinhas	HI hemácias galinhas (soro inativado)	HI hemácias avestruz	HI hemácias perú
<b>Bahia</b>	321/108 (33,6%)	328/277 (84,4%)	327/327 (100%)	120/128 (93,7%)
<b>São Paulo</b>	112/26 (23,2%)	116/111 (95,7%)	116/111 (96,5%)	57/56 (98,3%)

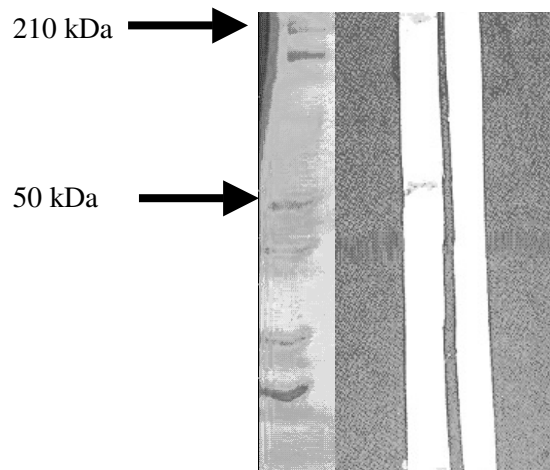
## 6.5 Resultados obtidos no “Western blotting”

O antígeno utilizado nos testes “ELISA” quando submetido a SDS-PAGE evidencia as seis bandas mostradas na figura 10. Quando o material ressuspenso é ultrafiltrado com membrana com ponto de corte de 100 kDa, observa-se na eletroforese mencionada apenas a banda com PM igual ou maior do que 210 kDa, que possivelmente deve ser o próprio vírus ou a sua proteína L.

A observação do “Western blotting” (figura 11) evidencia a referida banda com PM igual ou maior que 210 kDa e duas outras, fracamente reativas, com PM entre 50 e 60 kDa.



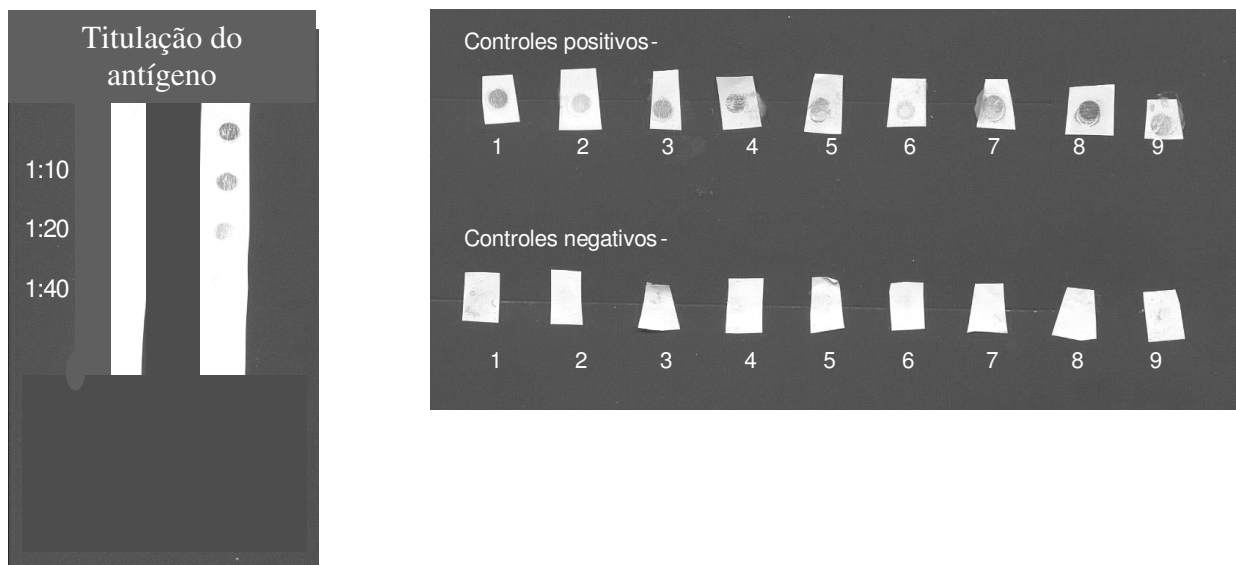
**Figura 8.** Fotografia da eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE 12%, coloração com azul de coomassie). Da esquerda para a direita, visualiza-se a migração dos componentes protéicos do antígeno conforme preparação referida para esta técnica, reconhecimento das bandas pelos soros deste antígeno e do antígeno ultrafiltrado.



**Figura 9.** Fotografia “Western blotting” mostrando o reconhecimento por soro de animal com sorologia positiva. À direita, padrões de peso molecular (PM).

#### 6.4 Resultados obtidos no Dot-ELISA

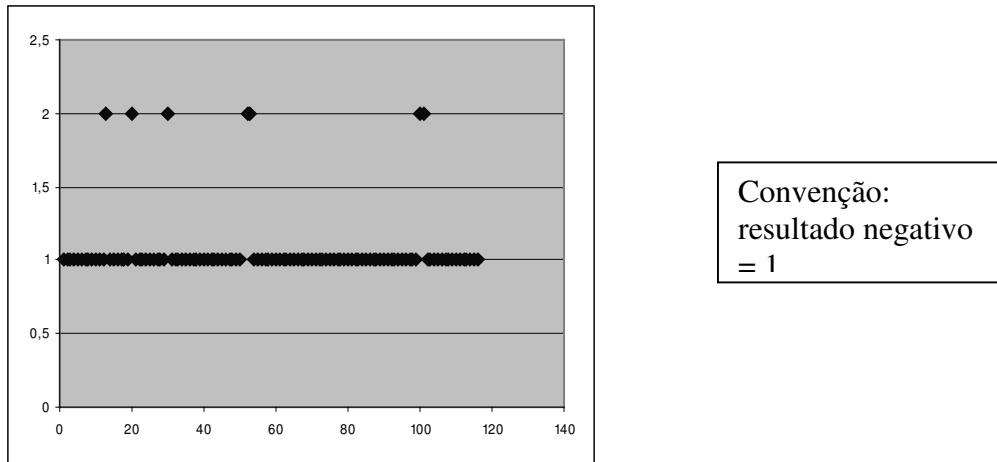
O antígeno foi diluído de modo seriado, de 1:10 até 1:640. O soro controle positivo (soro 1 LANAGRO) apresentou reação até 1:40. Quando os nove soros controles positivos e os nove controles negativos (LANAGRO) foram testados com o antígeno diluído 1:10, obteve-se o resultado demonstrado na figura 12.



**Figura 10.** Fotografia da reação obtida no Dot-ELISA . À esquerda visualização da reação com concentrações diferentes do antígeno. À direita, reação obtida nos controles positivos e negativos



A figura 13 apresenta a distribuição das reações positivas e negativas através desta técnica, para os 116 soros oriundos de São Paulo.



**Figura 11.** Resultados obtidos com o Dot-ELISA realizado com os soros de avestruzes do Estado de São Paulo.

## **7. Discussão**

A importância econômica da Doença de Newcastle para a Avicultura Industrial torna seu controle e prevenção obrigatórios em plantéis comerciais, seja por meio de programas de vacinação, seja por monitoramento sorológico. Nesse sentido, vários kits comerciais para detecção e quantificação de anticorpos contra a Doença de Newcastle em galinhas estão disponíveis no mercado.

O crescimento da avicultura no Brasil e a susceptibilidade da espécie a esta enfermidade criam a demanda urgente para o desenvolvimento de testes sorológicos sensíveis e específicos que permitam a identificação de animais positivos, permitindo a adoção de estratégias de prevenção e controle adequadas, não só visando um perfeito estabelecimento desta cultura no país, como também buscando a proteção da importante e consolidada avicultura brasileira.

### **7.1 Referente à comparação entre a Inibição da Hemaglutinação e o ELISA Indireto para o diagnóstico da Doença de Newcastle em avestruzes.**

A aplicação de ELISA indireto no sorodiagnóstico da Doença de Newcastle e sua comparação com o teste da Inibição da Hemaglutinação têm sido amplamente relatados na literatura. Apesar da Inibição da Hemaglutinação ser considerada como teste oficial para esta enfermidade, o teste ELISA vem se tornando cada vez mais popular, devido à sua maior especificidade e sensibilidade (WILLIAMS et al, 1997), porém os kits comerciais são produzidos para uso específico em galinhas. Neste sentido, a produção do conjugado anti-

IgG de avestruz para utilização em kits comerciais disponíveis no mercado, capazes de produzir resultados confiáveis, tornam-se uma alternativa interessante para estudos soroepidemiológicos e para programas de defesa animal.

Os resultados obtidos nos testes de Inibição de Hemaglutinação foram bastante variados, a depender da hemácia utilizada. Baseando-se no ponto de corte de 1:8 ( $2^3$ ) segundo o preconizado pelo Programa Nacional de Sanidade Avícola (MAPA 2003) e pela OIE, e utilizando hemácias de avestruz, observou-se que 100% de amostras foram positivas no estado da Bahia e 96,5% no estado de São Paulo. No entanto, a utilização de hemácias de galinhas reduziu o número de amostras positivas para 33,06% na Bahia e para 23,2% em São Paulo.

A execução da HI com uso de hemácias da mesma espécie do soro a ser testado, têm sido associada a resultados mais confiáveis e, desta forma, recomendada por vários autores que descreveram problemas de padronização quando da utilização de eritrócitos de outras espécies (YUSOFF e TAN, 2001; BEARD; WILKES, 1985). Outro fator que pode levar a falhas na execução desta técnica para avestruzes é a presença de proteínas hemaglutinantes não específicas no soro destas aves. Neste caso, a não inativação destas hemaglutininas pode produzir resultados falso-negativos, inviabilizando a aplicação da técnica para monitoramento de plantéis (GRIMES, 2002). Estas reações não específicas seguramente ocorreram nos experimentos aqui relatados, uma vez que a pré-adsorção com hemácias de galinhas induziu a um aumento considerável no número de animais positivos. A porcentagem de

amostras positivas passou de 33,06 % para 84,7% na Bahia e de 23,2% para 95,7% em São Paulo.

A utilização de hemácias de avestruzes seria o indicado para evitar tais interferências. Contudo, o emprego de hemácias dessas aves tem como limitação principal a dificuldade de manutenção de animais desse porte em locais de fácil acesso para os laboratórios de diagnóstico, dificultando sobremaneira a coleta de sangue para preparo das hemácias. A descrição de bons resultados obtidos com a utilização de hemácias de perus, feita por YOUNG et al, 1989, levou à sua inclusão nestes experimentos. A comparação dos resultados alcançados com a aplicação destas hemácias com os obtidos com hemácias de avestruz demonstraram uma excelente correlação ( $k=1,0$ ), sugerindo a possibilidade da substituição de hemácias de avestruz por hemácias de perus, viabilizando a execução da técnica em laboratórios, especialmente aqueles distantes de áreas com criatórios de avestruzes.

A reprodutibilidade da Inibição da Hemaglutinação parece sofrer influências distintas, além da relação espécie doadora de hemácias e espécie cujo soro será testado. Mesmo sendo reconhecida como uma técnica de fácil execução, simples e de baixo custo, vários relatos de problemas na reprodução de resultados têm sido descritos, atribuídos principalmente a erros na diluição e diferenças relacionadas ao tipo de antígeno. Paramixovírus pertencentes aos sorotipos PMV-1 e PMV-3 são antigenicamente relacionados e podem interferir na interpretação dos resultados da HI (KOUWENHOVEN, 1993).

Estudo realizado por Alexander e Manvell (2002) visando avaliar a capacidade de laboratórios da Comunidade Européia em identificar antígeno de Paramyxovirus aviários e verificar a reprodutibilidade do teste HI para diagnóstico da Doença de Newcastle revelou uma ampla diferença nos resultados obtidos pelos 35 laboratórios analisados.

Portanto, apesar da HI poder ser considerada uma técnica interessante em algumas situações particulares, sua associação a testes que apresentem maior especificidade e sensibilidade, pode garantir maior credibilidade dos resultados. Relatos observados na literatura dão sustentação a esta afirmativa. A comparação entre o teste HI e a soroneutralização para diagnóstico da Doença de Newcastle foi realizada por Koch e Van Roozelaar (1994). Avaliando um total de 147 amostras de soro de avestruzes, os autores encontraram número de amostras negativas no teste HI tão baixo que impossibilitou a estimativa da sensibilidade e especificidade. Por outro lado, os autores também verificaram que algumas amostras com índices de neutralização relativamente altos eram negativas no teste HI. Assim, o valor preditivo do teste HI para detecção de anticorpos em termos de plantel foi questionado e os autores sugeriram que as avestruzes negativas no HI oriundas de um lote onde alguns animais foram positivos só deveriam ser removidas, comercializadas ou exportadas se permanecessem negativas duas a três semanas após terem sido isoladas dos animais positivos.

No presente trabalho, a comparação entre a densidade óptica obtida nos ELISA e os títulos de anticorpos observados na HI demonstram que amostras

positivas no ELISA também eram positivas na HI com todos os tipos de hemácias testados. No entanto, amostras com títulos semelhantes na HI apresentavam absorbância diferente no ELISA. Resultados semelhantes foram descritos por Richtzenhain et al (1993) que estudaram a relação entre o ELISA indireto e a inibição da hemaglutinação. Trabalhando com 240 amostras de soro de galinhas poedeiras submetidas a diferentes sistemas de vacinação contra a Doença de Newcastle, esses autores verificaram alta correlação entre os dois testes sorológicos, mas relataram também ampla variação entre a absorbância observada no ELISA para amostras que apresentavam o mesmo título na Inibição da Hemaglutinação.

