

T 636.089 69
0.48m
1.975

REGINO LEONARDO DE OLIVEIRA

UTILIZAÇÃO DA IMUNOFLORESCÊNCIA NO DIAGNÓSTICO DA
DOENÇA DE NEWCASTLE E NO ESTUDO DE SEU AGENTE, EM OVO
EMBRIONADO

U.F.M.G. - BIBLIOTECA UNIVERSITÁRIA



465958811

ok
02 103/04/06

NÃO DANIFIQUE ESTA ETIQUETA

Tese apresentada ao Departamento
de Medicina Veterinária Preven-
tiva da Escola de Veterinária da
Universidade Federal de Minas
Gerais, como requisito parcial
para obtenção do grau de Mestre
em Medicina Veterinária.

BIBLIOTECA - ESCOLA DE VETERINARIA UFMG
5029 0210/15


Belo Horizonte

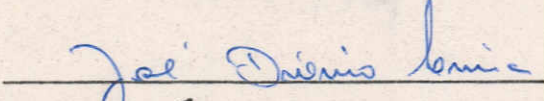
Minas Gerais - BRASIL

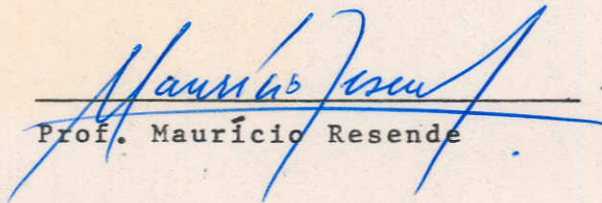
1975

Tese aprovada em 25/11/1975

BANCA EXAMINADORA


Prof. José Britto Figueiredo


Prof. José Divino Lima


Prof. Maurício Resende

JOSÉ BRITTO FIGUEIREDO - Professor Titular e Chefe do
Departamento de Medicina Veterinária Pre-
ventiva da Escola de Veterinária da Univer-
sidade Federal de Minas Gerais - ORIENTADOR

RONALDO REIS - Professor Adjunto - CONSELHEIRO

MARÍLIA DA CONCEIÇÃO NOGUEIRA - LABORATORISTA

ISMAEL FAUSTINO DE SOUZA - SERVENTE

RIMA NAMY ABUIHID - SECRETÁRIA

CARLOS GERALDO DE SOUZA - ACADÊMICO

O presente trabalho teve suporte financeiro das seguintes Instituições:

FUNDAÇÃO DE ESTUDO E PESQUISA EM MEDICINA VETERINÁRIA PREVENTIVA. Belo Horizonte, Minas Gerais

CONSELHO DE PESQUISAS DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS. Belo Horizonte, Minas Gerais.

<u>ÍNDICE</u>	<u>Páginas</u>
1. Introdução	1
2. Revisão da Literatura	5
3. Material e Métodos	12
1. Aves e ovos embrionados	13
1.1. Doença experimental	13
1.2. Ovos embrionados	13
1.3. Doença natural	13
2. Preparo de soro-imune destinado à conjugação	14
3. Conjugado para imunofluorescência . . .	15
3.1. Preparo e titulação	15
3.2. Especificidade	16
4. Métodos utilizados	17
4.1. Imunofluorescência	17
4.1.1. Preparo de lâminas	17
4.1.2. Microscopia	19
4.2. Inoculações	20
5. Desenvolvimento do experimento	21
4. Resultados	24
1. Doença experimental	25
2. Patogenicidade para ovos embrionados .	26

3. Doença natural	26
5. Discussão	38
1. Doença experimental	39
2. Patogenicidade para ovos embrionados .	43
3. Doença natural	47
4. Conjugado para imunofluorescência . .	55
4.1. Preparo e titulação do conjugado.	55
4.2. Especificidade do conjugado . . .	56
5. Comentário final	57
6. Conclusões	59
1. Doença experimental	60
2. Patogenicidade para ovos embrionados .	61
3. Doença natural	62
4. Especificidade do conjugado	63
7. Resumo	64
8. Bibliografia Consultada	67

1. Introdução

A doença de Newcastle (D.N.C.) vem se constituindo sério problema para a avicultura brasileira e mundial. Periodicamente aparece como violenta epidemia. A iniciada em 1967, devido a amostra de vírus velogênico e viscerotrópico, atingiu a maioria dos países de avicultura desenvolvida e, em 1970, nos Estados Unidos da América do Norte adquiriu proporções alarmantes, tendo suscitado a elaboração de programa especial de erradicação (WALKER & cols., 1973 e BEARD & cols., 1975).

Este tipo de programa, envolvendo sacrifício de plantéis infectados, requer grandes verbas havendo, ainda, a possibilidade de sobrevivência do vírus em outras aves domésticas ou não, além de, eventualmente, em mamíferos (HANSON, 1972 e JOHNSON & cols., 1974). Deste modo não parece indicado, atualmente, para a realidade brasileira, mas qualquer programa de controle ou erradicação necessita, sem dúvida, de diagnóstico rápido e de certeza para tornar viável o emprego imediato das

medidas sanitárias adequadas.

O diagnóstico da D.N.C., é feito, no Laboratório de Doenças das Aves da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais, por uma combinação de provas de inoculação em ovos embrionados, hemaglutinação (HA) e inibição da hemaglutinação específica (IH), para identificação do agente. A pesquisa de anticorpos inibidores da hemaglutinação no soro de aves vem sendo utilizada como recurso auxiliar.

Embora eficiente e já bastante integrado à rotina e às nossas condições de trabalho, estas provas apresentam limitações, principalmente no que se refere ao tempo gasto na confirmação do diagnóstico. Temos, ainda, que considerar a possível interferência de outros agentes infecciosos, ocasionalmente encontrados nos embriões, com o isolamento do vírus da D.N.C.; esta possibilidade já foi evidenciada com vírus CELO (ABLASHI & cols., 1965), vírus da encefalomielite aviária (YATES & cols., 1968) e vírus da bronquite infecciosa (RAGGI & PIGNATELLI, 1975).

Nesta linha de pensamento lembramo-nos da imunofluorescência (IF), eficiente, acurado, rápido e relativamente simples recurso já utilizado para o diag-

nóstico e pesquisa em várias doenças infecciosas do homem e dos animais.

E assim, como principais objetivos deste trabalho, destacamos:

1. preparação de conjugado fluorescente e sua utilização como método de diagnóstico;
2. o estudo experimental da patogenicidade para galinha de amostra, velogênica e viscerotrópica, isolada por nós e identificada como 733/EV-UFMG, objetivando selecionar os órgãos mais indicados à preparação de impressões destinadas ao diagnóstico da doença por IF;
3. aplicação da IF ao estudo da patogenicidade da mesma amostra para ovos embrionados, visando a obtenção de mais um recurso auxiliar de diagnóstico;
4. a comparação da eficiência e das vantagens das provas de IF frente aos métodos de inoculação em ovos embrionados, hemaglutinação e inibição da hemaglutinação no diagnóstico da doença natural.

2. Revisão da Literatura

BURNSTEIN & BANG (1958) estudaram a patogenicidade da amostra vacinal "B1" do vírus da D.N.C. para o sistema respiratório superior.

A IF permitiu aos autores demonstrar a natureza focal da doença, localizando o vírus onde a histopatologia evidenciou lesões. A localização citoplasmática do vírus foi evidenciada pela ausência de fluorescência no núcleo.

O vírus foi demonstrado em todo o sistema respiratório estudado, com localização e intensidade diferentes, persistindo por 12 dias, mesmo na presença de anticorpos circulantes.

CORSTVET & SADLER (1964) incluíram a D.N.C. entre as doenças das aves que podem ser diagnosticadas pela IF e encontraram um método rápido para identificar o agente em tecidos de aves.

O vírus foi detectado nos tecidos antes do aparecimento dos sintomas; fluorescência foi positiva no

primeiro dia após a inoculação e os sinais clínicos só apareceram no segundo. O número de células fluorescentes e a concentração do antígeno foi maior do quarto dia da inoculação.

MAESTRONE & COFFIN (1964) estudaram a patogenicidade da amostra "GB", em aves inoculadas por via nasal, e da amostra Roakin para embriões por diversas vias.

Encontraram na IF um método precoce e eficiente no diagnóstico da D.N.C. Identificaram o vírus em tecidos de aves infectadas a partir de três horas da inoculação enquanto os primeiros sintomas só apareceram no quarto dia.

Em ovos embrionados, a IF demonstrou o vírus em várias partes, antes do aparecimento de hemaglutininas e da atividade infectante no líquido alantóico.

ABLASHI & cols. (1965) observaram interferência da infecção latente do vírus CELO na multiplicação do vírus da D.N.C. em ovos embrionados.

EPSTEIN & cols. (1965) empregaram a IF para comparar lesões produzidas pelo vírus da D.N.C. em aves doentes e em cultura de tecidos (células Hela).

