

Daniela Duarte de Oliveira

T636.089 69

948e

2004



**ELISA INDIRETO PARA DETECÇÃO DE IgG ANTI-VÍRUS DA DOENÇA DE  
NEWCASTLE EM SORO DE CODORNA**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Medicina Veterinária.

Área: Medicina Veterinária Preventiva

Orientador: Prof. Dr. Nelson R. da Silva Martins

**Belo Horizonte  
UFMG – Escola de Veterinária  
2004**

BIBLIOTECA UNIVERSITÁRIA  
13/09/04  
2189704-02  
ESCOLA DE VETERINÁRIA  
BIBLIOTECA  
DA UFMG

363896

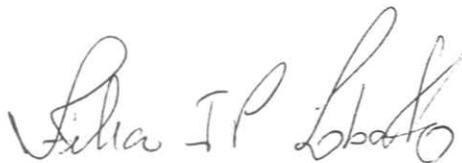
048e Oliveira, Daniela Duarte de, 1979-  
ELISA indireto para detecção de IgG anti-vírus da doença de  
Newcastle em soro de codorna / Daniela Duarte de Oliveira. -2004.  
53 p. : il.

Orientador: Nelson Rodrigo da Silva Martins  
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais,  
Escola de Veterinária  
Bibliografia: p.

1. Codorna japonesa – Teses. 2. Ave doméstica – Doenças – Teses.  
3. Newcastle, Doença de – Teses. 4. Teste imunoenzimático – Teses.  
I. Martins, Nelson Rodrigo da Silva. II. Universidade Federal de Minas  
Gerais. Escola de Veterinária. III. Título.

CDD – 636.508 969 2

Dissertação defendida e aprovada em 03 de maio de 2004, pela Comissão Examinadora constituída por:



---

Profa. Zélia Inês Portela Lobato  
Presidente da Banca Examinadora



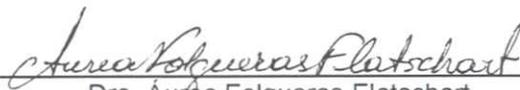
---

Profa. Bernadete Miranda dos Santos



---

Prof. Nelson Carneiro Baião



---

Dra. Áurea Folgueras-Flatschart

## DEDICO

Aos meus pais, que sempre acreditaram em mim e apostaram nos meus sonhos

---

## AGRADECIMENTOS

À Deus

Aos meus pais pelo amor, carinho, incentivo, que idealizaram comigo mais esta conquista e me deram todo o suporte necessário

Aos meus irmãos Patrícia, Ana Paula e Jorge que sempre me apoiaram

Às minhas sobrinhas Alice e Elisa pelo grande carinho

Ao Prof. Nelson R. S. Martins por ter me aceitado como aluna de mestrado desta instituição

Ao Prof. José Sérgio de Resende pela orientação, ensinamentos e pela amizade

Ao Dr. Roberto B. Flatschart pela ajuda em momentos decisivos do experimento e pela amizade

À Dra. Áurea Folgueras-Flatschart, minha verdadeira orientadora

À Tâniamara (LVC) pela grande ajuda no experimento e principalmente pela amizade e torcida

Aos funcionários do laboratório do setor de doenças das aves

Ao Prof. Maurício Resende pela oportunidade de realizar etapas do experimento no Laboratório de Virologia Comparada (LVC)

À Francilane que se tornou uma grande amiga, e passou junto comigo por etapas difíceis do mestrado

À Josiane pela amizade e grande ajuda no experimento

À Nádia pela ajuda nos trabalhos do mestrado

À Gerusa pelo auxiliou na análise estatística

Ao Sr. William Fujikura, Aviário Santo Antônio e prof. Martinho por terem colaborado com o experimento através da doação de codornas

À minha chefe Milca de Almeida pelo incentivo e por ter entendido a minha ausência por alguns períodos na granja