Cadman et al (1994) desenvolveram um conjugado anti-avestruz e usaram em testes comerciais para detectar patógenos em soro de 149 avestruzes criadas em 9 propriedades no Zimbábue, verificando 23% de animais reagentes para Doença de Newcastle, com o mesmo kit comercial usado no presente trabalho (IDDEX FLOCKCHECK®). Apesar desses autores afirmarem que os anticorpos anti-galinha não reagem com imunoglobulinas de avestruzes, os testes realizados com os kits GUILDHAY e IDDEX sem modificação, empregando os componentes fornecidos pelo fabricante, ou seja, conjugados anti-galinha, demonstraram a capacidade de reconhecimento de anticorpos de avestruzes. No entanto, estudos posteriores devem ser desenvolvidos com vistas a garantir essa condição.

A alta correlação entre os ELISA indiretos utilizados neste trabalho demonstrou que o processo de purificação do antígeno para sensibilização da microplaca (ELISA LASAB) foi eficaz, não havendo, aparentemente, dispersão do

epitopo alvo, uma preocupação colocada por alguns autores (CZIFRA et al, 1996; CARDOSO et al, 1998). No entanto, a utilização do antígeno bruto para sensibilização da placa (vírus integral) impede que haja a discriminação de animais vacinados ou infectados, pois os anticorpos produzidos em ambas as situações identificam esse antígeno. A solução para esta questão seria a utilização de vacinas recombinantes de sub-unidades ou com marcadores, que possibilitariam a sua identificação por meio de testes de ELISA com placas sensibilizadas com proteínas antigênicas específicas.

Ainda sobre os testes ELISA aqui desenvolvidos, deve ser salientado que embora esteja claro as suas expressivas capacidades resolutivas, os valores de 100% encontrados para sensibilidade, especificidade, e valores preditivos, certamente decorreram do número de amostras padrão-ouro (9 amostras positivas e 9 negativas). Isto se justifica pela dificuldade em se encontrar animais comprovadamente positivos por meio do isolamento do agente etiológico e dentre as perspectivas de aperfeiçoamento destes testes sorológicos, está a busca de mais amostras padrão-ouro, que permitam uma análise mais precisa.

## **7.2 Soroepidemiologia da Doença de Newcastle nos plantéis avaliados**

Ainda não existem vacinas contra a Doença de Newcastle registradas para utilização em avestruzes no Brasil. A vacinação de avestruzes contra a Doença de Newcastle é facultativa, mas recomenda-se que seja realizado estudo epidemiológico para definir a necessidade de sua aplicação (MAPA, 2003). As amostras testadas neste trabalho foram obtidas de criatórios cujos proprietários

afirmaram não terem utilizado quaisquer vacinas em seus animais. Pode-se supor, portanto, que os anticorpos encontrados no soro destas avestruzes sejam decorrentes de contato com amostras de campo, ou de resposta a amostras procedentes de vacinas empregadas para proteger galinhas, criadas na mesma propriedade ou em propriedades vizinhas. Apesar da recomendação de isolamento das avestruzes e da possibilidade de galinhas servirem como fontes de infecção da Doença de Newcastle para avestruzes ser bastante conhecida, a condição de promiscuidade entre as duas espécies é bastante comum (HUCHZERMEYER, 1997; LEY et al, 2000).

A presença de anticorpos contra o vírus da Doença de Newcastle em avestruzes não vacinadas também foi observada na Suécia e Holanda (KOCH et al, 1998). A comparação de resultados obtidos nos testes de soroneutralização, inibição da hemaglutinação e no ELISA, revelou 66,35%, 61,6% e 57,8% de amostras positivas respectivamente. Os autores advertiram para a importância da definição de um programa contínuo de estudos sorológicos para analisar a soroconversão e a persistência de anticorpos nessas aves. Mais uma vez, a grande ocorrência de reações não específicas na HI, levando a falsos negativos e a perda da sensibilidade do teste como efeito da inativação de hemaglutininas inespecíficas foi relatada.

A avaliação de amostras de soro de avestruzes originadas de plantéis americanos, localizados em Ohio e Indiana, revelou que mais de 57% dos animais apresentavam reação positiva na inibição da hemaglutinação para Doença de Newcastle (93 amostras do total de 211). Nenhum sinal clínico foi observado nos



animais positivos na sorologia (LEY et al, 2000). Essas informações estão de acordo com as descrições feitas por Huchzermeyer, 1997. Esse autor relata que a Doença de Newcastle geralmente causa baixa mortalidade em avestruzes e ressalta que a apresentação de sinais clínicos está condicionada à idade dos animais, à via de infecção e à patogenicidade do vírus.

Estudos para avaliação da potência de vacinas e de sua capacidade em induzir proteção têm sido realizados por alguns pesquisadores (VERWOERD et al, 1999, CZIFRA et al, 1998). No caso da Doença de Newcastle, verificou-se a influência da via de administração da vacina no título de anticorpos medido por meio da Inibição da Hemaglutinação. Assim, a correlação entre proteção e o título na HI é baixa e depende de vários fatores (HORVÁTH et al, 1999). Czifra et al, 1998, demonstraram que o ELISA é bem mais eficaz que a reação de HI para definição de proteção, uma vez que aves com títulos de 1:2 ou 1:4 neste teste apresentavam boa proteção contra desafio.

### **7.3 Reconhecimento das frações protéicas no Western Blotting**

Embora sejam escassos os estudos do reconhecimento de antígenos deste vírus mesmo em galinhas e inexistem estudos sobre este reconhecimento por soros de avestruzes, supõe-se que as bandas encontradas neste estudo devam corresponder às proteínas M e F, que possuem pesos moleculares com valores dentro da mencionada faixa (LI et al, 1980; YUSOFF; TAN, 2001; HOMHUAN et al, 2004).

As principais proteínas isoladas no SDS-PAGE estão descritas na literatura. As quatro proteínas mais abundantes incluem a hemaglutinina-neuraminidase (HN) e os glicopeptídeos de fusão que formam duas populações com projeções externas no envelope lipoprotéico dos vírions; as proteínas do nucleocapsídeo (NP) e as proteínas não glicosiladas da membrana (M). As proteínas menos abundantes incluem as proteínas Large (L), com peso molecular de aproximadamente 220 kDa, proteínas de 47 kDa de localização desconhecida e fragmentos da nucleoproteína, variando de 43 a 53 kDa. (EVANS; KINGSBURY, 1969).

As frações reconhecidas no “Western Blotting” pelos soros controle e por animais positivos, com peso molecular acima de 210 kDa e as duas bandas entre 50 e 60 kDa, devem corresponder respectivamente à proteína L e à proteína de fusão F. A presença de anticorpos contra a proteína F parece estar relacionada com a capacidade de prevenir a infecção e a disseminação do vírus (TOYODA et al, 1988).

No entanto, estudos posteriores são necessários para avaliar a importância desses achados e comparar com outras condições de eletroforese, uma vez que grande parte das proteínas do vírus da Doença de Newcastle apresenta comportamento de migração diferente a depender da ruptura das pontes de dissulfeto (SMITH; HIGHTOWER, 1981).

#### **7.4 O Dot-ELISA e sua possível aplicação no diagnóstico da Doença de Newcastle em avestruzes**

O planejamento e a definição de estratégias para controle da Doença de Newcastle dependem do desenvolvimento de técnicas de diagnóstico apropriadas. Algumas limitações observadas na aplicação da Inibição da hemaglutinação, entre elas a interferência das hemácias e a possibilidade de hemaglutininas não específicas gerarem resultados incorretos têm levado à utilização do ELISA em diversas variações, sempre apresentando boa sensibilidade e especificidade (ALEXANDER, 1991). Apesar destas vantagens, o ELISA não é adotado mais amplamente devido à indisponibilidade de leitores de ELISA, especialmente em regiões com menos recursos.

O Dot-ELISA se apresenta como uma alternativa interessante, apresentando especificidade e sensibilidade semelhante ao ELISA, podendo ser interpretado sem a necessidade de equipamentos sofisticados. Alguns autores descreveram o desenvolvimento de dot-blots para detecção de antígeno (SNYDER et al, 1983) e para diagnóstico da Doença de Newcastle em galinhas (FOLITSE et al, 1997). A utilização para soros de avestruzes ainda não havia sido descrita. Entretanto, para o diagnóstico de outras doenças de interesse em Medicina Veterinária este teste tem sido desenvolvido e preconizado em todo o mundo, inclusive aqui no Brasil, como por exemplo, o desenvolvido por Pinheiro et al (2005).

Os resultados obtidos neste trabalho indicaram a possibilidade da utilização do dot-ELISA e demonstraram alta correlação com os resultados observados nos ELISA desenvolvidos ou modificados. A utilização desta técnica na triagem de plantéis é promissora, uma vez que em galinhas foi demonstrada a capacidade de detecção de infecção precoce. Investigações posteriores podem esclarecer a possibilidade da utilização para levantamentos sorológicos e avaliação de animais em quarentena.

## 8. Conclusões

- O estudo da Inibição da Hemaglutinação para diagnóstico da Doença de Newcastle em avestruzes revelou a necessidade da utilização de hemácias da mesma espécie ou, alternativamente, de perus.
- Os testes de ELISA indiretos desenvolvidos, ou modificados, utilizados para detecção de anticorpos contra o vírus de Newcastle apresentaram boa correlação entre si. Observou-se, entretanto, baixa correlação entre ELISA e Inibição da Hemaglutinação.
- As amostras analisadas, provenientes de criatórios baianos e de criatórios paulistas, revelaram a presença de anticorpos contra o vírus da Doença de Newcastle, tanto no teste HI como nos testes ELISA, mesmo sem haver sido feito qualquer relato de vacinação, reforçando a hipótese de que as avestruzes estão em contato com vírus vacinal ou de campo.
- O Western Blotting pode ser ferramenta de apoio para a avaliação de resposta imune contra a enfermidade.
- O Dot-ELISA desenvolvido se apresenta como uma alternativa de diagnóstico sorológico acessível para regiões com pouca disponibilidade de equipamentos.

## 9. Referências

ALDOUS, E. W.; ALEXANDER, D. J. Detection and differentiation of Newcastle disease virus (avian paramyxovirus type1). **Avian Pathology**, Oxfordshire, v. 30, p.117– 128, 2001.

ALDOUS, E. W.; COLLINS, M. S.; McGOLDRICK, A.; ALEXANDER, D. J. Rapid pathotyping of Newcastle disease virus (NDV) using fluorogenic probes in a PCR assay. **Veterinary Microbiology**, v.80, n.3, p.201-212, June 6, 2001.

ALEXANDER, D.J. Newcastle Disease and other paramyxovirus infections. In: CALNEK, B.W.; BARNES, H.J.; BEARD, C.W.; REID, W.M.; YOURDER, H.W. **Diseases of Poultry**. 9 ed. Ames: Iowa State University Press, 1991, p. 496-519.

ALEXANDER, D. J. Newcastle Disease. In: A laboratory manual for isolation and identification of avian pathogens, 3. ed. Kenett Square, PA: American Association of Avian Pathologists, 1989, p.114-120.

ALEXANDER, D. J. Newcastle disease in ostriches (*Struthio camelus*) - a review. **Avian Pathology**. Oxfordshire, v.29, n.2, p.95-100, Apr. 2000.

ALEXANDER, D. J. Newcastle Disease. **British Poultry Science**, v.42, p.5-22, 2001.

ALEXANDER, D. J.; MANVELL, R. J.; LOWINGS, J. P.; FROST, K. M.; COLLINS, M. S.; RUSSELL, P. H.; SMITH, J. E. Antigenic diversity and similarities detected in avian paramyxovirus type 1 (Newcastle disease virus) isolates using monoclonal antibodies. **Avian Pathology**, Oxfordshire, v. 26, n.2, p. 399-418, June 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, jun. 2002

ALI, A.; REINOLDS, D. L. A multiplex reverse transcription-polymerase chain reaction assay for Newcastle disease virus and avian pneumovirus (Colorado strain). **Avian Diseases**, v.44, n.4, p.938-943, Oct./Dec. 2000.

ALLAN, W. H., LANCASTER J. E.; TOTH, B. Newcastle Disease Vaccines. **Food and Agriculture Organization of the United Nations**, Rome, Italy, 1978.

ALLWRIGHT, D. Diseases and other veterinary aspects. Viruses encountered in intensively reared ostriches in southern Africa. In: DEEMINS, D. C. (Ed). **Proceedings of improving our Understanding of Ratites in a Farming Environment**. Manchester: Oxford Print Centre, 1996. p. 27-33.

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

BEARD, C.W.; WILKES, W.J. A comparison of Newcastle disease hemagglutination-inhibition test results from diagnostic laboratories in the south-eastern United States **Avian Diseases** v.29, p.1048-56, 1985.

BEARD, C. W., HANSON, R. P. Newcastle disease. In: HOFSTAD, M. S.; BARNES, H. J.; CALNEK, B. W.; REID, W. M.; YONDER, H. W. (Ed.), **Diseases of poultry**. 8<sup>th</sup> ed. Ames: Iowa State University Press, p. 425-470.1984.

BLIGNAUT A.; BURGER, W. P.; MORLEY, A. J.; BELLSTEDT, D. U.; Antibody responses to La Sota strain vaccines of Newcastle Disease Virus in ostriches (*Struthio camelus*) as detected by enzyme-linked immunosorbent assay. **Avian Diseases**, v. 44, n.2, p.390-398, 2000.

BOLTE, A. L.; MEURER, J.; KALETA, E. F. Avian host spectrum of avipoxviruses. **Avian Pathology**, Oxfordshire, v.28, p.415–432, 1999.

BROWN, C.; KING, D. J.; SEAL, B. S. Pathogenesis of Newcastle disease in chickens experimentally infected with viruses of different virulence. **Veterinary Pathology**, Oxfordshire, v.36, p.125-132, 1999.