Cortes de traquéia, pulmão, encéfalo, fígado e baço foram fixados e estudados imediatamente, ou conservados em geladeira para estudos após 15 dias. A afinidade do vírus para o conjugado não foi afetada durante a conservação. Observaram fluorescência em células agrupadas em determinadas zonas de traquéia e pulmão, ficando negativo o resto do tecido. Havia áreas de células com coloração granular no citoplasma e áreas em que apareceram massas fluorescentes, traduzindo maior quantidade de vírus. O baço e fígado foram sempre negativos.

Concluíram que a técnica é método eficiente e rápido (uma hora) de diagnóstico, substituindo com vantagens a inoculação em ovos.

WILLIAMSON & BLATTNER (1965), pela IF, demonstraram o vírus, tanto no tecido de embriões como nas membranas extra-embrionárias, decorridas 16-24 horas da inoculação. Trabalharam com embriões de 48 horas de idade.

CORSTVET & SADLER (1966) usaram IF para demonstrar que a amostra Roakin cessa de multiplicar no organismo de aves infectadas imediatamente após o aparecimento de anticorpos inibidores da hemaglutinação no

soro, fato que pode interferir na eficiência da IF como método de diagnóstico.

BEARD & EASTERDAY (1967) estudaram, pela IF, a patogenicidade das amostras "B1" (vacinal) e "GB" (patogênica). As duas amostras foram demonstradas, com a mesma intensidade de fluorescência, na traquéia, a partir de 24 horas da exposição a aerossóis. A maior intensidade do brilho, observada no terceiro dia, coincidiu com a maior concentração de vírus na suspensão de macerado de traquéia, medida pela inoculação em ovos embrionados.

KARASEK & MULLER (1968) concluíram que a IF não era método eficiente de diagnóstico da D.N.C. quando só conseguiram demonstrar o vírus em duas de 24 aves inoculadas com a amostra Dresden. Trabalharam com impressões de fígado, baço, rim, pulmão, encéfalo, proventrículo e intestino e encontraram dois proventrículos e um fígado fluorescentes de todos os órgãos estudados das 24 aves.

ROSSI & CAPORALE (1968) compararam o resultado da IF e inoculação em ovos embrionados na demonstração do vírus em 30 aves com diagnóstico anatomopatoló-

gico da D.N.C. e encontraram 76,66% (23 aves) de eficiência para IF e 100% para a inoculação; em quatro aves, houve necessidade de passagem seriada em ovo para a confirmação do diagnóstico.

As amostras vacinais "F" e "H" foram, também, demonstradas no cerebelo, pulmão e coração desde o primeiro até o sexto dia da vacinação; na faringe permaneceram até o 10º dia.

Recomendaram a IF como método de diagnóstico, somente a partir do 10º dia após à vacinação.

YATES & cols. (1968) observaram que embriões infectados com vírus da encefalomielite aviária apresentaram baixos títulos infectantes e hemaglutinantes, em comparação aos de embriões normais, quando inoculados com vírus da D.N.C.

HEUSCHELE & EASTERDAY (1970) estudaram, pela IF, a permanência das amostras "B1" (vacinal) "GB" e "DH" (patogênicas) na traquéia de aves expostas a aerossóis. Concluíram que o vírus podia permanecer neste órgão até por 120 dias, confinado nos mononucleares (histiocitos) espalhados na mucosa, em localização exclusivamente citoplasmática nestas células.

PURCHASE (1973) fez uma revisão de vários as-

pectos da técnica de anticorpos fluorescentes e acrescentou experiência própria para sua aplicação ao estudo de doenças das aves de um modo geral.

Concluiu que o melhor indicador da capacidade de um soro-imune produzir bom conjugado é seu título de imunodifusão, mas que bons resultados são, também, obtidos com soros de altos títulos inibidores de hemaglutinação e vírus neutralizantes.

O melhor pH para a conjugação foi 9,0, conseguido e mantido com hidróxido de sódio a 0,5N; o tampão carbonato pode falhar na manutenção do pH neste nível.

Para remoção da coloração inespecífica, recomenda usar somente a diluição do conjugado além do ponto final da coloração inespecífica e trabalhar com material contendo antígeno umidecido antes da aplicação do conjugado diluído; a aplicação deste à preparações secas é causa de imunofluorescência inespecífica.

RAGGI & PIGNATELLI (1975) em estudos para identificação do vírus da bronquite infecciosa, observaram que este agente interferiu negativamente na multiplicação, em ovos embrionados, da amostra B1 do vírus da D.N.C.

3. Material e Métodos



1. Aves e ovos embrionados

1.1. Doença experimental

Foram utilizadas 12 galinhas, linhagem postura e sem raça determinada, com oito semanas de idade, negativas ao teste de IH com amostra LaSota e à prova de aglutinação rápida, em placa, com soro e sangue total, frente à preparação antigênica de Mycoplasma gal-lisepticum e Salmonella spp. As provas foram feitas semanalmente, por três vezes consecutivas. Este grupo foi simultaneamente infectado pelas vias oral e nasal.

1.2. Ovos embrionados

Na impossibilidade da obtenção de ovos embrionados originários de aves sensíveis à D.N.C., foram utilizados, em todas as fases do experimento, ovos com variáveis títulos IH na gema procedentes de plantel vacinado. Utilizou-se embriões de nove a 11 dias na doença natural e de 10 dias no estudo da patogenicidade do vírus para embrião.

1.3. Doença natural

Galinhas procedentes de granjas e criações domésticas, constituindo 52 lotes diferentes, de idade e raças variáveis e, ainda, aves procedentes de um lote de perus e outro de gansos, no total de 54 lotes, foram trazidas ao Laboratório e estudadas pela técnica de IF e pelo método usual de diagnóstico. Quando chegavam vivas, eram sangradas para a pesquisa de anticorpos inibidores da hemaglutinação.

2. Preparo de soro-imune destinado à conjugação

Foram usados frangos de linhagem postura, sem raça definida, negativos à pesquisa de anticorpos para M. gallisepticum e Salmonella spp. pela aglutinação rápida, em placa, feita com soro e sangue total e para D.N.C. pelo IH, nas sexta, sétima e oitava semanas.

Receberam inoculação semanal com amostra La-Sota, mantida no Laboratório por passagens em ovos embrionados, vias nasal e intramuscular, simultaneamente, nas oitava, nona e 10a. semanas e, pelas vias nasal e intramuscular, também simultaneamente, nas 12a. e 14a. semanas. Quatro frangos com título IH constantes, à altura das 12a., 13a. e 15a. semanas, foram sangrados para obtenção de soro. Estes frangos permaneceram negativos à pesquisa de anticorpos com os antígenos de Salmo-

nella spp. e M. gallisepticum.

Obteve-se soro com 7,5% de proteína total, medida pelo Refratômetro Atago*, com título IH entre 40 e 80 mil, medido pelo método beta, conforme CUNNINGHAM (1956), usando quatro unidades hemaglutinantes da amostra LaSota e quantidades de soro, vírus e eritrócitos a 0,5%, ajustadas para 0,2 ml.

Ao soro foi adicionado mertiolato na concentração final de 1:10.000 e dividido em frações de 3,5ml para estocagem a -20°C.

3. Conjugado para imunofluorescência

3.1. Preparo e titulação

O soro total destinado à conjugação, após clarificação a 3.000 r.p.m. (2.200 g) por 30 minutos a 5°C, foi tamponado com carbonato-bicarbonato, pH9,0, na proporção de 0,1/ml.

Isotiocianato de fluoresceína**em pó, na proporção de 1:40 em relação às proteínas totais do soro, foi acrescido em agitação magnética e à temperatura de

* Atago Serum Protein Refractometer; Atago Optical Works Comp. Ltda.

** Fluorescein Isothiocyanate - Isomer II - BBL Baltimore Biological Laboratory.

geladeira. Após uma noite (13 horas) de conjugação, o produto foi passado em coluna de DEAE-celulose*, montada de véspera e mantida em geladeira. Usou-se tubo de vidro de 1 cm de diâmetro interno e 3,5 cm de altura da coluna, por 1 ml de conjugado. A eluição do conjugado da coluna foi feita com tampão de fosfatos 0,0175 M pH=6,3 (ANÔNIMO, 1969) lentamente, sem pressão e em banho de gelo.

O conjugado foi colhido em frações que foram agrupados, conforme a tonalidade da cor, para posterior titulação.

Para esta operação foram feitas oito diluições múltiplas de 5, seriadas de 1:5 a 1:40, em salina a 0,85%, líquido alantóico, normal e infectado e aplicado à lâmina controle preparada de traquéia lesada, colhida de ave morta pela D.N.C.