Aos professores do curso de pós-graduação pelos ensinamentos

A todos os meus amigos e colegas de mestrado que torceram e acreditaram em mim

## SUMÁRIO

	<b>LISTA DE ABREVIATURAS .....</b>	<b>10</b>
	<b>RESUMO.....</b>	<b>11</b>
	<b>ABSTRACT .....</b>	<b>11</b>
1.	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>13</b>
2.	<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>14</b>
2.1.	OBJETIVO GERAL.....	14
2.2.	OBJETIVO ESPECÍFICO .....	14
3.	<b>REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>14</b>
3.1.	DOENÇA DE NEWCASTLE.....	14
3.1.1.	Etiologia .....	14
3.1.2.	Doença de Newcastle.....	16
3.1.3.	A doença no Brasil.....	16
3.1.4.	Diagnóstico.....	17
3.2.	INIBIÇÃO DA HEMAGLUTINAÇÃO (IH) .....	17
3.3.	ELISA – ENZYME LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY .....	18
3.4.	ELETROFORESE – SISTEMA PAGE.....	18
3.5.	<i>WESTERN BLOT</i> .....	19
3.6.	IMUNOGLOBULINAS DE CODORNAS (IgG E IgY).....	19
4.	<b>MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>19</b>
4.1.	LOCAL DE REALIZAÇÃO DOS EXPERIMENTOS.....	19
4.2.	ANIMAIS UTILIZADOS NO EXPERIMENTO .....	19
4.3.	PURIFICAÇÃO DE IMUNOGLOBULINA G E Y DE CODORNA .....	20
4.3.1.	Purificação de IgG do soro de codornas .....	20
4.3.2.	Purificação de IgY da gema de ovos de codorna.....	20
4.4.	DOSAGEM DE PROTEÍNA.....	21
4.5.	ELETROFORESE .....	21
4.5.1.	Preparo das amostras .....	21
4.5.2.	Coloração dos géis SDS-PAGE por <i>Coomassie blue</i> .....	21
4.6.	<i>WESTERN BLOT</i> .....	21
4.6.1.	<i>Western blot</i> para confirmação de identidade da IgG purificada do soro e da gema de ovos de codorna.....	21
4.6.2.	<i>Western blot</i> para avaliação da produção de IgG de camundongos anti-IgG de codorna.....	22
4.7.	PRODUÇÃO DE ANTICORPOS ANTI-IgG DE CODORNAS EM CAMUNDONGOS .....	22
4.7.1.	Imunização dos camundongos.....	22
4.7.2.	Coleta de sangue de camundongo para avaliação da reatividade de anticorpos anti-IgG de codorna .....	22
4.7.3.	Sangria dos camundongos.....	23
4.8.	TITULAÇÃO DA VACINA CONTRA A DOENÇA DE NEWCASTLE .....	23
4.8.1.	Preparo da suspensão de hemácias de galinha .....	23
4.8.2.	Teste de hemaglutinação (HA) rápida.....	23
4.9.	COLETA DE SOROS DE CODORNAS NEGATIVOS E HIPERIMUNES PARA O VDN.....	23
4.9.1.	Coleta de soros negativos .....	23
4.9.2.	Imunização de codornas com VDN, produção e coleta de soros hiperimunes....	23

4.10.	CULTIVO, CONCENTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DO VDN .....	24
4.11.	ESTABELECIMENTO DA INIBIÇÃO DA HEMAGLUTINAÇÃO (IH) COMO TÉCNICA DE REFERÊNCIA.....	24
4.11.1.	Hemaglutinação (HA) para titulação do antígeno viral .....	24
4.11.2.	Inibição da Hemaglutinação para titulação de soros.....	25
4.12.	DESENVOLVIMENTO E PADRONIZAÇÃO DOS ELISAS (ENZYME LINKED IMMUNOSSORBENT ASSAYS).....	25
4.12.1.	ELISA de captura para a detecção de anti-IgG de codornas nos soros de camundongos hiperimunes .....	25
4.12.2.	ELISA indireto para a detecção de IgG de codorna contra o VDN utilizando anticorpo secundário anti-espécie (anti-IgG de codornas).....	26
4.12.3.	ELISA indireto para a detecção de IgG de codorna contra o VDN utilizando conjugado heterólogo .....	27
4.13.	ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	28
5.	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	28
5.1.	PURIFICAÇÃO DE IMUNOGLOBULINAS .....	28
5.2.	IMUNIZAÇÃO DOS CAMUNDONGOS .....	31
5.3.	INIBIÇÃO DA HEMAGLUTINAÇÃO – IH COMO TÉCNICA DE REFERÊNCIA .....	32
5.4.	ELISA.....	33
5.4.1.	ELISA indireto para a detecção de IgG de codorna contra o VDN .....	34
5.4.2.	ELISA indireto para a detecção de IgG de codorna contra o VDN com conjugado anti-IgG de galinha.....	36
6.	<b>CONCLUSÕES</b> .....	45
7.	<b>BIBLIOGRAFIA</b> .....	46
8.	<b>APÊNDICES</b> .....	51

#### LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Média das leituras em absorbância por ELISA dos soros de camundongos imunizados com IgG purificada de soro de codorna por precipitação com sulfato de amônio $[\text{NH}_4(\text{SO}_4)_2]$ e eletroforese preparativa (PAGE) .....	31
Tabela 2.	Médias geométricas dos títulos (GMT) obtidos por IH nos soros de codornas positivos contra o VDN e soros negativos .....	33
Tabela 3.	Concentrações ótimas determinadas para os reagentes utilizados no ELISA indireto para detecção de IgG de codorna e no ELISA indireto para detecção de IgG de codorna com conjugado anti-galinha, contra o vírus da doença de Newcastle.....	33
Tabela 4	Classificação dos soros de codorna como positivos e negativos quanto à reatividade contra o vírus da doença de Newcastle (VDN) pelo método padrão (IH) e pelos ELISAs padronizados para detecção de IgG de codorna anti-VDN .....	38
Tabela 5.	Resultados dos soros de codorna positivos e negativos encontrados no ELISA indireto para detecção de IgG de codorna e no ELISA indireto para detecção de IgG de codorna com conjugado anti-galinha, contra o vírus da doença de Newcastle dados em absorbância e IH, dados em GMT .....	38

#### LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Ilustração esquemática das proteínas estruturais e não estruturais do vírus da doença de Newcastle.....	15
Figura 2.	Ilustração esquemática de ELISA de captura para avaliação da resposta imune dos camundongos imunizados contra IgG de codorna .....	26
Figura 3.	Representação das etapas de montagem do "ELISA indireto para codorna" desenvolvido para detecção de IgG anti-VDN no soro de codornas.....	27

Figura 4.	Etapas do "ELISA indireto para galinha" desenvolvido para detecção de IgG de codorna anti-VDN no soro de codornas.....	27
Figura 5.	Membrana de <i>western blot</i> corada com Ponceau S como teste confirmatório da transferência do material do gel de poliacrilamida [IgGs purificadas de codorna a partir de soro de codorna e gema de ovos de codorna, e IgG de galinha comercial (Sigma)] para a membrana de nitrocelulose.....	29
Figura 6.	Gel de poliacrilamida corado com <i>Coomassie blue</i> contendo amostras de IgG purificadas do soro de codorna e da gema de ovos de codorna, mostrando separação das cadeias leve e pesada .....	29
Figura 7.	Gel de poliacrilamida preparativo apresentando as bandas das cadeias leve e pesada de IgG purificada do soro de codornas, corado com <i>Coomassie blue</i> .....	30
Figura 8.	Membrana de <i>western blot</i> com amostras de IgG do soro e da gema de ovos de codornas e IgG de galinha (Sigma), revelada com IgG de cabra anti-IgG de galinha e corada com NBT e BCIP .....	30
Figura 9.	Membrana de <i>western blot</i> contendo IgG purificada do soro de codorna, IgG de galinha (Sigma) e IgG purificada da gema de ovos de codorna, incubada com IgG de camundongo anti-IgG de codorna e corada com NBT e BCIP para confirmar a resposta da imunização dos camundongos com IgG purificada do soro de codornas.....	32

**LISTA DE GRÁFICOS**

Gráfico 1.	Valores em absorbância das médias das leituras dos soros positivos (+) e negativos (-) para cada uma das diluições dos soros, concentrado viral e anticorpo secundário testados na titulação em bloco do ELISA indireto para detecção de IgG de codorna contra o vírus da doença de Newcastle.....	35
Gráfico 2.	Valores de absorbância das diferenças das leituras entre soros positivos e negativos de mesma diluição em cada diluição do concentrado viral e anticorpo secundário testados na titulação em bloco do ELISA indireto para detecção de IgG de codorna contra o vírus da doença de Newcastle.....	36
Gráfico 3.	Valores médios das absorbâncias dos soros positivos (+) e negativos (-) de codorna para cada diluição dos soros, concentrado viral e conjugado testados na titulação em bloco do ELISA indireto para detecção de IgG de codorna contra o vírus da doença de Newcastle utilizando conjugado anti-IgG de galinha .....	37
Gráfico 4.	Valores das diferenças entre as médias das leituras dos soros de codorna positivos e negativos em cada diluição dos soros, concentrado viral e conjugado testados na titulação em bloco do ELISA indireto para detecção de IgG de codorna contra o vírus da doença de Newcastle utilizando conjugado anti-IgG de galinha .....	36
Gráfico 5.	Padronização do ponto de corte do ELISA indireto para detecção de IgG de codorna contra o vírus da doença de Newcastle a partir da análise dos dados de sensibilidade e especificidade pela planilha TG-ROC.....	40
Gráfico 6.	Avaliação do ponto de corte quanto a eficiência do teste e índice de Youden obtidos pela planilha TG-ROG aplicada ao ELISA indireto para detecção de IgG de codorna contra o vírus da doença de Newcastle.....	41
Gráfico 7.	Correlação entre os dados obtidos de sensibilidade e especificidade e esperados do ELISA indireto para detecção de IgG de codorna contra o vírus da doença de Newcastle, estabelecidos pela planilha TG-ROC.....	41
Gráfico 8.	Gráfico comparativo da dispersão dos dados obtidos pelo ELISA indireto para detecção de IgG de codorna contra o vírus da doença de Newcastle e esperados de sensibilidade estabelecidos pela planilha TG-ROC .....	42