CADMAN, H. F.; KELLY, P. J.; DE ANGELIS, N. D.; ROHDE, C.; COLLINS, N.; ZULU, T. Comparison of enzyme-linked immunosorbent assay and haemagglutination inhibition test for the detection of antibodies against Newcastle disease virus in ostriches (*Struthio camelus*). **Avian Pathology**, Oxfordshire, v. 26, n.2, p. 357-363, Jun 1997.

CARDOSO, T.C.; SOUSA, R.L.M.; ALESSI, A.C.; MONTASSIER, H.J.; PINTO, A.A. A double antibody sandwich ELISA for rapid diagnosis of vírus infection and to measure the humoral response against infectious bursal disease on clinical material. **Avian Pathol**, v. 27, p. 450-4, 1998.

COOPER, R.G. Bacterial, fungal and parasitic infections in ostrich (*Struthio camelus*). **Animal Science Journal**. v. 76, n. 2, p. 97-106, 2005.

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

CUNNINGHAM, C. H. **A Laboratory Guide in Virology**, 4<sup>Th</sup> ed. Minneapolis: Bergees Publishing Co. 1966.

CZIFRA, G.; NILSSON, M.; ALEXANDER, D.J.; MANVELL, S.; KECSKEMÉTI S.; ENGTRÖM, B.E. Detection of PMV-1 specific antibodies with a monoclonal antibody blocking enzyme-linked immunosorbent assay. **Avian Pathol.**, v. 25, p. 691-703, 1996.

D'ÁVILA, Z. S. **Novos Tempos, Novos Rumos**. abr./maio 2005. Disponível em: <<http://www.aepe.com.br/ac=read&nid=114>>. Acesso em: 20 jun. 2006.



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

DORETTO JÚNIOR, L.; PAULILLO, A.C. Doença de Newcastle. In: Andreatti Filho, R.L. (Ed), Saúde Aviária e doenças. 1ª ed. São Paulo: Editora Roca. 2006. p. 168-81.

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

EVANS, M.J.; KINGSBURY, D.W. Separation of Newcastle disease virus proteins by polyacrylamide gel electrophoresis. **Virology** v.37, p.597-604, 1969.

FIELDS, B.N. **Fundamental Virology** 3ª ed. Philadelphia, PA: Lippincott-Raven, 1996, 1339p.

FOLITSE, R.; HALVORSON, D. A.; SIVANANDAN, V. A dot immunoblotting assay (Dot Blot ELISA) for early detection of Newcastle Disease antibodies in chickens. **Avian Diseases**, v.42, p.14-19, 1998.

FOREIGN ANIMAL DISEASES. The Gray Book, part IV – Velogenic Newcastle disease, 1998. Disponível em: <[http://www.vet.uga.edu/gray\\_book/FAD/vnd.htm](http://www.vet.uga.edu/gray_book/FAD/vnd.htm)>. Acesso em: 19 ago. 2005.

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

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**, 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 Immunological Methods**, v.185, p.123-132, 1995.

GRIMES, S. E. **A Basic Laboratory Manual for the Small-Scale Production and Testing of I2 Newcastle Disease Vaccine** Senior Animal Production and Health Officer and Secretary of APHCA FAO Regional Office for Asia and the Pacific (RAP), 2002.

HANSON, R. P. Newcastle disease. In: HOFSTAD, M. S.; CALNEK, B. W.; HELMBLDT, C. F.; REID, W. M.; YODER, JR, H. W. (Ed), **Diseases of Poultry**. 6<sup>th</sup>. Ames: Iowa State University Press, 1972, p.619-656.

HANSON, R. P. Newcastle disease. In: Hitchner, S. B.; Domermuth, C. H.; Purchase, H. G.; Williams, J. E. (eds.), **Isolations and Identifications of Avian Pathogens**, 2<sup>nd</sup> ed. New York: American Association of Avian Pathologists, 1980, p. 63–66.

HANSON, R. P. Heterogeneity within strains of Newcastle disease. virus: Key to survival. In: Alexander, D. J. (ed.), **Newcastle Disease**, Boston: Kluwer Academic Publishers. 1988. p.113–130.

HASTENREITER, H. La maladie de Newcastle au Brésil. **Bull Off Int Epiz**, v.85, p. 813-817, 1976

HERNÁNDEZ, M. S.; MONTOYA, N. H.; ARMAS, C. D.; RODRÍGUEZ, J. A.; PÉREZ, A. D. Pesquisa serologica sobre el virus de la enfermedad de Newcastle en obreros avicolas y un grupo control. **Revista Cubana Higiene e Epidemiologia**, v.25, n.1, p.77-84, 1987.

HOMHUAN, A.; PRAKONGPAN, S.; POOMVISES, P.; MAAS, R.; CROMMELIN, D.; KERSTEN, G.; JISKOOT, W. Virosome and ISCOM vaccines against

Newcastle disease: preparation, characterization and immunogenicity. **European Journal of Pharmaceutical Sciences** v.22, p. 459–468, 2004.

HORVÁTH, E.; CZIFRA, G.; NAGY, E.; ENGSTROM, B.; MÉRZA, M. Potency test of inactivated Newcastle disease vaccines by monoclonal antibody blocking ELISA. **Vaccine** v.17, 2969-73, 1999.

HUA, Y. P.; CHAI, H. L.; YANG, S. Y.; ZENG, X. W.; SUN, Y. Primary survey of avian influenza virus and Newcastle disease virus infection in wild birds in some areas of Heilongjiang Province, China. **Journal of Veterinary Science**, v.6, n.4, p.311- 315, 2005.

HUANG, H. J.; MATSUMOTO, M. Nonspecific innate immunity against *Escherichia coli* infection in chickens induced by vaccine strains of Newcastle disease virus. **Avian Diseases**, v.44, n.4, p.790-796, Oct/Dec 2000.

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.

HUCHZERMEYER, F. W. **Ostrich Diseases**. South Africa: Agriculture Research Council, 1994, p.11-12.

HUCHZERMEYER, F. W. Velogenic Newcastle disease in ostriches in South Africa. In: DEEMINS, D. C. (Ed). **Proceedings of improving our Understanding of Ratites in a Farming Environment**. Manchester: Oxford Print Centre, 1996. p. 44.

HUCHZERMEYER, F. W. Animal health risks associated with ostrich products. **Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epizoot**, v.16, p.111-116, 1997.

ITO, N. M. K.; PRESTES, A. A.; NICIPORCIUKAS, M. C. Newcastle disease virus: some biological characteristics of twelve samples isolated in Brazil. *Rev. Fac. Med. Vet. Zoot. USP*, v.23, n.1, p.47-53, 1986.

JAENISCH, F. R. F. Biosseguridade na produção de frango no sistema agroecológico. In: **CURSO VIRTUAL SOBRE PRODUÇÃO AGROECOLÓGICO DE FRANGO DE CORTE**, 1., 2003, Concórdia/ SC. *Anais...* Concórdia: 2003, p. 43-50.

JORGE, M. A.; MARTINS, N. R. S.; RESENDE, J. S. Método caseiro. **Avicultura Industrial**, n.1075, p 20-21, 2000.

JORGENSEN, P. H.; HERZEG, J.; LOMNIEZI, B.; MANVELL, R. J.; HOLM, E.; ALEXANDER, D. J. Isolation and characterization of avian paramyxovirus type 1 (Newcastle disease) viruses from a flock of ostriches (*Struthio camelus*) and emus (*Dromaius novaehollandiae*) in Europe with inconsistent serology. **Avian Pathology**, v.27, p.352-358, 1998.

KALETA, E. F.; BALDAUF, C. Newcastle disease in free-living and pet birds. In: ALEXANDER, D. J., (ed.), **Newcastle Disease**, Boston: Kluwer Academic Publishers, 1988, p.197-246.

KANT, A.; KOCH, G.; VAN ROOZELAAR, D.J.; BALK, 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.; KING, D. K.; D. J. Protection of chickens against overt clinical disease and determination of viral shedding following vaccination with commercially available Newcastle Disease Virus vaccines upon challenge with highly virulent virus from the California 2002 exotic Newcastle disease outbreak. **Vaccine**, v.23, p.3424-3433, 2005.

KOCH, G.; VAN ROOZELAAR, D. Comparison of hemagglutination inhibition titres and neutralization indices of ostrich sera. In: Alexander, D. **Proceedings of the joint second annual meetings of the national Newcastle Disease and Avian Influenza Laboratories of Countries of European Union**, Brussels, oct, 1994.

KOCH, G.; CZIFRA, G.; ENGSTROM, B. E. Detection of Newcastle disease virus-specific antibodies in ostrich sera by three serological methods. **Veterinary Record**, v.143, p.10-12, 1998.

KOMMERS, G.D.; KING, D.J.; SEAL, B.S.; BROWN, C.C. Pathogenesis of chicken-passaged Newcastle Disease Viruses isolated from chickens and wild and exotic birds. **Avian Diseases**, v.47, n.2, p. 319-329, 2002.

KOUWENHOVEN, B. Newcastle disease. In: McFERRAN, J.B.; McNULTY, M.S. **Virus Infection of Birds**. Amsterdam. Elsevier Science, p: 341-61, 1993.

LAM, K. M. Newcastle disease virus-induced apoptosis in the peripheral blood mononuclear cells of chickens. **Journal of Comparative Pathology**, v.114, p.63–71, 1996.

LANCASTER, J. E.; A History of Newcastle Disease with Comments on its Economic Effects. **World's Poultry Science Journal**, v.32, n.2, p.167-175, May 1976.

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

LEY, E.C.; MORISHITA, T.Y.; HARR, B.S.; MOHAN, R. BRISKER, T. Serologic survey of slaughter-age ostriches (*Struthio camelus*) for antibodies to selected avian pathogens. **Avian Diseases** v. 44, 989-92, 2000.

LI, J; MIYAKAWA,T; FOX, F. Protein Organization in Newcastle Disease Virus as Revealed by Perturbant Treatment. **Journal of Virology**, v.34, n.1, p.268-271, 1980.

MALKINSON, M.; SMALL, A.P. Local Immunity against Newcastle disease virus in newly hatched chickens respiratory tract. **Infection Immunity**, v.16, n. 2, p. 587-592, 1977.

MANVELL, R.J., FROST, K. & ALEXANDER, D.J. Characterization of Newcastle disease and avian influenza viruses from ratites submitted to the International Reference Laboratory. In: **Proc. International Ratite Conference**, Manchester: C. Deeming, ed. 1996, p.45-46.

MAPA, **Programa Nacional de Sanidade Avícola- IN 2/2003**. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br>. Acesso em mar. 2006.

MAYO, M.A. 2002. Virus taxonomy. **Archive of Virology**, v.147, n.1071-1076.

McFERRAN, J. B. Control of Newcastle disease in Northern Ireland. **Proceedings – Avian Exotic Disease Control Seminar**. Glenfield: Agriculture & Fisheries, p. 16-21. 1989.

MENDES, A. A. **Regionalização ainda é polêmica e projeto é publicado no Diário Oficial da União**. fev. 2006. AEPE. Disponível em : <<http://www.aepe.com.br/?ac=read&nid=386>>. Acesso em mar. 2006.

MIERS, L. A.; BANKOWSKI, R.A.; ZEE, Y. C. Optimizing the enzyme-linked immunosorbent assay for evaluating immunity of chickens to Newcastle disease. **Avian Diseases**, v.27, n.4, p.1112-25, Oct-Dec 1983.

NAGY, E.; LOMNICZI, B. Differentiation of Newcastle disease virus strains by one-dimensional peptide mapping. **Journal of Virological Methods**, v.9, n.3, p.227-35, Nov 1984.

NASSER, M.; LOHR, J.E.; MEBRATU, G.Y.; ZESSIN, K.H.; BAUMANN, M.P.O.; ADEME, Z. Oral Newcastle disease vaccination trials in Ethiopia. **Avian Pathology**, v.29, n.1, p.27-34, 2000.

OIE. Newcastle disease. Office International des Epizooties. **Manual of Standards for Diagnostic Tests and Vaccines** 4th Ed. Paris: Office Internationale des Epizooties. p.161-169, 1996.

OLIVEIRA JÚNIOR, 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**, v.33, n.2, 2003.

OLIVEIRA JÚNIOR, J. G.; SCHIAVO, P. A.; DORETTO JÚNIOR, 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**, v.35, n. 4, 2005.

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.

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

PFITZER, S.; VERWOERD, D. J.; GERDES, G. H.; LABUSCHAGNE, A. E.; REASMUS, A.; MANVELL, R. J.; GRUND, C. Newcastle disease and avian influenza A virus in wild waterfowl in South Africa. **Avian Diseases**, v.44, p.655–660, 2000.

PHAM, H. M.; NAKAJIMA, C.; OHASHI, K.; ONUMA, M. Loop-Mediated Isothermal Amplification for Rapid Detection of Newcastle Disease Virus. **Journal of Clinical Microbiology**, v.43, p.1646-1650, 2005.

PINHEIRO, A.; COSTA, M. F. D.; PAULE, B.; VALE, V.; RIBEIRO, M. B.; NASCIMENTO, I. L. O.; SCHAER, R.; ALMEIDA, M. A. O.; MEYER, R. ; FREIRE, S. M. Serologic immunoreactivity to Neospora caninum antigens in dogs determined by indirect immunofluorescence, Western blotting and DOT-ELISA. **Veterinary Parasitology**, v. 30, n.1-2, p. 73-79, 2005.

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, Jan/Mar 2000.

RICHTZENHAIN, L.J.; PAULILLO, A.C.; PINTO, A.A.; KRONKA, S.N. Relation between the hemagglutination inhibition test and the indirect ELISA in the serologic monitoring of laying hens submitted to different systems of vaccination against Newcastle disease. **Rev. Microbiol.**, v 24, n3, p187-91, 1993.

RUSSELL, P. H.; ALEXANDER, D. J. Antigenic Variation of Newcastle Disease Virus Strains Detected by Monoclonal Antibodies. **Archives of Virology**, v.75, p.243-253, 1983.