3.2. Especificidade

A especificidade do conjugado foi demonstrada com base nos seguintes resultados:

1º) ausência de fluorescência nas impressões tratadas com conjugado diluído previamente em líquido alantóico contendo vírus e presença, nas tratadas com

* DEAE-celulose-Mesh medium; capacity 0,80 meg/mg.
Sigma Chemical Co.

diluições em líquido normal e em salina;

2º) não apresentação de fluorescência em impressões previamente tratadas com soro-imune e

3º) ausência de fluorescência em impressão de todos os órgãos (conjuntiva, fundo do globo ocular, fossa nasal, traquéia, proventrículo, placa de Payer, papila cecal, cloaca, baço, fígado, bolsa de Fabricio, encéfalo, medula lombar) de aves aparentemente normais e presença em impressões de órgãos de aves com doença experimental. Foram utilizados órgãos de frangos de aproximadamente 10 semanas, sendo três aparentemente normais e três com doença experimental.

4. Métodos utilizados

4.1. Imunofluorescência

Usou-se o método direto conforme CORSTVET & SADLER (1964), BRAUNE & GENTRY (1965) e ANÔNIMO (1969), diluindo-se o conjugado em líquido alantóico normal, para a adsorção de coloração inespecífica, e em líquido alantóico infectado, para controle do método.

4.1.1. Preparo de lâminas

As partes da membrana corioalantóica (m.c.a.) e da membrana da casca delimitadas pela câmara de ar,

eram cortadas e colocadas sobre uma lâmina, ficando livre a superfície que estava em contato com o líquido alantóico. Escorria-se o líquido alantóico e aguardava-se alguns minutos. Sobre esta preparação colocava-se a lâmina para a IF e, através de leve pressão e deslocamento das lâminas, obtinha-se as impressões destinadas ao exame.

O líquido alantóico era aspirado com seringa e submetido à pesquisa de hemaglutininas pela técnica de CUNNINGHAM (1956).

O encéfalo e o fígado eram colhidos com tesoura e pinça estéreis, um conjunto por embrião e por órgão, e colocados sobre a lâmina destinada ao estudo da IF. Fazia-se macerado com bastão individual e preparava-se esfregaço fino.

Para os órgãos de aves, fazia-se impressões encostando a lâmina diretamente sobre a parte selecionada para estudo.

Impressões ou esfregaços de órgãos foram secos à temperatura ambiente, mais ou menos 20 minutos e fixados em acetona por 40 minutos em congelador de geladeira doméstica (- 20°C). Após escorrer o fixador, as impressões eram delimitadas por anéis de esmalte.

Uma gota do conjugado diluído em salina e líquido alantóico, normal e infectado, foi distribuído sobre as impressões de cada lâmina, na fase de titulação. Nos trabalhos de rotina foi desprezada a diluição em salina.

Uma lâmina controle, positiva, era tratada da mesma maneira que a lâmina contendo material suspeito, toda vez que se fazia nova diluição do conjugado.

As lâminas foram colocadas em câmara úmida e esta mantida em estufa a 37°C, por 40 minutos.

A câmara úmida, contendo as lâminas, era imersa rapidamente, três a quatro vezes, em salina a 0,85%, tamponada (pH 7,2) e à temperatura de geladeira e, depois, duas outras vezes por período de cinco a dez minutos, com movimentos frequentes. Finalmente era imersa rapidamente em água destilada, pH 7,2, por várias vezes. Escorria-se a água da última lavagem, Aplicava-se uma gota de glicerina diluída em salina tamponada (pH 7,2), a cada impressão, e completava-se a montagem com lamínula.

4.1.2. Microscopia

Logo após a montagem as lâminas eram observadas ao microscópio. No nosso caso utilizamos um binocu-

lar Standard, objetiva de imersão 40 X, provida de diafragma, ocular 10 X, condensador de campo escuro a óleo, iluminação com lâmpada ultravioleta HBO-200 Osram, filtro de excitação 4 G-2 e de barreira 0/41*.

4.2. Inoculações

Na reprodução experimental da doença foi utilizada a amostra 733/EV-UFMG, em líquido alantóico, com título HA = 1:512 e DL₅₀ = 10^{7,52}. Este inóculo foi usado na dose de 0,1ml na narina e 0,1ml na cavidade bucal.

No estudo da patogenia para embrião não se determinou a DL₅₀ do inóculo.

A amostra 733/EV-UFMG foi isolada neste Laboratório de aves com doença natural e vem sendo mantida em ovo embrionado desde 1969. É velogênica, pois a DLM mata os embriões em tempo médio inferior a 48 horas, e viscerotrópica, tendo causado lesões intestinais na doença natural e na experimental. Aglutina eritrócitos de galinha, bovinos, eqüinos e ovinos.

Para isolamento do vírus, nos casos de doenças

*Carl Zeiss Companhia Óptica e Mecânica - OBERKOCHEN-WG

naturais, utilizou-se como inóculo fragmentos dos órgãos empregados na preparação das impressões destinadas ao estudo da IF. Após à trituração foram suspensos em salina estéril, adicionada de 10.000 UI de penicilina G potássica e 10 mg de sulfato de estreptomicina, por ml, e centrifugado a 1.500 r.p.m. (750 g), 10 minutos.

Inoculou-se ovos embrionados de nove a 11 dias, sendo 0,1 ml depositado no fundo da câmara de ar, atravessando-se a gota formada com a mesma agulha com que se inoculava outro tanto, diretamente na cavidade alantóica. Para cada um dos 54 lotes de aves com doença natural estudados foram utilizados seis ovos por passagem. No estudo da patogenia para embriões utilizou-se somente ovos de 10 dias de incubação.

5. Desenvolvimento do experimento

As galinhas inoculadas pelas vias nasal e oral foram examinadas várias vezes ao dia para observação dos sintomas, necropsiando-se uma para estudos em cada das seguintes horas após à inoculação: 2, 6, 20, 30, 44, 54, 74, 98, 115, 121 e 138; com 138 horas foram estudadas duas aves. As estudadas com 115, 121 e 138 horas estavam mortas e as demais foram sacrificadas por cho-

que elétrico.

Antes do sacrifício, colheu-se sangue para o título IH do soro e, à necrópsia, o humor aquoso para pesquisa de hemaglutininas.

Durante a necrópsia, qualificou-se as lesões dos diversos órgãos conforme sua gravidade e fez-se impressões para a IF. A fluorescência foi quantificada conforme o número de células fluorescentes e a intensidade do brilho.

O estudo da patogenicidade para ovos embrionados, numa primeira etapa, foi feito decorridos os seguintes períodos da inoculação: 3, 6, 10, 20, 24, 30, 36, 40 e 48 horas. Em cada um destes horários fez-se ovoscopia e retirou-se todos os ovos com embriões mortos e alguns com embriões vivos, colocando-se em geladeira, pelo menos 30 minutos antes do prosseguimento dos estudos.

Numa segunda etapa estudou-se somente embriões mortos retirados da incubadora após ovoscopia feita com 12 horas de intervalo.

Anotou-se o resultado da IF por órgão, tempo decorrido da inoculação e condição do embrião (vivo ou morto).

Em cada ovo estudou-se a presença de hemaglutininas no líquido alantóico e anticorpos inibidores da hemaglutinação na gema, pela técnica de CUNNINGHAN(1956).

Quanto à doença natural, estudou-se as aves à medida que chegavam ao Laboratório. Selecionou-se os órgãos para impressões, conforme a presença e gravidade de lesões. Um mínimo de quatro lâminas, por lote de aves, foram estudadas, mas a presença de fluorescência em uma única impressão foi suficiente para confirmar o diagnóstico. O encéfalo fez parte quando havia sintomas nervosos e o baço quando as lesões foram inexpressivas em todos os órgãos. Nos ovos inoculados para confirmação do diagnóstico, fez-se ovoscopia, duas vezes ao dia, e pesquisou-se hemaglutininas após a morte dos embriões ou às 72 horas da inoculação. A presença de hemaglutininas específicas em um dos ovos, qualquer que fosse a condição do embrião, confirmava o diagnóstico. O resultado só foi considerado negativo quando não aparecia atividade hemaglutinante até a terceira passagem serializada.

4. Resultados

1. Doença experimental

Os resultados desta fase, organizados conforme o tempo decorrido após à inoculação, estão no Mapa I onde se associou dados clínicos, pesquisa de IF em órgãos e de hemaglutininas no humor aquoso e, ainda, na Tabela I organizada para evidenciar a distribuição percentual, por órgãos, das lesões macroscópicas e da presença de IF.

Na ave necropsiada com 20 horas após à inoculação, quando não se observava sintomas nítidos em nenhuma ave do lote, a IF já era evidente. À necropsia esta ave apresentou lesões discretas, insuficientes como sugestão da doença, mas o vírus foi demonstrado, pela IF, na fossa nasal, traquéia e baço. A fossa nasal estava ligeiramente congesta; traquéia e baço estavam normais.

Os primeiros sintomas apareceram entre 30 e 44 horas da inoculação, quando quatro aves se mostraram

tristes e inapetentes. Uma quinta apresentou-se triste mas consumiu a quantidade normal de ração enquanto duas outras baixaram este consumo, sem outra manifestação da doença.

2. Patogenicidade para ovos embrionados

Os resultados da pesquisa de IF estão nas Tabelas II, III, IV e V. As três primeiras referem-se aos embriões, vivos e/ou mortos, colhidos para estudo com intervalos inferiores a 12 horas e a última (Tabela V) a embriões mortos colhidos com base em ovoscopias intervaladas de 12 horas. Neste lote não ocorreu morte na primeira ovoscopia.

Quanto à presença de hemaglutininas no líquido alantóico, todos os 50 embriões estudados eram positivos à partir das 10 horas de inoculação. Provas executadas com seis horas deram somente 40% de resultados positivos. Estudo da correlação entre a prova de HA em líquido alantóico e de IF na membrana corioalantóide, com o respectivo percentual de concordância, é apresentado na Tabela VI.

3. Doença natural

Nas Tabelas VII, VIII e IX foram reunidos os

resultados dos 54 lotes de aves estudadas. Na primeira delas reunimos os dados relativos a três passagens feitas em ovos embrionados enquanto que, na Tabela VIII foi estabelecido o percentual de concordância entre passagem em ovos embrionados e a pesquisa de IF. Na Tabela IX procurou-se avaliar, também em percentual, os atributos de sensibilidade e especificidade da IF frente à prova de inoculação de ovos embrionados, no caso teste padrão, conforme orientação de THORNER & REMEIN (1961).

MAPA I

Distribuição de dados clínicos, hemaglutininas no humor aquoso, fluorescência e lesões macroscópicas na doença de Newcastle, experimental, conforme o tempo decorrido da inoculação

MANIFESTAÇÕES	HORAS APÓS À INOCULAÇÃO										
	20	30	44	54	74	98	115**	121**	138-1**	138-2**	
Sintomas Gerais	I	-	-	+	+	++++	++	++++	++++	++++	++++
	Y	-	-	+	++	++++	++++	++++	++++	++++	++++
Corrimento Ocular		-	-	-	-	-	-	-	++	++	
Conjuntiva	E	+	++	++	+++	-	-	-	-	-	
	C	-	+	+	+	-	++	++	++	++	
	F	-	+	+	-	-	++	++	+	++	
Clobo ocular	HA	-	-	-	-	+	-	-	+	++	
	F.	-	-	-	-	+	-	+	-	++	
Sintomas respiratórios	CN	-	-	-	-	-	-	+++	+++	+++	
	D	-	-	-	-	-	+++	+	+++	+++	
	E	-	-	-	-	-	++	-	+++	+++	
Fossa nasal	E	+	+	++	++	-	++	+++	+++	-	
	C	-	+	-	-	-	-	-	-	-	
	F	-	+	+	-	-	-	+	++	+++	
Traquéia	E	+	+	+	+	-	++	++	-	+	
	C	-	+	-	-	-	-	-	-	-	
	F	-	-	-	+	+	++	+	+	++	
Diarréia	E	-	-	-	-	+	-	-	++	++	
	C	-	-	-	-	-	-	-	++	++	
	F	-	-	-	-	-	-	-	++	++	
Proventrículo	E	-	-	-	-	+	+	++	+	++	
	F	-	-	-	-	++	+	+	++	+++	
Placa de Payer	C	-	-	+	+	-	-	-	-	-	
	E	-	-	-	-	+++	+++	+++	+	++	
	U	-	-	-	-	+++	+++	+++	+	+++	
Papila cecal	E	+	+	+	-	-	++	++	+	++	
	HIP	-	+	-	+	-	-	-	-	-	
	F	-	+	-	+	++	++	+	+	+++	
Cloaca	C	+	+	-	-	-	-	-	-	-	
	H	+	+	+	-	-	++	+++	++	-	
	F	+	-	+	-	-	-	++	+++	++	
Baço	E	-	+	-	-	-	-	-	-	-	
	HIP	-	+	-	++	-	-	-	-	-	
Fígado***	E	+	-	+	+	+++	-	++	++	+++	
	F	-	-	+	+	++	-	+	-	++	
Bolsa de Fabricius	E	-	-	-	-	-	-	-	+	-	
	F	-	-	-	-	-	-	++	-	-	
Sintomas nervosos		-	-	-	-	-	-	++	-	-	
Encéfalo***	F	-	-	-	+	+	-	++	+++	++	
Medula lombar***	F	-	-	-	+	+	-	++	+	-	

C - Congestão
 CN - Corrimento nasal
 D - Dispnéia
 E - Exsudato
 F - Fluorescência
 F. - Fluorescência na região do nervo óptico
 H - Hemorragia
 HA - Hemaglutininas

HIP - Hipertrofia
 I - Inapetência
 R - Estertor respiratório (ronquera)
 T - Triptera
 U - Úlcera
 - Ausência
 + - Presença (cada + = 25%)

+- Presença discreta
 * - Não foram incluídas duas aves sem sintomas, lesões ou fluorescência nos órgãos estudados necropsiadas após duas e seis horas da inoculação

** - Aves encontradas mortas
 *** - Órgãos sem lesões macroscópicas

TABELA I

Correlação entre lesões macroscópicas e fluorescência em órgãos de aves inoculadas, por via oral, com a amostra 733/EV-UFGM do vírus da doença de Newcastle

ÓRGÃOS	COM LESÕES				SEM LESÕES				TOTAL	
	Estu- dados	Fluorescentes		Estu- dados	Fluorescentes		Estu- dados*	Fluorescentes		
		Nº	%		Nº	%		Nº	%	
Conjuntiva	9	8	88,88	1	0	0	10	8	80,00	
Globo ocular**	0	0	0	10	4	40,00	10	4	40,00	
Fossa nasal	9	7	77,77	1	0	0	10	7	70,00	
Traquéia	9	8	88,88	1	1	100,00	10	9	90,00	
Proventrículo	6	5	83,33	4	0	0	10	5	50,00	
Placa de Payer	8	6	75,00	2	0	0	10	6	60,00	
Papila cecal	8	5	62,50	2	1	50,00	10	6	60,00	
Cloaca	7	4	57,14	3	0	0	10	4	40,00	
Baço	2	0	0	8	6	75,00	10	6	60,00	
Fígado	0	0	0	10	6	60,00	10	6	60,00	
Bolsa de Fabrício	1	0	0	9	1	11,11	10	1	10,00	
Encéfalo	0	0	0	10	5	50,00	10	5	50,00	
Medula lombar	0	0	0	10	4	40,00	10	4	40,00	
Total	59	43	72,88	61	28	45,90	130	71	54,61	

* Excluídas duas aves, necropsiadas após duas e seis horas após à inoculação, sem qualquer manifestação de sintomas, sem lesões macroscópicas ou fluorescência nos órgãos estudados.

** Parte interna na altura do nervo óptico.

TABELA II

Resultado da imunofluorescência aplicada a partes de embriões, inoculados com a amostra 733/EV-UFMG do vírus da doença de Newcastle, sacrificados para estudo e observados a intervalos inferiores a 12 horas

EMBRIÕES		IMUNOFLUORESCÊNCIA POSITIVA					
Nº	Horas após à inoculação	M.C.A.		FÍGADO		ENCÉFALO	
		Nº	%	Nº	%	Nº	%
5	3	2	40,00	3	60,00	2	40,00
5	6	5	100,00	4	80,00	3	60,00
1	10	1	100,00	1	100,00	0	0
2	20	2	100,00	2	100,00	1	50,00
4	24	3	75,00	1	25,00	2	50,00
3	30	3	100,00	1	33,33	3	100,00
3	36	3	100,00	Prejudicado*		2	66,66
2	40	2	100,00	Prejudicado*		0	0
1	48	1	100,00	0	0	1	100,00
26		22	84,61	12	57,14**	14	53,84

* Esfregaço muito seco.

** Calculado sobre total de 21.

M.C.A.: membrana corioalantóide.

TABELA III

Resultado da imunofluorescência aplicada a partes de embriões, mortos, inoculados com a amostra 733/EV-UFGM do vírus da doença de Newcastle, observados a intervalos inferiores a 12 horas

EMBRIÕES		IMUNOFLUORESCÊNCIA POSITIVA					
Nº	Horas após à inoculação	M.C.A.		FÍGADO		ENCÉFALO	
		Nº	%	Nº	%	Nº	%
1	10	1	100,00	0	0	1	100,00
1	20	1	100,00	1	100,00	1	100,00
7	24	5	71,42	4	57,14	3	42,85
4	30	3	75,00	3	75,00	4	100,00
10	36	8	80,00	Prejudicado*		5	50,00
1	40	1	100,00	Prejudicado*		1	100,00
5	48	5	100,00	5	100,00	3	60,00
29		24	82,75	13	72,22**	18	62,06

* Esfregaço muito seco.

** Calculado sobre o total de 18.

M.C.A.: membrana corialantóide.