SAMBERG, Y.; HADASH, D. U.; PERELMAN, B.; MEROZ, M. Newcastle disease in ostriches (*Struthio camelus*): field case and experimental infection. **Avian Pathology**, v.18, p.221-226, 1989.

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

SANTOS, M. S. V. **Biosseguridade em todos os níveis**. Disponível em: <http://www:aviculturaindustrial.com.br>. Acesso em: 09 set. 2005.



SEAL, B. S.; KING, D. J.; LOCKE, D. P.; SENNE, D. A.; JACKWOOD, M. W. Phylogenetic 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.

SENNE, D. A.; PEARSON, J. E.; MILLER, L. D.; GUSTAFSON, G. A. Virus isolations from pet birds submitted for importation into the United States. **Avian Diseases**, v.27, p.731-44, 1983.

SMITH G.W.; HIGHTOWER, L.E. Identification of the P proteins and other disulfide-linkes and phosphorylated proteins of Newcastle disease virus. **Journal of Virology**, v. 37, n.1, p. 256-67, 1981.

SNYDER, D. B.; MARQUARDT, W. W.; MALLINSON, E. T. Rapid serological profiling by enzyme-linked immunosorbent assay. Against Newcastle disease virus in single serum dilution. **Avian Diseases**, v.27, p.161-170, 1983.

SOUZA, R. L. M.; RODOVALHO, M. V.; GIANNONI, M. L.; MONTASSIER, H. J.; PINTO, A. A. Padronização e aplicação do método BFL-ELISA para a detecção de anticorpos contra o vírus da doença de Newcastle em emas e avestruzes. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, v. 2, p. 88, 2000.

SOUZA, R. L. M.; CARDOSO, T.C.; PAULILLO, A.C.; MONTASSIER, H. J.; PINTO, A. A. Comparação entre as técnicas de ELISA indireto, ELISA com duplo anticorpo e Inibição da Hemaglutinação na detecção de anticorpos contra o vírus da Doença de Newcastle **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, v. 1, p. 43-47, 1999.

SPRADBROW, P. B. **Thermostable Newcastle disease vaccines for use in village chickens**. 1999. In: First INFPD/FAO Electronic Conference on Scope and Effect of Family Poultry Research and Development, Guèye E. F. (Ed.) Disponível<<http://www.fao.org/waicent/faoinfo/agricult/aga/agap/lpa/fampo1/freecom10.htm>>. Acesso em: jan. 2005.

STONE-HULSLANDER, J.; MORRISON, T. G. Detection of an interaction between the HN and F proteins in Newcastle disease virus-infected cells. **Journal of Virology**, v.71, n.9, p. 6287-6295, Sept 1997.

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

TOYODA, T. GOTOH, B.; SAKAGUCHI, T.; KIDA, H.; NAGAI, Y. Identification of amino acids relevant to three antigenic determinants on the fusion protein of Newcastle disease virus that are involved in fusion inhibition and neutralization **Journal of Virology**, v.62, n.11, p. 4427-430, 1988.

TSAI, H. J.; CHANG, K. H.; TSENG, C. H.; FROST, K. M.; MANVELL, R. J.; ALEXANDER, D.J. Antigenic and genotypical characterization of Newcastle disease viruses isolated in Taiwan between 1969 and 1996. **Veterinary Microbiology**, v.104, p.19-30, 2004.

VERWOERD, D. J. Velogenic Newcastle disease epidemic in South Africa. Part II: Ostriches, waterfowl, exotic bird collections and wild birds. **South African Veterinary Medicine**, v.8, p.44-49, 1995.

VERWOERD, D. J.; OLIVIER, A.; GUMMOW, B. GERDES, G.H.; WILLIAMS, R. Experimental infection of vaccinated slaughter ostriches in a natural, open-air feedlot facility with virulent Newcastle disease virus . **Avian diseases** v.43, p.442-52, 1999.

VERWOERD, 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 de Medicina Veterinária**, v.22, n.4, 2000.

WATERSON, A. P. The morphology and composition of Newcastle disease virus. In: R.P. Hanson (ed.), **Newcastle disease virus: An evolving pathogen**. Univ. of Wisconsin Press, Madison. 1964, p.119-132.

WILKS, C. Molecular diagnosis of Newcastle disease. **Australian Veterinary Journal**, v.80, n.6, 2002.

WILLIAMS, R.; BOSHOFF, C. H.; VERWOERD, D.; SCHOEMAN, M.; VAN WYK, A.; GERDES, T. H.; ROOS, K. Detection of antibodies to Newcastle disease virus in ostriches (*Struthio camelus*) by an indirect ELISA. **Avian Diseases**, v.41, n.4, p. 864-869, 1997.

WILSON, M. B; NAKANE, P. K. Recent developments in periodate method conjugating horseradish peroxidase (HRPO) to antibodies. In: KNAPP, W.; HOLUBAR L.; WICK, G. (ed.), **Immunofluorescence and related techniques**. Amsterdam: Elsevier-North Holland Biomedicas. 1978, p. 215.

WILSON, R. A.; PERROTA, Jr. C.; FREY, B. An enzyme-linked immunosorbent assay that measures protective antibody levels to Newcastle disease virus in chickens. **Avian Diseases**, v.28, p.1074-1085, 1984.

WOBESER, G.; LEIGHTON, F. A.; NORMAN, R.; MYERS, D. J.; ONDERKA, D.; PYBUS, M. J.; NEUFELD, J. L.; FOX, G. A.; ALEXANDER, D. J. Newcastle disease in wild water birds in western Canada. **Canadian Veterinary Journal**, v.34, 353-359, 1993.

YOUNG, T.F.; ERICKSON, B.Z.; ROSS, R.F.; WANNEMUEHLER, Y. Hemagglutination and hemagglutination inhibition of turkey red blood cells with *Mycoplasma hyopneumoniae*, **Am. J. Vet Research**, v. 50, n.7, p1052-5, 1989.

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

XU, H.; LOHR, J.; GREINER, M. The selection of ELISA cut-off points for testing antibody to Newcastle disease by two-graph receiver operating characteristic (TG-ROC) analysis **Journal of Immunological Methods**, 208, p.61-64, 1997.

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

# ANEXO 1. ESBOÇOS DE ARTIGOS CIENTÍFICOS

## Artigo 1

### Padronização de testes sorológicos para o diagnóstico da Doença de Newcastle em avestruzes

Fernandes, L; Doretto Júnior, L; Meyer, R; César, A.E.R; Freire, S.M.

#### RESUMO

Doença de Newcastle é uma enfermidade viral aguda, altamente contagiosa, que acomete aves de várias espécies, considerada como uma das doenças mais importantes para a indústria avícola moderna. Ferramentas para diagnóstico e controle estão disponíveis para galinhas, porém ainda não foram desenvolvidos testes específicos para avestruzes. O presente trabalho visou padronizar testes sorológicos para a detecção de anticorpos contra a Doença de Newcastle em avestruzes. A padronização da técnica da Inibição da Hemaglutinação revelou interferência do tipo de eritrócito utilizado e demonstrou a necessidade do uso de hemácias da mesma espécie ou, alternativamente, de perus. Testes de ELISA indiretos foram desenvolvidos ou modificados para a utilização nesta espécie e, apesar de apresentarem alta correlação entre si, demonstraram baixa correlação com a HI.

**Palavras-chave:** Doença de Newcastle, Avestruzes, ELISA, Inibição da Hemaglutinação.

#### Introdução

A Doença de Newcastle é uma enfermidade viral aguda e altamente contagiosa, que acomete praticamente todas as espécies de aves. A presença do seu agente etiológico já foi comprovada em mais da metade das 50 ordens da classe *Avis* (FIELDS, 1996).

Embora descrita pela primeira vez na Ásia e logo a seguir confirmada na Inglaterra, na terceira década do século XX, a primeira descrição desta zoonose no Brasil data de 1953, com o isolamento viral realizado por Cunha e Silva em um surto verificado na cidade de Macapá. Estes pesquisadores atribuíram a importação de carcaças de frangos congelados vindos dos Estados Unidos, como fonte do vírus responsável por esta ocorrência (CUNHA; SILVA, 1955). A partir de então, a doença tem sido observada em todo o território nacional, trazendo significativas perdas econômicas para os avicultores brasileiros (HASTENREITER, 1976; ITO et al, 1986, DORETTO JÚNIOR; PAULILLO, 2006).

Tendo em vista a necessidade da sanidade dos plantéis e da importância econômica da produção de frangos de corte, que colocou o Brasil entre os maiores exportadores do mundo, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) instituiu em 1994 o Programa

Nacional de Sanidade Avícola (PNSA), no qual a Doença de Newcastle se destaca como a principal enfermidade para as aves comerciais. Embora endêmica em várias regiões do país, em 2003 o governo brasileiro declarou a avicultura comercial livre desta doença, com reconhecimento da Organização Mundial para a Sanidade Animal (OIE), a partir de um estudo oficial realizado em 2002. A condição de livre para Doença de Newcastle está permanentemente ameaçada devido à existência de múltiplos reservatórios domésticos e silvestres, que podem ter acesso às aves de criação comercial. Além disso, o rebanho de avestruzes no Brasil conta atualmente com mais de 200.000 cabeças, que são criadas de forma semi-extensiva, e estão distribuídas em todo o território nacional, muitas vezes em áreas próximas a criatórios avícolas industriais. Neste sentido, um programa de vigilância eficaz depende da pesquisa de métodos de diagnóstico confiáveis e exequíveis em laboratórios credenciados para tal.

O presente trabalho visa estudar o teste sorológico convencional, aceito internacionalmente e preconizado pela OIE, embora associado a expressivos níveis de reações cruzadas e, adicionalmente apresentar alternativas para o diagnóstico sorológico com o desenvolvimento de testes imunoenzimáticos, além de adaptação também para este fim de testes disponíveis no mercado.

## **Material e Métodos**

### **Amostras de soro - Estado da Bahia**

Amostras séricas de 340 avestruzes, de diferentes criatórios do Estado da Bahia, foram avaliadas para verificação da presença de anticorpos contra o vírus da Doença de Newcastle. Os animais selecionados pertenciam a diferentes faixas etárias e não apresentavam sintomatologia clínica. Os soros foram armazenados a -20°C até o momento da utilização.

### **Amostras de soro - Estado de São Paulo**

Amostras séricas de 140 avestruzes, de diferentes idades e sem sintomatologia clínica, criadas em propriedades do Estado de São Paulo, foram avaliadas para verificação da presença de anticorpos contra o vírus da Doença de Newcastle. Os soros foram armazenados a -20°C até o momento da utilização.

### **Amostras com sorologia comprovada (“padrões-ouro”)**

Amostras séricas de nove avestruzes comprovadamente positivas, através do isolamento do NDV e de nove avestruzes comprovadamente negativas, sadias nas quais o referido patógeno não foi detectado foram usados para a definição de parâmetros como sensibilidade, especificidade, valor preditivo e determinação do ponto de corte de cada teste sorológico. As amostras foram gentilmente cedidas pelo MAPA (LANAGRO – Campinas).

### **Preparo do extrato antigênico**

Utilizou-se dois preparados antigênicos: uma suspensão vacinal do vírus da Doença de Newcastle vivo, da estirpe La Sota, adquirida comercialmente, posteriormente inativada pelo calor (56°C por 3 horas) e um antígeno fornecido pelo LANAGRO - Campinas, obtido de material do alantóide de ovos SPF embrionados infectados com o mencionado vírus.

Foram utilizados três preparados antigênicos para os testes sorológicos:

Para os testes de inibição de hemaglutinação usou-se o antígeno fornecido pelo LANAGRO - Campinas, obtido de material do alantóide de ovos embrionados infectados com o mencionado vírus; Para a sensibilização das placas de microtitulação, utilizou-se como antígeno a vacina viva atenuada produzida pelo Laboratório BIOVET, onde o material liofilizado para 100 doses imunizantes foi ressuspensão em 0,5 mL de água destilada, colocado tween-20 num percentual final de 1%, submetido a três ciclos de aquecimento a 56°C em banho-Maria por 15 minutos e congelamento a -20 por igual tempo. Para os testes “ELISA” este material foi dialisado overnight contra tampão PBS 0,15M, pH 7,2 e a seguir por três horas com tampão carbonato-bicarbonato 0,5M, pH 9,6.

#### **Obtenção de IgG de avestruz**

Ao volume de 3 ml de um “pool” de soros de três avestruzes adicionou-se 1,5 ml de uma solução saturada de sulfato de amônia, sob leve agitação, à temperatura ambiente, por uma hora. Após centrifugação por 30 minutos, a 2000g, desprezou-se o sobrenadante e o precipitado foi ressuspensão em 1 mL de PBS 0,15M, pH 7,2. Este material foi dialisado por 24 horas, contra 1 L do mesmo PBS, com três trocas durante este período. A seguir, este material foi submetido à cromatografia em coluna de QAE-Sephadex A-50, eluída com tampão EDTA 0,5M, pH 8,5. Coletou-se o eluato correspondente ao primeiro pico determinado espectrofotometricamente (A280), procedendo-se a seguir a dosagem de proteína.

#### **Imunização de caprinos**

Dois caprinos machos adultos foram imunizados de acordo com o seguinte esquema: inoculação no dia zero de 500 ng de IgG de avestruz num volume ajustado para 0,5 mL, homogeneizado com igual volume de Adjuvante Completo de Freund e injetado via sub-cutânea, em dois pontos; inoculação de igual quantidade de antígeno nos dias 14, 28 e 42. No dia 50 coletou-se sangue para obtenção do soro e testou-se por imunodifusão bidimensional, com soro total de avestruz e com a fração obtida em cromatografia. Em ambos os casos foi possível se observar a linha de precipitação. O soro de um dos animais reagiu apenas com o soro de avestruz não diluído, enquanto que o outro apresentou título de 1:8.