TABELA IV

Resultado acumulado da imunofluorescência aplicada a partes de embriões, vivos ou mortos, inoculados com a amostra 733/EV-UFMG do vírus da doença de Newcastle, observados a intervalos inferiores a 12 horas

EMBRIÕES		IMUNOFLUORESCÊNCIA POSITIVA					
Nº	Horas após à inoculação	M.C.A.		FÍGADO		ENCÉFALO	
		Nº	%	Nº	%	Nº	%
5	3	2	40,00	3	60,00	2	40,00
5	6	5	100,00	4	80,00	3	60,00
2	10	2	100,00	1	50,00	1	50,00
3	20	3	100,00	3	100,00	2	66,66
11	24	8	72,72	5	45,45	5	45,45
7	30	6	85,71	4	57,14	7	100,00
13	36	11	84,61	Prejudicado*		7	53,84
3	40	3	100,00	Prejudicado*		1	33,33
6	48	6	100,00	5	83,33	4	66,66
55		46	83,63	25	64,10**	32	58,18

* Esfregaço muito seco.

** Calculado sobre o total de 39.

M.C.A.: membrana corioalantóide.

TABELA V

Resultado da imunofluorescência aplicada à membrana corioalantóide de embriões, mortos, inoculados com a amostra 733/EV-UFMG do vírus da doença de Newcastle, observados a intervalos de 12 horas

E M B R I Õ E S		RESULTADOS POSITIVOS	
Nº	Horas após à inocula- ção	M.C.A.*	
		Nº	%
8	24	2	25,00
19	36	17	89,47
9	48	6	66,66
36		25	69,44

* membrana corioalantóide

TABELA VI

Concordância entre provas positivas de imunofluorescência em membrana corioalantóide de embriões vivos ou mortos, inoculados com a amostra 733/EV-UFMG, com presença de hemaglutininas no líquido alantóico

M.C.A.		IMUNOFLUORESCÊNCIA POSITIVA		HEMAGLUTINAÇÃO		PERCENTUAL DE CONCORDÂNCIA
Nº	Horas após à inoculação	Nº	%	Nº	%	
5	3	2	40,00	0	0	0
5	6	5	100,00	2	40,00	40,00
2	10	2	100,00	2	100,00	100,00
3	20	3	100,00	3	100,00	100,00
11	24	8	72,72	11	100,00	72,72
7	30	6	85,71	7	100,00	85,71
13	36	11	84,61	13	100,00	84,61
3	40	3	100,00	3	100,00	100,00
6	48	6	100,00	6	100,00	100,00
55		46		47		

TABELA VII

Diagnóstico da doença de Newcastle, natural, em 54 lotes de aves, através de passagens em ovos embrionados

RESULTADOS	NÚMERO DA PASSAGEM						RESULTADO FINAL	
	Primeira		Segunda		Terceira		Nº	%
	Nº	%	Nº	%	Nº	%		
Positivos	37	68,52	12	70,59	1	20,00	50	92,59
Negativos	17	31,48	5	29,41	4	80,00	4	7,41
TOTAL	54		17		5		54	

TABELA VIII

Diagnóstico da doença de Newcastle, natural, em 54 lotes de aves, através da prova de imunofluorescência e sua concordância percentual com passagens em ovos embrionados

RESULTADOS FINAIS	IMUNOFLUORESCÊNCIA		OVOS EMBRIONADOS		PERCENTUAL DE CONCORDÂNCIA
	Nº	%	Nº	%	
Positivos*	39	72,22	50	92,59	76,00
Suspeitos**	9	16,67	-	-	-
Negativos	6	11,11	4	7,41	26,66***
TOTAL	54		54		

* Um caso não confirmado pela inoculação em ovos embrionados.

** Três casos confirmados pela inoculação em ovos embrionados.

*** Calculado sobre o total de 15 (IF suspeitos e negativos).

TABELA IX

Coeficiente de sensibilidade e especificidade da prova de imunofluorescência utilizada como método de diagnóstico da doença de Newcastle, natural, em 54 lotes de aves

IMUNOFLUO- RESCÊNCIA	INOCULAÇÃO EM OVOS		TOTAL	COEFICIENTES	
	Positiva	Negativa		Sensibi- lidade	Especifi- cidade
Positiva	38	1	39	76,00	-
Negativa*	12	3	15	-	75,00
TOTAL	50	4	54		

* Inclui nove resultados suspeitos.

5. Discussão

1. Doença experimental

Não observamos correlação perfeita entre a gravidade de sintomas ou de lesões com a intensidade de fluorescência. Esta pareceu, entretanto, um pouco melhor relacionada às lesões. Observamos aumento expressivo no número de células fluorescentes e na intensidade do brilho nas impressões dos órgãos das aves com curso avançado, quando de um modo geral foram mais graves os sintomas e lesões, mas isto não ocorreu de uma maneira uniforme. Tais afirmações têm como base os dados, inconcludentes, contidos no Mapa I.

Nossos achados estão de acordo com os diversos autores que indicaram a IF como método de diagnóstico da D.N.C., discordando entretanto, de KARASEK & MULLER (1968), que somente conseguiram demonstrar o vírus em dois de 24 (8,37%) frangos inoculados.

A baixa frequência (54,61%) do resultado total positivo (Tabela I) pode gerar falsa impressão, à



primeira vista, sobre a eficiência da IF. Entretanto é resultado acumulado de impressões de órgãos e não de aves inoculadas. Se verificada individualmente esta percentagem atinge 100%, pois em todas as aves que apresentaram sintomas e/ou lesões, ocorreu fluorescência específica em um ou mais órgãos (Mapa I).

A ausência de fluorescência em todos os órgãos das aves estudadas a duas e seis horas de inoculação, discorda do encontrado por MAESTRONE & COFFIN (1964) que demonstraram antígeno fluorescente na traquéia e vários outros órgãos mais precocemente. Este fato pode traduzir diferenças de comportamento patogênico de amostra ou de técnica de diagnóstico. Como nós, estes autores usaram, também, amostra velogênica mas marcaram somente imunoglobulinas e a coloração foi feita em temperatura ambiente, por uma hora. O fato de conjugarem somente imunoglobulinas pode ter contribuído para maior potência e sensibilidade do conjugado.

Outro tópico de discordância entre nossas pesquisas se relaciona à sintomatologia: no nosso caso os sintomas gerais e os específicos apareceram entre 30 e 44 horas após à inoculação e na observação daqueles

autores entre 72 e 96 horas. Sendo as técnicas de inoculação bastante similares, pensamos que este fato corrobora a diferença de comportamento patogênico das amostras.

O aparecimento de fluorescência antes de sintomas característicos foi descrito por outros autores, trabalhando com amostras diversas e alguma diferença na técnica de IF, mas nenhum estabeleceu correlação entre fluorescência e lesões macroscópicas.

CORSTVET & SADLER (1966), ROSSI & CAPORALE (1968), descreveram a presença do vírus em vários órgãos no primeiro dia da inoculação, fato que também encontramos (IF positiva na fossa nasal, traquéia e baço da ave estudada com 20 horas de inoculação - Mapa I) mas não precisaram o número de horas decorridas após inoculação.

Visando ao diagnóstico da D.N.C. pela IF, MAESTRONE & COFFIN (1964) sugeriram trabalhar com encéfalo, pulmão e baço, enquanto que ROSSI & CAPORALE (1968) concluíram que cerebelo, coração e pulmão são os órgãos de eleição. Segundo nossos achados, os órgãos a serem estudados para o diagnóstico da D.N.C. pela IF não devem ser predeterminados com rigidez e sim selecionados pela

presença de lesões macroscópicas. Entretanto, a frequência de lesões e a alta positividade de reações de IF da traquéia (90,00%) observadas neste experimento (Mapa I e Tabela I) sugerem seja este órgão incluído entre os de eleição para diagnóstico da D.N.C.

Parece ser este o primeiro registro da presença de antígeno fluorescente do vírus da D.N.C. na conjuntiva de aves e a alta frequência de reações positivas (80,00%) indica que este órgão é, também, muito indicado para pesquisa do vírus pela técnica de IF (Mapa I e Tabela I). Segue-se a fossa nasal com expressiva percentagem (70,00%) sendo que o órgão menos indicado, nas condições deste experimento, foi a bolsa de Fabricius, positiva em somente uma ave das 10 estudadas (10,00%).

O encéfalo deve ser estudado, obrigatoriamente, quando ocorrer sintomatologia nervosa. A única ave com esta sintomatologia apresentou boa fluorescência (+++) neste órgão (Mapa I). A frequência de somente 40,00% de IF positivas em encéfalos de aves sem sintomas nervosos e as dificuldades da colheita deste órgão, dispensam sua inclusão na rotina do diagnóstico da

D.N.C., quando não ocorrer sintomatologia nervosa.

2. Patogenicidade para ovos embrionados

Como MAESTRONE & COFFIN (1964) e WILLIANSON & BLATNER (1965), demonstramos pela IF o vírus em várias partes do embrião. A IF apareceu antes da atividade hemaglutinante no líquido alantóico (Tabela VI).

MAESTRONE & COFFIN (1964), estudando a amostra Roakin, demonstraram fluorescência na m.c.a. uma hora após à inoculação e afirmaram que as atividades infectante e hemaglutinante, além de mais tardias, estão presentes de modo independente uma da outra. Enquanto a IF demonstrou o vírus em todas as partes estudadas de todos os embriões, a pesquisa de hemaglutininas e atividade infectante do líquido alantóico foi positiva em pequeno número destes.

A parte do embrião com maior frequência de IF, em nosso experimento foi a m.c.a., independentemente do intervalo de colheita dos embriões e do seu estado, vivo ou morto (Tabelas II, III, IV e V). Às três horas da inoculação observamos reação positiva em 40,00% dos embriões, enquanto a pesquisa de hemaglutininas foi negativa para todos os cinco estudados. Às seis horas da

inoculação a percentagem de fluorescência aumentou para 100,00%, aparecendo atividade hemaglutinante, no líquido alantóico, em 40,00% dos embriões, sendo que 100,00% de concordância foi observado com 10, 20, 40 e 48 horas de inoculação (Tabela VI).

A pesquisa de hemaglutininas foi mais eficiente em nossas condições do que nas de MAESTRONE & COFFIN (1964). Demonstramos atividade hemaglutinante no líquido alantóico a seis horas da inoculação e estes autores só o fizeram a partir do segundo dia. A partir das 10 horas da inoculação 100,00% dos embriões estudados por nós tiveram atividade hemaglutinante e, no estudo destes autores a maior percentagem encontrada foi de 29,41% (5/17).

A maior eficiência da pesquisa de hemaglutininas em nosso experimento pode ser devido à concentração de vírus no inóculo, via de inoculação ou, ainda, ao comportamento antigênico diferente das amostras. Trabalhamos com amostra velogênica-viscerotrópica e os autores acima mencionados com mesogênica-vacinal. Pelo nosso método, inoculamos ao mesmo tempo a m.c.a. e a cavidade alantóica com quantidade fixa de inóculo; eles

empregaram vias e concentração diferentes, sendo a maior porcentagem de reações encontradas nos embriões inoculados pela cavidade alantóica e com inóculo mais concentrado.

A IF foi mais eficiente nas condições de MAESTRONE & COFFIN (1964) do que nas nossas. Eles encontraram 100,00% de órgãos fluorescentes, enquanto nossa maior porcentagem média de reação positiva foi de 84,61%, observada na m.c.a. de embriões sacrificados após ovoscopia a curtos intervalos (Tabela II). Houve variações de conformidade com a parte estudada, hora decorrida da inoculação e estado do embrião, vivo ou morto, que estão relacionadas nas Tabelas II, III e IV. Esta menor eficiência pode ser explicada por diferenças na técnica empregada. Estes autores conjugaram somente imunoglobulinas obtidas de aves inoculadas com LaSota e depois com a amostra Roakin, e nós conjugamos proteínas totais de soro-imune produzido em galinha, exclusivamente com amostra LaSota. Eles inocularam nos ovos a amostra Roakin, uma das que empregaram na preparação do soro-imune e nós inoculamos uma amostra de campo, velogênica e viscerotrópica. É possível haver comportamento

antigênico diferente entre as amostras estudadas, interferindo nas reações antígeno-anticorpo-fluorescente.

Também trabalharam com corte de tecidos e nós com impressões.

Segundo CORSTVET & SADLER (1964) pesquisando-se IF em aves e não em embriões, os órgãos negativos, examinados pela técnica de impressões, podem ser positivos quando examinados pela técnica de corte.

Outra hipótese a considerar seria uma possível interferência negativa, sobre o antígeno fluorescente, de anticorpos existentes nos ovos. Todos os que entraram em nossa pesquisa tinham anticorpos inibidores de hemaglutinação na gema e MAESTRONE & COFFIN (1964) não fazem referência a este respeito.

Observamos, durante nosso experimento, que a atividade fluorescente do antígeno é prejudicada pela permanência dos ovos na incubadora após a morte dos embriões, principalmente para o vírus localizado na m.c. a. Assim, a percentagem média de positividade de 83,63 em embriões mortos, colhidos a curtos intervalos, reduziu-se a 69,44% quando as colheitas foram intervaladas de 12 horas (Tabelas IV e V).

Nos embriões colhidos para estudos em ovosco-

pia a curtos intervalos, observou-se 84,61% de m.c.a. positivas nos vivos (Tabela II) e 82,75% nos mortos (Tabela III). Fígado e encéfalo foram mais fluorescentes nos embriões mortos do que nos vivos (Tabelas II e III). Uma maior multiplicação do vírus em alguns embriões, poderia acarretar a morte e maior concentração de antígenos fluorescentes nos diversos órgãos, explicando a maior percentagem de fígado e encéfalo fluorescentes nos embriões mortos estudados nestas condições. A permanência, mesmo curta, dos embriões mortos na incubadora teria agido mais intensa e precocemente sobre os antígenos da m.c.a. explicando a percentagem, ligeiramente menor, de fluorescência nesta parte dos embriões em relação aos sacrificados para estudo.

Embora nossos resultados, obtidos com a amostra 733/EV-UFMG, refiram-se a uma estirpe patogênica adaptada a embriões, acreditamos que achados semelhantes poderiam ser obtidos com amostras de campo. No único caso de doença natural em que aplicamos o método, a amostra teve comportamento semelhante.

3. Doença natural

A inoculação em ovos embrionados, nossa téc-

nica de diagnóstico tomada como padrão, ofereceu 68,52% (37/54) de resultados positivos em inoculação única. Passagens seriadas aumentaram a eficiência para um resultado final de 92,59%, confirmando o diagnóstico em 50 dos 54 lotes de aves estudados. Isto corresponde a 24,07% (13/54) a mais de achados positivos sobre o total dos lotes estudados. Considerando somente os resultados negativos à primeira passagem, isto representa 58,18% (13/22) de positividade (Tabela VII).

A menor eficiência desta prova, em nosso experimento, em relação à eficiência total relatada por ROSSI & CAPORALE (1968), parece poder ser explicada pela hipótese de nosso inóculo conter anticorpos em quantidades de neutralizar o vírus. Nos casos em que não conseguimos isolar o vírus tratavam-se de aves com altas taxas de anticorpos inibidores da hemaglutinação e o inóculo, feito com vários órgãos, permaneceu em temperatura ambiente, pelo menos, por 30 minutos, para facilitar a ação dos antibióticos inibidores de possíveis contaminantes e este tempo pode ter sido suficiente para a neutralização do vírus no caso da presença de anticorpos neutralizantes. Os autores citados não fazem

referências a esta presença nas aves por eles trabalhadas, mas prepararam inóculo somente com encéfalo e este órgão poderia ter menor taxa de anticorpos do que a dos órgãos que constituíram nosso inóculo. É preciso salientar, porém, que isolamos vírus de aves com presença de anticorpos inibidores da hemaglutinação, embora com taxas inferiores às das aves em questão.

Não tivemos oportunidade de estudar a possível participação de outros agentes que pudessem interferir negativamente no isolamento do vírus da D.N.C. tais como o vírus CELO (ABLASHI & cols., 1965), o da encefalomielite aviária (YATES & cols., 1968) e o da bronquite infecciosa (RAGGI & PIGNATELLI, 1975).

Nossos achados relativos à IF, diagnosticando 72,22% dos casos de doença natural, confirmam a técnica como rápido e eficiente recurso diagnóstico. Esta afirmação concorda com as de EPSTEIN & cols. (1965) e ROSSI & CAPORALE (1968) quando a reconheceram como técnica de grande valor específico capaz de evidenciar casos precoces de doença natural. Segundo nosso roteiro pode-se firmar diagnóstico dentro de duas horas, ficando somente os casos suspeitos e negativos, respectivamente

16,67% e 11,11% em nosso experimento (Tabela VIII), sujeitos à confirmação por métodos mais demorados.

A menor eficiência da IF em nossos estudos, quando comparada aos 76,66% (23/30) de ROSSI & CAPORALE (1968), pode ser explicada pelo fato de terem trabalhado com cortes e não com impressões e com maior número de órgãos por ave. A possibilidade de preparações por corte de tecido serem mais eficientes do que por impressão em demonstrar o antígeno foi evidenciada por CORSTVET & SADLER (1964), quando encontraram impressões negativas e cortes positivos de fígado e baço.

Uma diferença de comportamento de amostras poderia, também, embora pareça-nos pouco provável, explicar esta discordância; a amostra ou amostras estudadas por nós teriam atividades antigênica, fluorescente e infectante diferentes das trabalhadas por eles. Esta hipótese seria corroborada pelo fato de terem isolado o vírus de 100,00% das aves estudadas, a partir de inóculo preparado somente com encéfalo, enquanto nós somente isolamos de 92,59% dos lotes trabalhados com inóculo constituído de fragmentos de vários órgãos e oriundos de várias aves (Tabela VIII).