#### **Preparo e titulação do conjugado**

O conjugado foi preparado segundo o protocolo modificado a partir da técnica original de WILSON; NAKANE (1978), como se segue: dissolveu-se 4mg de peroxidase tipo VI (SIGMA) em 1mL de água destilada. Adicionou-se 0,2mL de periodato de sódio 0,1M recém-preparado. A

mistura foi agitada à temperatura ambiente por 20 minutos e dialisada por 24 horas contra 500mL de tampão acetato 1mM pH 4,4, a 4°C. Após a diálise, o pH foi ajustado para 9,0 com 20mL de tampão carbonato de sódio 0,2M pH 9,5. A seguir adicionou-se 8mg de IgG caprina anti-IgG de avestruz, purificada segundo o mesmo protocolo descrito anteriormente para a purificação de IgG de avestruz com a adição de nova precipitação em sulfato de amônia, agora a 50%, ressuspensa em 1mL de tampão carbonato de sódio 0,01M pH 9,5 e dialisada contra 500 mL deste último tampão, A mistura foi agitada por duas horas à temperatura ambiente, após o que adicionou-se 0,1mL de boridrato de sódio a 4mg/mL. Após 2 horas de repouso a 4°C, dialisou-se este material contra PBS 0,01M, pH 7,4, por 24 horas, a 4°C. Adicionou-se 10 mg de soroalbumina bovina para cada 1 mg de conjugado. Procedeu-se a titulação deste conjugado pela técnica “ELISA” indireto conforme descrição no primeiro protocolo apresentado adiante, utilizando-se dois soros positivos e outros dois negativos, cedidos pelo LANAGRO (Campinas, SP) diluídos 1:100, 1:200, 1:400 e 1:800 e incubados em poços de placas de poliestireno sensibilizadas com antígenos do vírus da Doença de Newcastle, marca IDDEX. Testou-se o referido conjugado nas diluições de 1:500, 1:1.000, 1:2.000, 1:5.000 e 1:10.000, obtendo-se valores capazes de melhor discriminar quando diluídos em 1:2.000.

### **Protocolos dos testes “ELISA” desenvolvidos**

Os ensaios imunoenzimáticos desenvolvidos são todos do tipo ELISA indireto, onde se busca a detecção de anticorpos da classe IgG. Os resultados obtidos em cada teste desenvolvido / modificado foram comparados entre si.

1. O protocolo do ELISA IDDEX-CAV foi assim executado: placas de poliestireno marca IDDEX, já sensibilizadas com NDV, foram incubadas com 50 µL/poço dos soros testes diluídos a 1:400 em PBS-T contendo 1% de leite desnatado durante 45 minutos. Após seis lavagens em PBS-T, adicionou-se às placas 50µL de imunoglobulina de cabra anti-imunoglobulina G de avestruz, conjugada à peroxidase, preparada conforme protocolo já descrito e diluída a 1:2.000 em PBS-T. As placas foram incubadas a 37°C por 45 minutos. Em seguida foram novamente lavadas seis vezes em PBS-T e incubadas por 15 minutos à temperatura ambiente e ao abrigo da luz, com 50 µL /poço da solução reveladora tendo como cromógeno o TMB e já preparada pelo mencionado fabricante “IDDEX”. A reação foi interrompida acrescentando 25 µL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 4 N. A leitura foi feita em leitor de ELISA marca “BIO RAD” modelo PR 2100, com filtro de 620 nm de comprimento de onda da luz.

2. No protocolo do ELISA GUILDHAY utilizou-se todos os reagentes do “kit” da marca “GUILDHAY” e os intervalos de incubação também seguiram as indicações do referido fabricante, a saber, 30 minutos à temperatura ambiente tanto para a incubação das amostras como para o conjugado e 15 minutos para o cromógeno. Este “kit” utiliza um conjugado com fosfatase alcalina



e como cromógeno, uma solução de monofosfato de fenoltaleína (PMP), com a leitura sendo feita em leitor automático de ELISA, marca “BIOTEK”, com filtro de 550 nm de comprimento de onda da luz.

3. O protocolo do ELISA IDDEX foi realizado com o “kit” da marca “IDDEX”, utilizando-se todos os seus reagentes e seguindo-se também todas as suas recomendações de execução, com a leitura final realizada em fotolorímetro automático para ELISA, marca “BIO RAD” modelo PR 2100, com filtro de 620 nm de comprimento de onda da luz.

4. O protocolo do ELISA GUILDHAY-CAV foi executado utilizando o conjugado com peroxidase anti-IgG de avestruz, tendo como diferença como diferença a utilização de placas dos “kits” marca “GUILDHAY”, já sensibilizadas com antígenos do vírus da Doença de Newcastle pelo fabricante. A leitura foi feita em fotolorímetro automático para ELISA, marca “BIO RAD” modelo PR 2100, com filtro de 620 nm de comprimento de onda da luz.

5. O protocolo do ELISA LASAB, foi desenvolvido no Laboratório de Sanidade Avícola da Bahia (LASAB), utilizando como antígeno a vacina viva estirpe La Sota, produzida pelo Laboratório “BIOVET”, tratado conforme descrição anterior e diluído em 1:500 em tampão carbonato-bicarbonato 0,05M, pH 9,6, colocado em placas de poliestireno “high binding”, marca “COSTAR”, no volume de 100 µL em cada um dos seus 96 poços e deixado a 4°C overnight. Após duas lavagens com PBS-T, colocou-se as amostras, o “branco” e os controles positivos e negativos (estes últimos em duplicatas) num volume de 50 µL /poço a 1:200 em PBS-T contendo 1% de leite desnatado durante 45 minutos. Após seis lavagens em PBS-T20, adicionou-se às placas 50µL de imunoglobulina de cabra anti-imunoglobulina G de avestruz, conjugada à peroxidase e diluída a 1:2.000 em PBS-T contendo leite desnatado a 1%. As placas foram incubadas a 37°C por 45 minutos. Em seguida foram novamente lavadas seis vezes em PBS-T20 e incubadas por 15 minutos à temperatura ambiente e ao abrigo da luz, com 50 µL /poço da solução reveladora tendo como cromógeno o TMB e já preparada pelo mencionado fabricante “IDDEX”. A reação foi interrompida acrescentando 25 µL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 4 N. A leitura foi feita em leitor de ELISA (marca “BIO RAD”, modelo PR 2100), usando filtro de 620 nm de comprimento de onda.

O ponto de corte foi definido através da curva ROC ou curva operacional relativa. Esta análise se baseia numa curva onde são colocados os valores de corte, tendo no eixo das ordenadas a sensibilidade e no eixo das abscissas a taxa de falso positivo (ou seja, 1 menos o valor da especificidade). O ponto de corte ideal é o que permite uma maior especificidade, sem perda de sensibilidade (GREINER et al., 1995). Os testes estatísticos utilizados foram feitos através do programa SPSS versão 9.0.

### **Técnica da Inibição da Hemaglutinação**

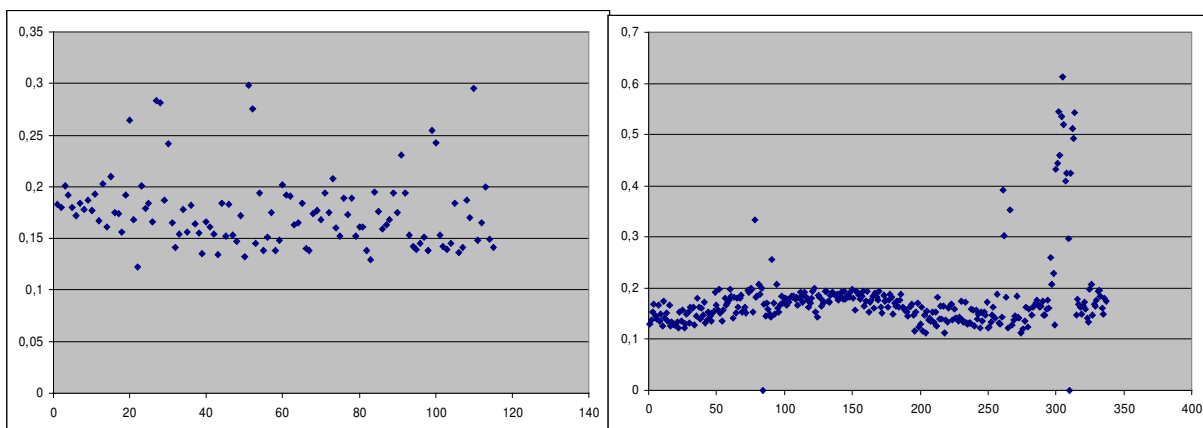
Para determinação dos títulos de anticorpos anti-NDV no soro de avestruzes foi utilizada a técnica da microtitulação Beta em microplacas rígidas de 96 poços, com fundo em “U” (marca CORNING). Diante da possibilidade de interferência de reações inespecíficas, decorrentes de hemaglutininas presentes no soro de avestruzes foi realizada microtitulação com soro previamente incubado com hemácias de galinha. Suspensão de hemácias de galinha a 10% foi adicionada a cada amostra de soro, permanecendo sob incubação durante 30 minutos a 4°C, de acordo com o recomendado pela ALLAN et al, 1978. Procedeu-se então a centrifugação, coletando-se o soro e realizando a técnica da microtitulação Beta em seguida. Com auxílio de pipetador multicanal calibrado (25 µL) efetuou-se a titulação do antígeno, de maneira a obter-se 4 unidades hemaglutinantes em 25 µL. Amostras de soros foram testadas em duplicata, submetidas à diluição seriada em razão 2 (até 1:4096), em PBS pH 7,2, na microplaca, e incubadas com 25 µL do antígeno, durante 30 minutos a 4°C. Posteriormente foi adicionada suspensão de hemácias a 1% e efetuada nova incubação por mais 30 minutos a 4°C e procedeu-se à leitura após deposição total de hemácias nos controles. O título foi expresso mediante o número de unidades hemaglutinantes usadas pela recíproca de maior diluição do soro que foi capaz de inibir completamente a hemaglutinação e transformado em log de base 2, segundo a técnica publicada por DORETTO JÚNIOR, 1997. Os testes também foram realizados com hemácias de avestruzes e hemácias de perus, sendo o antígeno titulado para cada um dos ensaios realizados. O ponto de corte utilizado para este teste foi de 1:8, de acordo com o preconizado pela OIE.

### **Resultados**

#### **Comparação entre os ELISA utilizados para diagnóstico da Doença de Newcastle em Avestruzes**

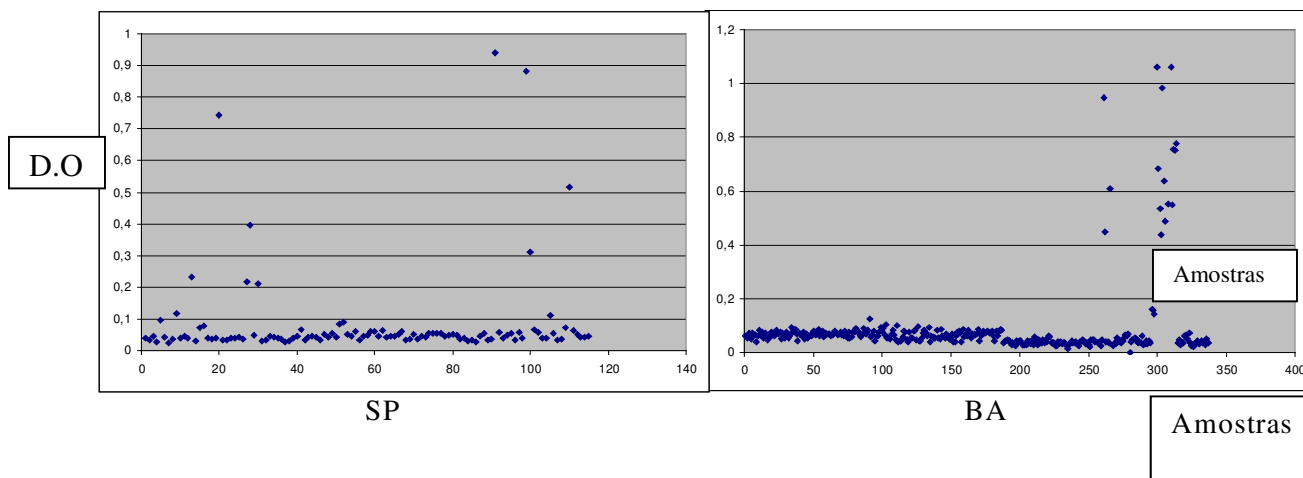
Os resultados obtidos com os soros positivos e negativos, determinados como padrão-ouro, para os cinco testes ELISA indicaram valores de 100% para a sensibilidade, especificidade, para o valor preditivo positivo e valor preditivo negativo para todos os cinco testes ELISA padronizados. Comparação entre os ELISA utilizados revelou boa correlação entre os cinco testes desenvolvidos. Devido ao elevado número de amostras testadas utilizou-se cinco placas para cada tipo de ELISA desenvolvido, estabeleceu-se o coeficiente de variação entre as placas de cada teste, obtendo-se sempre percentuais abaixo de 9,3%. Foram determinados os pontos de corte para cada teste usando como referência soros de animais comprovadamente positivos e negativos. Para o ELISA LASAB o ponto de corte para obtenção de 100% de sensibilidade e especificidade foi de 0,165. Para o ELISA GUILDHAY, o ponto de corte definido para a mesma sensibilidade e especificidade foi 0,234. Para o ELISA IDDEX, o ponto de corte foi 0,190. Para o ELISA GUILDHAY com conjugado anti-avestruz (GUILDHAY-CAV), o ponto de corte foi 0,275 e para o ELISA IDDEX

com conjugado anti-avestruz (IDDEX-CAV) o ponto de corte foi 0,150. As figuras 2, 3, 4, 5 e 6 mostram a distribuição de D.O. obtida com cada um dos cinco testes ELISA padronizados, quando

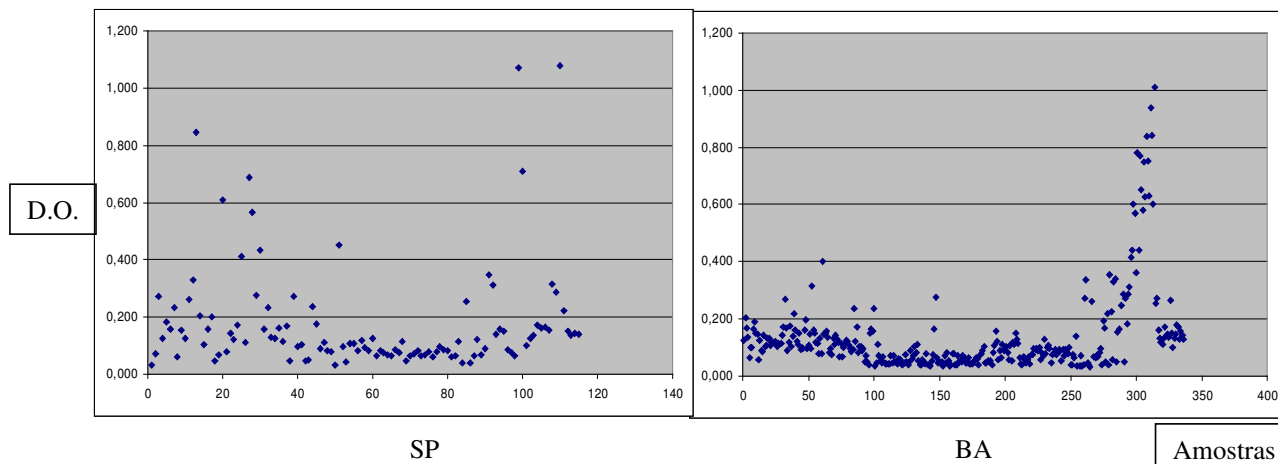


os soros dos animais da Bahia e de São Paulo foram testados.