A observação de CORSTVET & SADLER (1966) de que o vírus cessa de multiplicar no organismo da ave com o aparecimento de anticorpos pode explicar, em parte, a relativa menor eficiência da técnica de anticorpos fluorescentes em nossas mãos, quando comparada aos achados de ROSSI & CAPORALE (1968). Partes dos lotes estudados por nós eram vacinados e os anticorpos da vacinação ou da infecção, poderiam ter diminuído a intensidade da fluorescência nos nove casos que consideramos suspeitos ou mesmo eliminando-a nos seis casos negativos.

Os achados do lote 1599, boa fluorescência e alto título IH discordam de CORSTVET & SADLER (1966) quanto à multiplicação do vírus na presença de anticorpos inibidores da hemaglutinação, mas os dos lotes 1331, 1643 e 1682, fluorescência pálida e escassa na presença de altos títulos IH, confirmam a afirmação dos autores. É possível que o IH não tenha sido, ainda, suficiente para neutralizar o antígeno fluorescente nas aves do lote 1599. Diferença de comportamento antigênico de amostras poderia, também, explicar o fato pois eles já não encontraram fluorescência em aves com títulos inferiores aos relacionados por nós.

O método da IF apresentou, neste trabalho, sensibilidade de 76,00% e especificidade de 75,00% tomando-se como padrão a inoculação seriada - três passagens - em ovos embrionados. Estas taxas foram calculadas conforme THORNER & REMEIN (1961) e classificam a técnica como boa, face à proximidade de seus coeficientes (Tabela IX).

A maior eficiência da inoculação em ovos embrionados observada em nosso experimento após passagens em série, pode ser devida à presença, no inóculo, de partes de órgãos, ricas em vírus, não utilizadas para o preparo de impressões para pesquisa de IF. Não sabemos explicar, entretanto, o fato de um caso com fluorescência positiva e três outros com fluorescência não definida (suspeitos) terem sido negativos à inoculação. Hipótese pouco provável, mas que não pode ser desprezada, é que antígeno fluorescente e infectante ocorram de maneira independente nos tecidos, tendo o antígeno infectante sido neutralizado por anticorpos e o fluorescente permanecido nos tecidos. Esta hipótese, se cabível, tanto se aplicaria aos casos positivos e suspeitos à IF, mas negativos à inoculação e, ainda, também aos totalmente negativos à IF, em número de seis, dos

quais foi isolado o vírus (Tabela VIII).

O baço, ocasionalmente estudado por nós nos casos de doença natural, foi irregularmente fluorescente, confirmando nossos achados experimentais e discordando de EPSTEIN & cols. (1965) que o encontraram sempre negativo.

Nas discrepâncias dos métodos em comparação, a pesquisa de anticorpos inibidores da hemaglutinação (IH) foi utilizada como elemento auxiliar de esclarecimento. Esta pesquisa ofereceu valiosa contribuição naqueles casos de dúvida - um positivo e três suspeitos à IF - nos quais não se isolou o agente da D.N.C. Assim no caso positivo à IF, representado por um galo procedente de criação caipira (lote 1599) com sintomas e lesões bastante sugestivos da doença, com fluorescência na traquéia e partes do intestino, suficiente para o diagnóstico, o vírus não foi isolado, mesmo com passagens seriadas, e a confirmação da D.N.C. foi feita pelo alto título $IH=1.280$ por tratar-se de ave não vacinada.

Em dois outros casos observou-se fluorescência pálida que consideramos insuficiente para diagnóstico e o vírus - apesar dos sintomas da doença - não foi, também, isolado (galinha do lote 1.331 procedente

de criação caipira com título HI = 2.048 e ganso com título HI = 10.240 do lote 1.643). A presença de anticorpos possibilitou esclarecer a dúvida quanto à especificidade do conjugado por tratar-se de aves não vacinadas.

Em outro caso (lote 1.682), duas aves com 14 semanas, procedentes de criação industrial, vacinadas aos 12 dias e revacinadas aos 35, com doença respiratória discreta e sem mortalidade, não foi observado lesões sugestivas; a fluorescência foi pálida e o vírus não foi isolado mesmo com passagens seriadas. Os títulos IH = 2.048, embora sugestivos, tanto poderiam dever-se ao esquema de vacinação como a infecção recente. Não foi isolado outro agente de doença e as aves estudadas não tinham anticorpos aglutinantes de M. gallisepticum. Este foi o único caso em que teria permanecido dúvida quanto à especificidade do conjugado preparado por nós, havendo a possibilidade de tratar-se de reação cruzada com outro agente do complexo das doenças respiratórias das aves.

A capacidade do antígeno reagir com o conjugado é mantida por algum tempo após a preparação das

lâminas. Para EPSTEIN & cols. (1965) seria de 15 dias quando as lâminas são fixadas e conservadas na geladeira; MAESTRONE & COFFIN (1964) assinalaram 30 dias para conservação em geladeira, sem fixação ao passo que à temperatura ambiente, a capacidade de reagir com o conjugado foi mantida por 30 dias quando fixado e, por 10, quando não fixado. Estes achados valorizam a IF como método de diagnóstico, facilitando a remessa de material ao laboratório pois é mais prático enviar lâminas do que aves ou órgãos de aves para exame e é mais cômodo examinar lâminas do que necropsiar aves, preparar inóculo, inocular embriões e estudá-los pelas técnicas de HA-IH.

4. Conjugado para imunofluorescência

4.1. Preparo e titulação do conjugado

A marcação das proteínas totais do soro de galinha imune e sua posterior purificação em coluna de DEAE-celulose facilita o preparo de conjugados fluorescentes, evitando as trabalhosas operações de diálise e concentração recomendados por vários autores. A considerável perda de corante (isotiocianato de fluoresceína) que deve ocorrer, parece plenamente recompensada pela

economia de tempo e mão de obra, principalmente quando se dispõe de poucas condições para o trabalho e de reduzida equipe de funcionários.

Não observamos vantagem nítida no uso do líquido alantóico normal como diluente do conjugado por nós preparado. A ação adsorvente sobre a fluorescência inespecífica, exercida sobre as diluições mais concentradas, desapareceu à medida que se aproximou do título. Pode representar uma segurança a mais quando se deseja trabalhar com conjugado em diluições mais concentradas, o que seguramente aumentará a sensibilidade do conjugado sem prejuízo da especificidade, embora com pouco mais de trabalho.

O uso do líquido alantóico infectado contendo antígeno hemaglutinante específico do vírus da D.N.C. é um recurso simples para controle de especificidade do método, dispensando o uso de pó ou suspensão de tecido ou outros métodos preconizados por vários autores.

4.2. Especificidade do conjugado

Aparente falha de especificidade do conjugado foi observada em esfregaços de 16 fígados de embriões (Tabela IV) que apresentaram fluorescência semelhante

quando tratados pelo conjugado diluído em líquido alantóico normal e infectado. Explicação bastante provável para este fenômeno seria uma afinidade não imunológica do complexo "conjugado-líquido-infectado" para as impressões muito secas; as lâminas secaram durante muito tempo e foram coradas sem umidecimento prévio. A hipótese é corroborada por PURCHASE (1973), quando considera que o conjugado adere com muita avidéz a substância seca, não sendo removido por lavagem e recomenda umidecer o antígeno (lâmina contendo impressão, esfregaço, corte histológico) antes da aplicação do conjugado para evitar coloração inespecífica.

A possibilidade do líquido alantóico infectado ter perdido a capacidade de reagir com o conjugado foi afastada, devido ao fato de a mesma diluição, aplicada à lâmina controle, retirada da geladeira no momento da coloração, apresentar as reações normais previstas; a mesma fração de líquido, usada no dia seguinte com partes de outros embriões, inclusive fígado, funcionou normalmente.

5. Comentário final

Sendo as amostras vacinais demonstradas nas

aves em igualdade de condições com as patogênicas, isto pode ser fator limitante para o uso da IF, como método de diagnóstico nos países que controlam a D.N.C. com vacinas vivas.

A amostra vacinal "B1" foi detectada por vários autores após a vacinação; BEARD & EASTERDAY (1967) a demonstraram a partir de 24 h de exposição a aerossóis; BRUNSTEIN & BANG (1958) por 12 dias; CORSTVET & SADLER (1964) cinco dias e HEUSCHELE & EASTERDAY (1970) por 120 dias enquanto que ROSSI & CAPORALE (1968) demonstraram que as amostras vacinais "F" e "H" permaneceram por 10 dias.

A amostra patogênica "GB" foi também detectada por HEUSCHELE & EASTERDAY (1970) até 120 dias após a infecção artificial.

O mesmo problema ocorre com o uso de ovos embrionados onde freqüentemente temos que recorrer a outras provas para saber se um agente isolado e identificado como vírus da D.N.C. é uma amostra vacinal ou patogênica, tais como índice de patogenicidade pela inoculação intracerebral e velocidade média de morte embrionária.

6. Conclusões

1. Doença experimental

A IF demonstrou a presença da amostra 733/EV-UFMG do vírus da D.N.C. em todos os órgãos estudados: conjuntiva, parte interna do globo ocular, fossa e seio nasais, traquéia, pulmão, saco aéreo, encéfalo, medula óssea, baço, fígado, proventrículo, placa de Payer, papila cecal, cloaca e bolsa de Fabrício.