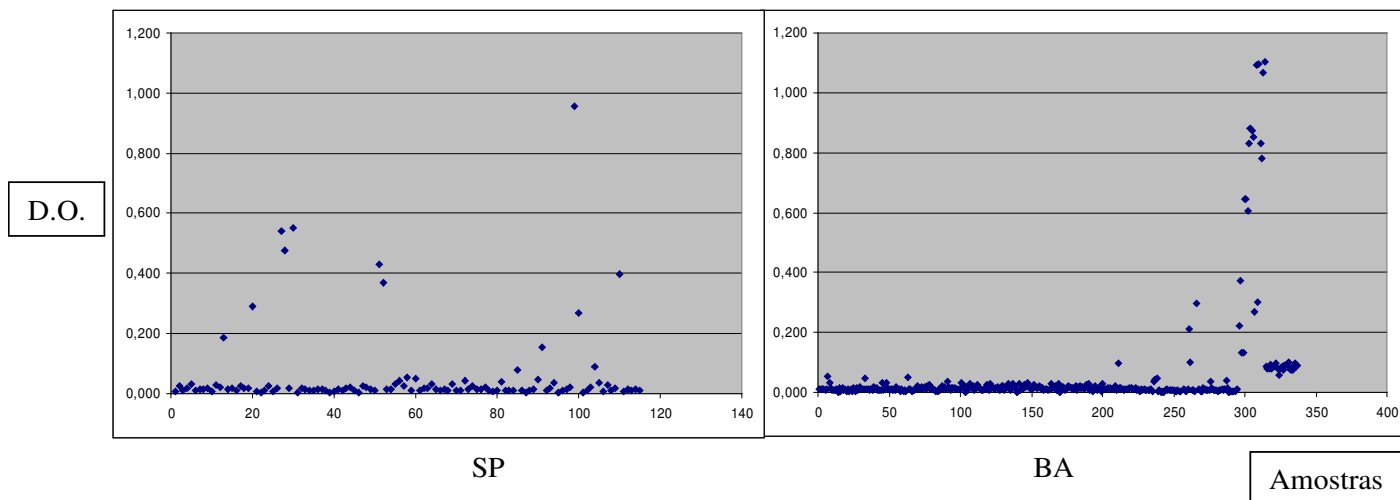
**Figura 2.** Distribuição da reatividade sérica (densidade óptica) das amostras de avestruzes de plantéis da Bahia e de São Paulo, com o ELISA GUILDHAY (ponto de corte de 0,234).



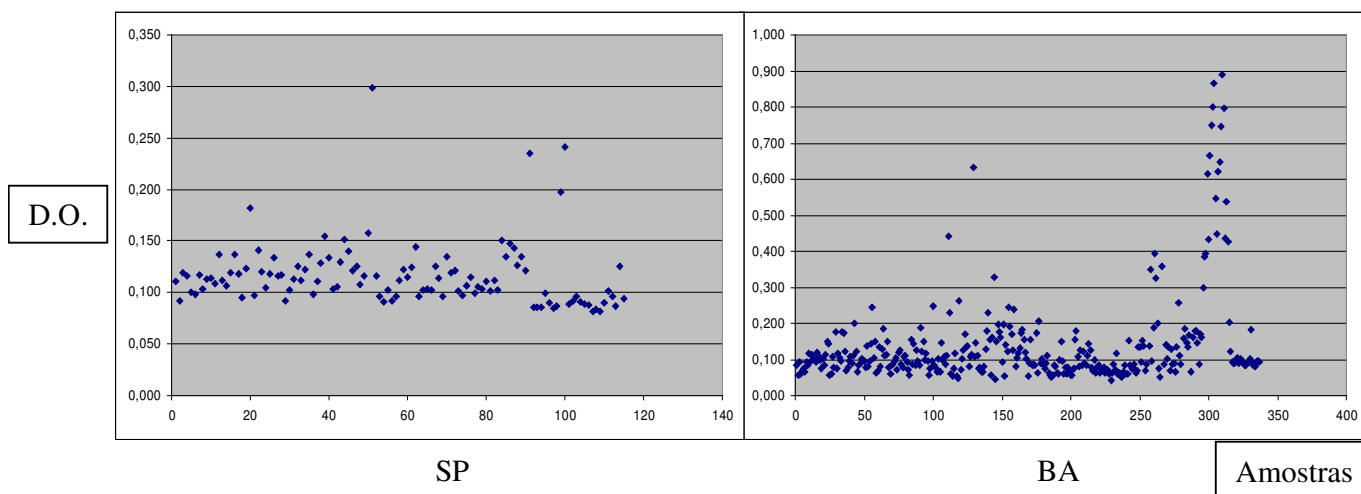
**Figura 3.** Distribuição da reatividade sérica (densidade óptica) da amostras de avestruzes de plantéis da Bahia e São Paulo com IDDEX (ponto de corte de 0,190).



**Figura 4.** Distribuição da reatividade sérica (densidade óptica) das amostras de avestruzes de plantéis da Bahia e de São Paulo, com o ELISA IDDEX-CAV (ponto de corte de 0,275).



**Figura 5.** Distribuição da reatividade sérica (densidade óptica) das amostras de avestruzes de plantéis da Bahia e de São Paulo, com o ELISA GUILDHAY-CAV



**Figura 6.** Distribuição da reatividade sérica (densidade óptica) das amostras de avestruzes de plantéis da Bahia e de São Paulo, com o ELISA LASAB (ponto de corte de 0,165).ELISA IDDEX-CAV (ponto de corte de 0,150).

A comparação entre os ELISA desenvolvidos, com a determinação do número de amostras com resultados positivos e negativos e os valores de kappa demonstraram maior correlação entre os testes GUILDHAY e IDDEX com conjugado antiavestruz (IDDEX CAV) e IDDEX e IDDEX com conjugado antiavestruz (IDDEX CAV).

**Tabela 2.** Concordância entre os vários ELISA desenvolvidos para diagnóstico da Doença de Newcastle em avestruzes.

Comparação ELISA	Positivos nos dois testes	Negativos nos dois testes	Valor de kappa
GUILDHAY x IDDEX	30	423	k=0,95
GUILDHAY x IDDEX CAV	32	424	k=0,98
GUIDHAY x GUIDHAY CAV	33	412	k=0,82
GUILDHAY x LASAB	29	424	k=0,93
IDDEX x IDDEX CAV	31	425	k=0,98
IDDEX x GUILDHAY CAV	31	412	k=0,79
IDDEX x LASAB	31	426	k=0,96
IDDEX CAV x GUILDHAY CAV	32	412	k=0,80
IDDEX CAV x LASAB	29	425	k=0,95
GUILDHAY CAV X LASAB	29	412	k=0,75

### **Comparação entre os testes de Inibição da Hemaglutinação para diagnóstico da Doença de Newcastle em Avestruzes utilizando hemácias de diferentes espécies**

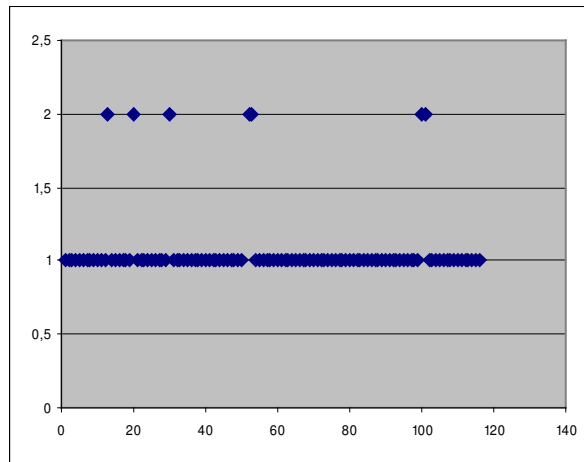
A comparação entre os resultados obtidos no testes da Inibição da Hemaglutinação, utilizando hemácias de espécies diferentes demonstrou excelente correlação entre hemácias de avestruzes e hemácias de perus. No entanto, a comparação entre os resultados obtidos para hemácias das demais espécies demonstrou concordância baixa.

**Tabela 3.** Concordância entre os vários HI desenvolvidos para diagnóstico da Doença de Newcastle em avestruzes.

Comparação HI	Positivos nos dois testes	Negativos nos dois testes	Valor de kappa
Hemácias galinha x galinha soro inativado	42	32	k=0,11
Hemácias galinha x avestruz	42	0	k=0,00
Hemácias galinha x peru	42	9	k=0,03
Hemácias galinha soro inativado x avestruz	155	0	k=0,00
Hemácias galinha soro inativado x peru	155	9	k=0,39
Hemácias avestruz x peru	178	9	k=1,00

## Comparação entre os ELISA e a Inibição da Hemaglutinação para diagnóstico da Doença de Newcastle em Avestruzes

A comparação entre os ELISA e a Inibição da Hemaglutinação demonstrou baixa correlação entre os testes. Quando resultados obtidos com hemácias de avestruzes e aqueles obtidos com hemácias de galinha ou hemácias de galinha em soro pré-incubado (inativação) são comparados, verifica-se melhor correlação com uso de hemácias da mesma espécie. Verifica-se também maior correlação entre resultados obtidos com hemácias de avestruz e os obtidos após pré-incubação do soro e uso de hemácias de galinha. Apesar da variação nos valores de títulos obtidos na Inibição da hemaglutinação, todas as amostras positivas no ELISA LASAB apresentavam títulos acima de 1:8 na HI.



**Figura 9.** Resultados obtidos com o Dot-ELISA realizado com os soros de avestruzes do Estado de São Paulo.

## DISCUSSÃO

A importância econômica da Doença de Newcastle para a Avicultura Industrial torna seu controle e prevenção obrigatórios em plantéis comerciais, seja por meio de programas de vacinação, seja por monitoramento sorológico. Nesse sentido, vários kits comerciais para detecção e quantificação de anticorpos contra a Doença de Newcastle em galinhas estão disponíveis no mercado. O crescimento da estruticultura no Brasil e a susceptibilidade da espécie a esta enfermidade criam a demanda urgente para o desenvolvimento de testes sorológicos sensíveis e específicos que permitam a identificação de animais positivos, permitindo a adoção de estratégias de prevenção e controle adequadas, não só visando um perfeito estabelecimento desta cultura no país, como também buscando a proteção da importante e consolidada avicultura brasileira.

A aplicação de ELISA indireto no sorodiagnóstico da Doença de Newcastle e sua comparação com o teste da Inibição da Hemaglutinação têm sido amplamente relatados na literatura. Apesar da Inibição da Hemaglutinação ser considerada como teste oficial para esta enfermidade, o teste ELISA vem se tornando cada vez mais popular, devido à sua maior especificidade e sensibilidade (WILLIAMS et al, 1997), porém os kits comerciais são produzidos para uso específico em galinhas. Neste sentido, a produção do conjugado anti-IgG de avestruz para utilização em kits comerciais disponíveis no mercado, capazes de produzir resultados confiáveis, tornam-se uma alternativa interessante para estudos soroepidemiológicos e para programas de defesa animal.

Os resultados obtidos nos testes de Inibição de Hemaglutinação foram bastante variados, a depender da hemácia utilizada. Baseando-se no ponto de corte de 1:8 como preconizado pelo Programa Nacional de Sanidade Avícola (MAPA 2003), e utilizando hemácias de avestruz, observou-se que 100% de amostras foram positivas no estado da Bahia e 96,5% no estado de São Paulo. No entanto, a utilização de hemácias de galinhas reduziu o número de amostras positivas para 33,06% na Bahia e para 23,2% em São Paulo. A execução da HI com uso de hemácias da mesma espécie do soro a ser testado, têm sido associada a resultados mais confiáveis e, desta forma, recomendada por vários autores que descreveram problemas de padronização quando da utilização de eritrócitos de outras espécies (YUSOFF; TAN, 2001; BEARD; WILKES, 1985). Outro fator que pode levar a falhas na execução desta técnica para avestruzes é a presença de proteínas hemaglutinantes não específicas no soro destas aves. Neste caso, a não inativação destas hemaglutininas pode produzir resultados falso-negativos, inviabilizando a aplicação da técnica para monitoramento de plantéis (GRIMES, 2002). Estas reações não específicas seguramente ocorreram nos experimentos aqui relatados, uma vez que a pré-adsorção com hemácias de galinhas induziu a um aumento considerável no número de animais positivos. A porcentagem de amostras positivas passou de 33,6 % para 84,7% na Bahia e de 23,2% para 95,7% em São Paulo

A utilização de hemácias de avestruzes seria o indicado para evitar tais interferências. Contudo, o emprego de hemácias dessas aves tem como limitação principal a dificuldade de manutenção de animais desse porte em locais de fácil acesso para os laboratórios de diagnóstico, dificultando sobremaneira a coleta de sangue para preparo das hemácias. A descrição de bons resultados obtidos com a utilização de hemácias de perus, feita por YOUNG et al, 1989, levou à sua inclusão nestes experimentos. A comparação dos resultados alcançados com a aplicação destas hemácias com os obtidos com hemácias de avestruz demonstraram uma excelente correlação ( $k=1,0$ ), sugerindo a possibilidade da substituição de hemácias de avestruz por hemácias de perus, viabilizando a execução da técnica em laboratórios, especialmente aqueles distantes de áreas com criatórios de avestruzes.

A reprodutibilidade da Inibição da Hemaglutinação parece sofrer influências distintas, além da relação espécie doadora de hemácias e espécie cujo soro será testado. Mesmo sendo reconhecida como uma técnica de fácil execução, simples e de baixo custo, vários relatos de problemas na reprodução de resultados têm sido descritos, atribuídos principalmente a erros na diluição e diferenças relacionadas ao tipo de antígeno. Paramixovírus pertencentes aos sorotipos PMV-1 e PMV-3 são antigenicamente relacionados e podem interferir na interpretação dos resultados da HI (KOUWENHOVEN, 1993).

Estudo realizado por Alexander; Manvell (2002) visando avaliar a capacidade de laboratórios da Comunidade Européia em identificar antígeno de Paramyxovirus aviários e verificar a reprodutibilidade do teste HI para diagnóstico da Doença de Newcastle revelou uma ampla diferença nos resultados obtidos pelos 35 laboratórios analisados. Demonstra-se assim que, apesar da HI poder ser considerada uma técnica interessante em algumas situações particulares, sua associação a testes que apresentem maior especificidade e sensibilidade, pode garantir maior credibilidade dos resultados. Relatos observados na literatura dão sustentação a esta afirmativa. A comparação entre o teste HI e a soroneutralização para diagnóstico da Doença de Newcastle foi realizada por Koch; Van Roozelaar (1994). Avaliando um total de 147 amostras de soro de avestruzes, os autores encontraram número de amostras negativas no teste HI tão baixo que impossibilitou a estimativa da sensibilidade e especificidade. Por outro lado, os autores também verificaram que algumas amostras com índices de neutralização relativamente altos eram negativas no teste HI. Assim, o valor preditivo do teste HI para detecção de anticorpos em termos de plantel foi questionado e os autores sugeriram que as avestruzes negativas no HI oriundas de um lote onde alguns animais foram positivos só deveriam ser removidas, comercializadas ou exportadas se permanecessem negativas duas a três semanas após terem sido isoladas dos animais positivos.

No presente trabalho, a comparação entre a densidade óptica obtida nos ELISA e os títulos de anticorpos observados na HI demonstram que amostras positivas no ELISA também eram positivas na HI com todos os tipos de hemácias testados. No entanto, amostras com títulos semelhantes na HI apresentavam absorvância diferente no ELISA. Resultados semelhantes foram descritos por Richtzenhain et al (1993), que estudaram a relação entre o ELISA indireto e a inibição da hemaglutinação. Trabalhando com 240 amostras de soro de galinhas poedeiras submetidas a diferentes sistemas de vacinação contra a Doença de Newcastle, esses autores verificaram alta correlação entre os dois testes sorológicos, mas relataram também ampla variação entre a absorvância observada no ELISA para amostras que apresentavam o mesmo título na Inibição da Hemaglutinação.

Cadman et al (1994) desenvolveram um conjugado anti-avestruz e usaram em testes comerciais para detectar patógenos em soro de 149 avestruzes criadas em 9 propriedades no Zimbábue, verificando 23% de animais reagentes para Doença de Newcastle, com o mesmo kit



comercial usado no presente trabalho (IDDEX FLOCKCHECK®). Apesar desses autores afirmarem que os anticorpos anti-galinha não reagem com imunoglobulinas de avestruzes, os testes realizados com os kits GUILDHAY e IDDEX sem modificação, empregando os componentes fornecidos pelo fabricante, ou seja, conjugados anti-galinha, demonstraram a capacidade de reconhecimento de anticorpos de avestruzes. No entanto, estudos posteriores devem ser desenvolvidos com vistas a garantir essa condição.

A alta correlação entre os ELISA indiretos utilizados neste trabalho demonstrou que o processo de purificação do antígeno para sensibilização da microplaca (ELISA LASAB) foi eficaz, não havendo, aparentemente, dispersão do epítipo alvo, uma preocupação colocada por alguns autores (CARDOSO et al, 1998, CZIFRA et al, 1996). No entanto, a utilização do antígeno bruto para sensibilização da placa (vírus integral) impede que haja a discriminação de animais vacinados ou infectados, pois os anticorpos produzidos em ambas as situações identificam esse antígeno. A solução para esta questão seria a utilização de vacinas recombinantes de sub-unidades ou com marcadores, que possibilitariam a sua identificação por meio de testes de ELISA com placas sensibilizadas com proteínas antigênicas específicas. Ainda sobre os testes ELISA aqui desenvolvidos, deve ser salientado que embora esteja claro as suas expressivas capacidades resolutivas, os valores de 100% encontrados para sensibilidade, especificidade, e valores preditivos, certamente decorreram do número de amostras padrão-ouro. Isto se justifica pela dificuldade em se encontrar animais comprovadamente positivos por meio do isolamento do agente etiológico e dentre as perspectivas de aperfeiçoamento destes testes sorológicos, está a busca de mais amostras padrão-ouro, que permitam uma análise mais precisa.

O planejamento e a definição de estratégias para controle da Doença de Newcastle dependem do desenvolvimento de técnicas de diagnóstico apropriadas. Algumas limitações observadas na aplicação da Inibição da hemaglutinação, entre elas a interferência das hemácias e a possibilidade de hemaglutininas não específicas gerarem resultados incorretos têm levado à utilização do ELISA em diversas variações, sempre apresentando boa sensibilidade e especificidade (ALEXANDER, 1991).

## **REFERÊNCIAS**

ALEXANDER, D.J. Newcastle Disease and other paramyxovirus infections. In: CALNEK, B.W.; BARNES, H.J.; BEARD, C.W.; REID, W.M.; YOURDER, H.W. **Diseases of Poultry**. 9 ed. Ames: Iowa State University Press, 1991, p. 496-519.

- 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, jun. 2002
- BEARD, C.W.; WILKES, W.J. A comparison of Newcastle disease hemagglutination-inhibition test results from diagnostic laboratories in the south-eastern United States **Avian Diseases** v.29, p.1048-56, 1985.
- CADMAN, H. F.; KELLY, P. J.; DE ANGELIS, N. D.; ROHDE, C.; COLLINS, N.; ZULU, T. Comparison of enzyme-linked immunosorbent assay and haemagglutination inhibition test for the detection of antibodies against Newcastle disease virus in ostriches (*Struthio camelus*). **Avian Pathology**, Oxfordshire, v. 26, n.2, p. 357-363, Jun 1997.
- CARDOSO, T.C.; SOUSA, R.L.M.; ALESSI, A.C.; MONTASSIER, H.J.; PINTO, A.A. A double antibody sandwich ELISA for rapid diagnosis of vírus infection and to measure the humoral response against infectious bursal disease on clinical material. **Avian Pathol**, v. 27, p. 450-4, 1998.
- CUNHA, R. G.; SILVA, R .A. Isolamento e identificação do vírus da Doença de Newcastle no Brasil. **Sociedade Brasileira de Medicina Veterinária**, v.23, p.17-33, 1955.
- CZIFRA, G.; NILSSON, M.; ALEXANDER, D.J.; MANVELL, S.; KECSKEMÉTI S.; ENGTRÖM, B.E. Detection of PMV-1 specific antibodies with a monoclonal antibody blocking enzyme-linked immunosorbent assay. **Avian Pathol.**, v. 25, p. 691-703, 1996.
- DORETTO JÚNIOR, L.; PAULILLO, A.C. **Doença de Newcastle.** In: Andreatti Filho, R.L. (Ed), Saúde Aviária e doenças. 1ª ed. São Paulo: Editora Roca. 2006. p. 168-81.
- FIELDS, B.N. **Fundamental Virology** 3ª ed. Philadelphia, PA: Lippincott-Raven, 1996, 1339p.
- EVANS, M.J.; KINGSBURY, D.W. Separation of Newcastle disease virus proteins by polyacrylamide gel electrophoresis. **Virology** v.37, p.597-604, 1969.
- FOLITSE, R.; HALVORSON, D. A.; SIVANANDAN, V. A dot immunoblotting assay (Dot Blot ELISA) for early detection of Newcastle Disease antibodies in chickens. **Avian Diseases**, v.42, p.14-19, 1998.
- HANSTENREITER, H. La maladie de Newcastle au Brésil. **Bull Off Int Epiz**, v.85, p. 813-817, 1976
- ITO, N. M. K.; PRESTES, A. A.; NICIPORCIUKAS, M. C. Newcastle disease virus: some biological characteristics of twelve samples isolated in Brazil. **Rev. Fac. Med. Vet. Zoot. USP**, v.23, n.1, p.47-53, 1986.
- HOMHUAN, A.; PRAKONGPAN, S.; POOMVISES, P.; MAAS, R.; CROMMELIN, D.; KERSTEN, G.; JISKOOT, W. Virosome and ISCOM vaccines against Newcastle disease:

- preparation, characterization and immunogenicity. **European Journal of Pharmaceutical Sciences** v.22, p. 459–468, 2004.
- HORVÁTH, E.; CZIFRA, G.; NAGY, E.; ENGSTROM, B.; MÉRZA, M. Potency test of inactivated Newcastle disease vaccines by monoclonal antibody blocking ELISA. **Vaccine** v.17, 2969-73, 1999.
- HUCHZERMEYER, F. W. Animal health risks associated with ostrich products. **Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epizoot.** v.16, p.111-116, 1997.
- KOCH, G.; VAN ROOZELAAR, D. Comparison of hemagglutination inhibition titres and neutralization indices of ostrich sera. In: Alexander, D. **Proceedings of the joint second annual meetings of the national Newcastle Disease and Avian Influenza Laboratories of Countries of European Union**, Brussels, oct, 1994.
- LEY, E.C.; MORISHITA, T.Y.; HARR, B.S.; MOHAN, R. BRISKER, T. Serologic survey of slaughter-age ostriches (*Struthio camelus*) for antibodies to selected avian pathogens. **Avian Diseases** v. 44, 989-92, 2000.
- LI, J; MIYAKAWA,T; FOX, F. Protein Organization in Newcastle Disease Virus as Revealed by Perturbant Treatment. **Journal of Virology**, v.34, n.1, p.268-271, 1980.
- MAPA, **Programa Nacional de Sanidade Avícola.** Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br>>. Acesso em nov. 2006
- PINHEIRO, A.; COSTA, M. F. D.; PAULE, B.; VALE, V.; RIBEIRO, M. B.; NASCIMENTO, I. L. O.; SCHAEER, R.; ALMEIDA, M. A. O.; MEYER, R. ; FREIRE, S. M. Serologic immunoreactivity to *Neospora caninum* antigens in dogs determined by indirect immunofluorescence, Western blotting and DOT-ELISA. **Veterinary Parasitology**, v. 30, n.1-2, p. 73-79, 2005.
- SMITH G.W.; HIGHTOWER, L.E. Identification of the P proteins and other disulfide-linkes and phosphorylated proteins of Newcastle disease virus. **Journal of Virology**, v. 37, n.1, p. 256-67, 1981.
- SNYDER, D. B.; MARQUARDT, W. W.; MALLINSON, E. T. Rapid serological profiling by enzyme-linked immunosorbent assay. Against Newcastle disease virus in single serum dilution. **Avian Diseases**, v.27, p.161-170, 1983.
- TOYODA, T. GOTOH, B.; SAKAGUCHI, T.; KIDA, H.; NAGAI, Y. Identification of amino acids relevant to three antigenic determinants on the fusion protein of Newcastle disease virus that are involved in fusion inhibition and neutralization **Journal of Virology**, v.62, n.11, p. 4427-430, 1988.
- WILLIAMS, R.; BOSHOFF, C. H.; VERWOERD, D.; SCHOEMAN, M.; VAN WYK, A.; GERDES, T. H.; ROOS, K. Detection of antibodies to Newcastle disease virus in ostriches (*Struthio camelus*) by an indirect ELISA. **Avian Diseases**, v.41, n.4, p. 864-869, Oct/Dec 1997.

YOUNG, T.F.; ERICKSON, B.Z.; ROSS, R.F.; WANNEMUEHLER, Y. Hemagglutination and hemmagglutination inhibition of turkey red blood cells with *Mycoplasma hyopneumoniae*, **Am. J. Vet Research**, v. 50, n.7, p1052-5, 1989.

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

## Artigo 2

# AVALIAÇÃO SOROEPIDEMIOLÓGICA DA DOENÇA DE NEWCASTLE EM PLANTÉIS DE AVESTRUZES DOS ESTADOS DA BAHIA E DE SÃO PAULO

Fernandes, L; Doretto Júnior, L; Meyer, R; César, A.E.R; Freire, S.M.