Em todas as aves, estudadas após 20 horas da inoculação, houve órgãos fluorescentes, mas não houve ave com fluorescência em todos eles.

Todo tipo de órgão foi positivo em alguma ave, não havendo em que tivesse sido positivo em todas elas. O mais frequentemente positivo foi a traquéia com 90,00% de reações fluorescentes.

Os órgãos para as impressões devem ser selecionados, preferencialmente, pela presença de lesões macroscópicas atribuíveis à D.N.C.

Não havendo lesão macroscópica em nenhum ór-

gão, a traquéia, o baço e o fígado devem ser estudados e, o encéfalo quando houver sintomas nervosos.

A técnica de preparo de lâmina por impressão de órgãos, prática e rápida, funcionou bem para a pesquisa de antígeno fluorescente.

O vírus por nós usado - velogênico e viscerotrópico - foi demonstrado pela IF antes do aparecimento dos sintomas e lesões.

2. Patogenicidade para ovos embrionados

Antígeno fluorescente da amostra 733/EV-UFMG do vírus da D.N.C. foi demonstrado na m.c.a., no fígado e encéfalo de embriões três horas após à inoculação, quando hemaglutininas ainda não tinham sido demonstradas no líquido alantóico.

A m.c.a. foi a parte do embrião mais frequentemente fluorescente.

A permanência do embrião na incubadora, após a morte, exerceu influência negativa sobre a eficiência da prova de IF.

A IF aplicada a partes de embriões inoculados com material de campo, pode ser usada como recurso confirmatório ou auxiliar no diagnóstico da D.N.C.

3. Doença natural

A IF deve ser o primeiro método de diagnóstico no caso da D.N.C. natural. Pode confirmar o diagnóstico no primeiro dia do surto, permitindo adoção de rápidas medidas de controle.

A IF pode diagnosticar a doença natural em caso onde não se consegue isolar o vírus.

Os casos negativos pela IF devem ser estudados por outros métodos; somente 72,22% dos lotes de aves com D.N.C. natural estudados deram resultados positivos.

A inoculação em ovos, embora requerendo mais tempo, pela necessidade de passagens seriadas, foi mais eficiente que IF no diagnóstico da D.N.C. natural. A IF falhou em 27,79% (15/54) dos casos enquanto que a inoculação em ovo embrionado somente falhou em 7,41% (4/54).

4. Especificidade do conjugado

É satisfatória a especificidade do conjugado preparado com proteínas totais no soro de galinha.

O teor de umidade das impressões em lâmina interfere na especificidade. Impressões demasiadamente secas, quando tratadas pelo conjugado soro-isotiociana-

to de fluoresceína exibiram fluorescência inespecífica.

A diluição em líquido alantóico contendo vírus foi bom controle para o método de IF, quando usado paralelamente à diluição em líquido normal.

Estudou-se a patogenicidade de uma amostra ve-
logênica e viscerotrópica do vírus da D.N.C. para gali-
nhas infectadas experimentalmente e recomendou-se a
técnica de anticorpos fluorescentes para demonstração
do vírus em tecidos de aves.

A prova de imunofluorescência foi também usa-
da em ovos embrionados inoculados com a mesma amostra e
seu uso foi discutido como recurso no diagnóstico da
doença. Recomendou-se aplicar o conjugado a impressões
de m.c.a. colhidas de embriões vivos, a partir de três
horas da inoculação.

Comparou-se os métodos de imunofluorescência
e inoculação em ovos embrionados no diagnóstico de 54
casos de doença de Newcastle natural. A imunofluores-
cência diagnosticou 72,22% e a inoculação, após três
passagens seriadas, 92,59% dos casos. Com a imunofluo-
rescência e diagnóstico pode ser feito em duas horas
após a recepção das aves, enquanto que a inoculação re-

quereu um mínimo de 48 horas e um máximo de 10 dias.

Utilizou-se conjugado diluído em líquido alantóico normal para controle de fluorescência inespecífica e em líquido contendo vírus para controle do método. Recomendou-se a técnica de impressões de órgãos lesados para preparo das lâminas pela sua simplicidade e rapidez.

8. Bibliografia Consultada

- ABLASHI, D.V., CHANG, P.W. & YATES, V.J., 1965. The effect of a latent CELO virus infection in the chicken embryo, on the propagation of Newcastle disease and influenza virus. Avian Dis., 9:407-417.
- ANÔNIMO, 1969. Curso sobre Raiva. Diagnóstico, produção e controle de vacinas. Organização Panamericana da Saúde e Departamento de Microbiologia e Saúde Pública da Escola de Veterinária da U.F.M.G. Seção de Mecanografia, Escola de Veterinária da U.F.M.G., Belo Horizonte, 50 págs.
- BEARD, C.W. & EASTERDAY, B.C., 1967. The influence of the route of administration of Newcastle disease virus on host response. III. Immunofluorescent and histopathological studies. J. Infect. Dis., 117:66-70.
- BEARD, G.W., SHARMAN, E.C. & OMOHUNDRO, R.E., 1975. The recent outbreak of Newcastle disease in California. Resumo in an 20 World Vet. Cong. Grecia, 2:1011.

- BRAUNE, M.O. & GENTRY, R.F., 1965. Standardization of fluorescent antibody technique for the detection of avian respiratory virus. Avian Dis., 9:535-545.
- BURNSTEIN, T. & BANG, F., 1958. Infection of the upper respiratory tract of the chick with a mild (vaccine) strain of Newcastle disease virus. II. Studies on pathogenesis of the infection. Bull. John's Hopkins, 102:135-157.
- CORSTVET, R.E. & SADLER, W.W., 1964. The diagnosis of certain avian diseases with the fluorescent antibody technique. Poultry Sci., 43:1280-1288.
- CORSTVET, R.E. & SADLER, W.W., 1966. A comparative study of single and multiple respiratory infections in the chicken: single infections (with Mycoplasma gallisepticum and Newcastle disease virus). Amer. J. Vet. Res., 27:1721-1723.
- CUNNINGHAM, C.H., 1956. A Laboratory Guide in Virology. Publishing Company. Minneapolis, U.S.A., 145 págs.
- EPSTEIN, B., ETCHEVERRIGARAY, M.E. & MENEDEZ, N., 1965. Identificación del virus de Newcastle en cultivos de tejidos y en enfermos espontáneos con técnicas de inmunofluorescencia. Rev. Fac. Cien. Vet., La Plata, 17:215-218.

- HANSON, R.P., 1972. Cap. XVIII. Newcastle Disease in Diseases of Poultry. Editado por HOFSTAD & cols. The Iowa State University Press, 6a. ed., Ames.
- HEUSCHELE, W.P. & EASTERDAY, B.C., 1970. Local immunity and persistence of virus in the trachea of chickens following infection with Newcastle disease virus. II. Immunofluorescent and histologic studies. J. Infect. Dis., 121(5):497-504.
- JOHNSON, D.C., COOPER, R.S. & ORSBORN, J.S., 1974. Velogenic viscerotropic Newcastle disease virus isolated from mice. Avian Dis., 18:633-634.
- KARASEK, E. & MULLER, H., 1968. Fluoreszenzserologischen nachweis des Newcastle-disease-virus in zillkulturen und organabdruckpreparaten. Arch. Exptl. Vet. Med., 23:195-200.
- MAESTRONE, G. & COFFIN, D.L., 1964. Study of Newcastle disease by means of fluorescent antibody technique. Amer. J. Vet. Res., 25 (104):217-223.
- PURCHASE, H.G., 1973. Fluorescent antibody techniques in avian research. Avian Dis., 17(1):213-226.
- RAGGI, L.G. & PIGNATELLI, P., 1975. Identification of infectious bronchitis virus by interference with B-1 isolant of Newcastle disease virus waxing and waning

- of interference. Avian Dis., 19:334-342.
- ROSSI, G.A. & CAPORALE, V., 1968. Applicazione della tecniche di immunofluorescenza alla diagnosi della pseudopeste aviare. Atti. Soc. Ital. Sci. Vet., 22: 891-895.
- THORNER, R.M. & REMEIN, B.A., 1961. Principles and procedures in the evolution of screening for disease. Public Health Monograph n° 67. Public Health Service Publication n° 846. United States Government Printing Office, U.S.A., 24 págs.
- WALKER, J.W., HERON, B.R. & MIXSON, M.A., 1973. Exotic Newcastle disease eradication program in the United States. Avian Dis., 17:486-503.
- WILLIAMSON, A.P. & BLATTNER, R.J., 1965. Immunofluorescence of Newcastle disease virus in paraffin embedded tissues of early chick embryos. Proc. Soc. Biol. Med., 118:576-580.
- YATES, V.J., ABLASHI, D.V. & CHAN, P.W., 1968. The effect of latent avian encephalomyelitis virus infection in the chicken embryo on the propagation of Newcastle disease, influenza and infectious bronchitis viruses. Avian Dis., 12:401-411.