Amostras de sangue foram obtidas de avestruzes criadas no estado da Bahia e de São Paulo com o objetivo de avaliar a presença de anticorpos contra a Doença de Newcastle. Foram coletadas 340 amostras no estado da Bahia e 140 no estado de São Paulo, de avestruzes de ambos os sexos, de diferentes faixas etárias e sem apresentação de sinais clínicos. Apesar dos proprietários afirmarem que não foi utilizada vacina em seus animais, verificou-se a presença de anticorpos contra a enfermidade nos plantéis de ambos os estados, sugerindo contato com vírus vacinal ou de campo.

## INTRODUÇÃO

Doença de Newcastle é uma infecção viral altamente contagiosa que acomete aves de diversas espécies, sendo considerada como uma das enfermidades mais importantes para a indústria avícola moderna, seja pelas perdas diretas verificadas na produção, seja pela imposição de barreiras na comercialização de produtos avícolas. Em países onde a avicultura é uma atividade importante, os custos com prevenção e controle são extremamente altos e, por outro lado, em países onde predomina a criação de aves em pequena escala, as perdas diretas causadas pela enfermidade podem ser consideradas um agravante ao problema da desnutrição (ALEXANDER, 2001). A intensificação na comercialização internacional de avestruzes, verificada a partir da década de 90, suscitou apreensão nas autoridades sanitárias do mundo todo, levando a maioria dos países a criarem legislações específicas relacionadas ao tema. O fortalecimento da comercialização destes animais justamente no momento em que ocorria uma epizootia na África pode ter favorecido a propagação da Doença de Newcastle para vários países importadores. A preocupação com questões de âmbito sanitário culminou com a inclusão das avestruzes no grupo das aves de criação comercial. Assim, os estruturadores passaram a ter que atender às normas dos programas da avicultura industrial. Entretanto, as diferenças existentes entre avestruzes e galinhas acendem discussões e motivam proposições de revisão na legislação, para que as normas sejam específicas para comercialização destes animais (ALEXANDER, 2000). No Brasil, a importação de avestruzes infectadas com o vírus da Doença de Newcastle, em 1997, levou ao sacrifício de muitos animais e ao embargo das importações (DORETTO JÚNIOR, 2006). A partir deste acontecimento, estruturadores nacionais se mobilizaram e o setor passou a participar do Programa Nacional de Sanidade Avícola (PNSA), filiando-se a União Brasileira de Avicultura (UBA). A fiscalização da

atividade deixou de ser da competência do IBAMA, passando para o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, em 2002 e as Normas para Criação de Avestruzes foram publicadas no ano seguinte, constando da Instrução Normativa número 2 (MAPA 2003; D'ÁVILA, 2005). A inclusão da estrutuicultura no PNSA foi um passo importante, mas como ação isolada, não garante o cumprimento das medidas de biossegurança necessárias para evitar a disseminação da Doença de Newcastle. É necessário que haja uma fiscalização mais efetiva, principalmente visando evitar a promiscuidade entre espécies de aves diferentes. Os criadores de avestruz precisam se mobilizar, licenciar definitivamente seus criatórios, além de se profissionalizar, se de fato desejarem continuar com a criação e planejar o escoamento da produção (MENDES, 2006). Esse trabalho têm o objetivo verificar a presença de anticorpos contra a Doença de Newcastle em plantéis de avestruzes dos estados com maior concentração destes animais, visando auxiliar no desenvolvimento de estratégias de controle desta enfermidade.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

Amostras: amostras séricas de 340 avestruzes, provenientes de diferentes criatórios distribuídos em várias regiões no estado da Bahia e de 140 avestruzes, de diferentes idades e sem sinais clínicos, criadas em propriedades no estado de São Paulo, foram avaliadas para verificação da presença de anticorpos contra o vírus da Doença de Newcastle. Os animais selecionados pertenciam a diferentes faixas etárias e não apresentavam sinais clínicos. Os soros foram armazenados a -20°C até o momento da utilização.

Amostras “ padrões-ouro - soro de nove avestruzes comprovadamente positivas, através do isolamento do VDN e amostras de nove avestruzes comprovadamente negativa, sadias nas quais o referido patógeno não foi isolado, foram usadas para a definição de parâmetros como sensibilidade, especificidade, valor preditivo e determinação do ponto de corte de cada teste sorológico. As amostras foram gentilmente cedidas pelo MAPA (LANAGRO – Campinas).

Testes sorológicos: as amostras foram avaliadas utilizando-se os testes de Inibição da Hemaglutinação (HI), verificando o efeito do emprego de hemácias de diferentes espécies e testes de ELISA, utilizando-se conjugado anti-avestruz produzido de acordo com WILSON e NAKANE. Para o teste ELISA foram modificados os kits da IDEXX e da GUILDHAY utilizando o conjugado anti-avestruz e os componentes fornecidos pelos fabricantes do kit. Para o teste ELISA LASAB a placa foi sensibilizada com antígeno La Sota inativado.

Análise estatística: Os resultados foram avaliados com o programa SPSS versão 9.0.

## RESULTADOS

A partir da determinação do ponto de corte em cada um dos ELISA utilizados foi determinada a porcentagem de animais positivos, levando aos resultados observados na tabela 1

**Tabela 1.** Resultados obtidos nos testes de ELISA utilizados para diagnóstico da Doença de Newcastle em avestruzes.

Procedência Amostras	ELISA LASAB	ELISA GUILDHAY CAV	ELISA IDEXX CAV
Bahia	339/61 (17,9%)	339/38 (11,2%)	339/20 (5,9%)
São Paulo	105/5(4,7%)	116/15 (12,9%)	115/11 (9,6%)

Considerando o ponto de corte para o teste de Inibição da Hemaglutinação 3,0 (expresso em  $\log_2$ ), correspondendo a diluição de 1:8, conforme recomendações de ALEXANDER (1989) e CADMAN *et al*, 1997, títulos iguais ou maiores foram considerados positivos e títulos menores foram considerados negativos, temos os resultados visualizados na tabela 2.

**Tabela 2.** Resultados obtidos nos testes de Inibição da Hemaglutinação utilizados para diagnóstico da Doença de Newcastle em avestruzes.

Procedência Amostras	HI hemácias galinhas	HI hemácias galinhas (soro inativado)	HI hemácias avestruz	HI hemácias perú
Bahia	321/108 (33,6%)	328/277 (84,4%)	327/327 (100%)	120/128 (93,7%)
São Paulo	112/26 (23,2%)	116/111 (95,7%)	116/111 (96,5%)	57/56 (98,3%)

## DICUSSÃO

Ainda não existem vacinas contra a Doença de Newcastle registradas para utilização em avestruzes no Brasil. A vacinação de avestruzes contra a Doença de Newcastle é facultativa, mas recomenda-se que seja realizado estudo epidemiológico para definir a necessidade de sua aplicação (MAPA, 2003). As amostras testadas neste trabalho foram obtidas de criatórios cujos proprietários afirmaram não terem utilizado quaisquer vacinas em seus animais. Pode-se supor, portanto, que os anticorpos encontrados no soro destas avestruzes sejam decorrentes de contato com amostras de

campo, ou de resposta a amostras procedentes de vacinas empregadas para proteger galinhas, criadas na mesma propriedade ou em propriedades vizinhas. Apesar da recomendação de isolamento das avestruzes e da possibilidade de galinhas servirem como fontes de infecção da Doença de Newcastle para avestruzes ser bastante conhecida, a condição de promiscuidade entre as duas espécies é bastante comum (HUCHZERMEYER, 1997; LEY et al, 2000).

A presença de anticorpos contra o vírus da Doença de Newcastle em avestruzes não vacinadas também foi observada na Suécia e Holanda (KOCH et al, 1998). A comparação de resultados obtidos nos testes de soroneutralização, inibição da hemaglutinação e no ELISA, revelou 66,35%, 61,6% e 57,8% de amostras positivas respectivamente. Os autores advertiram para a importância da definição de um programa contínuo de estudos sorológicos para analisar a soroconversão e a persistência de anticorpos nessas aves. Mais uma vez, a grande ocorrência de reações não específicas na HI, levando a falsos negativos e a perda da sensibilidade do teste como efeito da inativação de hemaglutininas inespecíficas foi relatada.

A avaliação de amostras de soro de avestruzes originadas de plantéis americanos, localizados em Ohio e Indiana, revelou que mais de 57% dos animais apresentavam reação positiva na inibição da hemaglutinação para Doença de Newcastle (93 amostras do total de 211). Nenhum sinal clínico foi observado nos animais positivos na sorologia (LEY et al, 2000). Essas informações estão de acordo com as descrições feitas por Huchzermeyer, 1997. Esse autor relata que a Doença de Newcastle geralmente causa baixa mortalidade em avestruzes e ressalta que a apresentação de sinais clínicos está condicionada à idade dos animais, à via de infecção e à patogenicidade do vírus.

Estudos para avaliação da potência de vacinas e de sua capacidade em induzir proteção têm sido realizados por alguns pesquisadores (VERWOERD et al, 1999, CZIFRA et al, 1998). No caso da Doença de Newcastle, verificou-se a influência da via de administração da vacina no título de anticorpos medido por meio da Inibição da Hemaglutinação. Assim, a correlação entre proteção e o título na HI é baixa e depende de vários fatores (HORVÁTH et al, 1999). Czifra et al, 1998, demonstraram que o ELISA é bem mais eficaz que a reação de HI para definição de proteção, uma vez que aves com títulos de 1:2 ou 1:4 neste teste apresentavam boa proteção contra desafio.

## CONCLUSÃO

As amostras analisadas, provenientes de criatórios baianos e de criatórios paulistas, revelaram a presença de anticorpos contra o vírus da Doença de Newcastle, tanto no teste HI como nos testes



ELISA, mesmo sem haver sido feito qualquer relato de vacinação, reforçando a hipótese de que as avestruzes estão em contato com vírus vacinal ou de campo.

## REFERÊNCIAS

ALEXANDER, D. J. Newcastle Disease. In: A laboratory manual for isolation and identification of avian pathogens, 3. ed. Kenett Square, PA: American Association of Avian Pathologists, 1989, p.114-120.

ALEXANDER, D. J. Newcastle disease in ostriches (*Struthio camelus*) - a review. **Avian Pathology**. Oxfordshire, v.29, n.2, p.95-100, Apr. 2000.

ALEXANDER, D. J. Newcastle Disease. **British Poultry Science**, v.42, p.5-22, 2001.

CZIFRA, G.; NILSSON, M.; ALEXANDER, D.J.; MANVELL, S.; KECSKEMÉTI S.; ENGTÖM, B.E. Detection of PMV-1 specific antibodies with a monoclonal antibody blocking enzyme-linked immunosorbent assay. **Avian Pathol.**, v. 25, p. 691-703, 1996.

D'ÁVILA, Z. S. **Novos Tempos, Novos Rumos**. abr./maio 2005. Disponível em: <<http://www.aepe.com.br/ac=read&nid=114>>. Acesso em: 20 jun. 2006.

DORETTO JÚNIOR, L.; PAULILLO, A.C. Doença de Newcastle. In: Andreatti Filho, R.L. (Ed), Saúde Aviária e doenças. 1ª ed. São Paulo: Editora Roca. 2006. p. 168-81.

HORVÁTH, E.; CZIFRA, G.; NAGY, E.; ENGTÖM, B.; MÉRZA, M. Potency test of inactivated Newcastle disease vaccines by monoclonal antibody blocking ELISA. **Vaccine** v.17, 2969-73, 1999.

HUCHZERMEYER, F. W. Animal health risks associated with ostrich products. **Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epizoot**, v.16, p.111-116, 1997.

KOCH, G.; VAN ROOZELAAR, D. Comparison of hemagglutination inhibition titres and neutralization indices of ostrich sera. In: Alexander, D. **Proceedings of the joint second annual meetings of the national Newcastle Disease and Avian Influenza Laboratories of Countries of European Union**, Brussels, oct, 1994.

LEY, E.C.; MORISHITA, T.Y.; HARR, B.S.; MOHAN, R. BRISKER, T. Serologic survey of slaughter-age ostriches (*Struthio camelus*) for antibodies to selected avian pathogens. **Avian Diseases** v. 44, 989-92, 2000.

MAPA, **Programa Nacional de Sanidade Avícola**. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br>  
**IN 2/2003**.

MENDES, A. A. **Regionalização ainda é polêmica e projeto é publicado no Diário Oficial da União**. fev. 2006. AEPE. Disponível em : <<http://www.aepe.com.br/?ac=read&nid=386>>. Acesso em mar. 2006.

VERWOERD, D. J.; OLIVIER, A.; GUMMOW, B. GERDES, G.H.; WILLIAMS, R. Experimental infection of vaccinated slaughter ostriches in a natural, open-air feedlot facility with virulent Newcastle disease virus . **Avian diseases** v.43, p.442-52, 1999.

## **ANEXO 2**

**Durante a execução deste trabalho foram realizados os seguintes trabalhos de iniciação científica / monografia de conclusão de curso:**

- 1. Títulos de Anticorpos contra Doença de Newcastle em três diferentes sistemas de criação avícola na região de Feira de Santana – Bahia. 2005.2.** Graduanda: Tatiane Santana Salles. Orientadora: Lia Fernandes.
- 2. Padronização da Inibição da Hemaglutinação para diagnóstico da Doença de Newcastle em avestruzes. 2006.2** Graduando: André Eduardo Rocha César. Orientadora: Lia Fernandes
- 3. Presença de anticorpos contra o vírus da Doença de Newcastle em aves silvestres. 2006.2** Graduanda: Cíntia Pinho Bittencourt. Orientador: Antônio Vicente Magnavita Anunciação. Co-orientadora: Lia Fernandes.