Gráfico 9.	Gráfico comparativo da dispersão dos dados obtidos pelo ELISA indireto para detecção de IgG de codorna contra o vírus da doença de Newcastle e esperados de especificidade estabelecidos pela planilha TG-ROC .....	42
Gráfico 10.	Padronização do ponto de corte do ELISA indireto para detecção de IgG de codorna contra o vírus da doença de Newcastle utilizando conjugado anti-IgG de galinha a partir da análise dos dados de sensibilidade e especificidade pela planilha TG-ROC .....	43
Gráfico 11.	Avaliação do ponto de corte quanto à eficiência do teste e índice de Youden obtidos através da planilha TG-ROC para o ELISA indireto para detecção de IgG de codorna contra o vírus da doença de Newcastle utilizando conjugado anti-IgG de galinha .....	43
Gráfico 12.	Correlação entre os dados obtidos pelo ELISA indireto para detecção de IgG de codorna contra o vírus da doença de Newcastle utilizando conjugado anti-IgG de galinha de sensibilidade e especificidade e esperados estabelecidos pela planilha TG-ROC .....	44
Gráfico 13.	Gráfico comparativo da dispersão dos dados obtidos pelo ELISA indireto para detecção de IgG de codorna contra o vírus da doença de Newcastle utilizando conjugado anti-IgG de galinha e esperados de sensibilidade estabelecidos pela planilha TG-ROC .....	44
Gráfico 14.	Gráfico comparativo da dispersão dos dados obtidos pelo ELISA indireto para detecção de IgG de codorna contra o vírus da doença de Newcastle utilizando conjugado anti-IgG de galinha e esperados de especificidade estabelecidos pela planilha TG-ROC .....	45

## LISTA DE ABREVIATURAS

%T	% total de acrilamida
p-NPP	p-nitrofenil fosfato
CV/VDN	concentrado viral de vírus da doença de Newcastle
DN	Doença de Newcastle
DO	Densidade Óptica
ELISA	<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>
GMT	Média Geométrica de Título
HA	Hemaglutinação
HN	Hemaglutinina-Neuraminidase
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
IgY	Imunoglobulina Y
IC	Intra-cardíaca
IH	Inibição da Hemaglutinação
IM	Intramuscular
KDa	Kilo Dalton
LA	Líquido Alantóide
OEG	Ovos Embrionados de Galinha
PAGE	Polyacrylamide Gel Electrophoresis
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate (sulfato de sódio dodecil)
Se	Sensibilidade
Sp	Especificidade
SPF	Specific Pathogen Free (Livre de patógenos especificados)
TA	Temperatura Ambiente
TFN	Taxa de Falso Negativo
TFP	Taxa de Falso Positivo
TG-ROC	Two-Graph Receiver Operating Characteristic
UHA	Unidades Hemaglutinantes
VDN	Vírus da Doença de Newcastle
VO	Via Ocular

## RESUMO

Foram desenvolvidos e comparados dois ELISAs para detecção de IgG de codorna (*Coturnix coturnix japonica*) contra o vírus da doença de Newcastle (VDN). Um deles utilizando anticorpo secundário de camundongo anti-IgG de codorna e o outro, conjugado anti-IgG de galinha. Para a produção de anticorpo secundário (IgG de camundongo anti-IgG de codorna), métodos de purificação de IgG de codorna foram avaliados utilizando 30 amostras de soros e de gemas de ovos de codornas, confirmados posteriormente por eletroforese. Apenas a IgG purificada de soro, por sua maior pureza, foi inoculada nos camundongos, em emulsão oleosa contendo 50µg de proteína/dose, para produção do anticorpo secundário. Trinta soros de codorna positivos contra o vírus da doença de Newcastle e 30 soros negativos, triados previamente pelo teste de inibição da hemaglutinação (IH) foram utilizados na titulação em bloco dos ELISAs. O VDN, soro positivo anti-VDN e negativo, anticorpo secundário e conjugados (IgG cabra anti-IgG de camundongo e IgG de coelho anti-IgG de galinha conjugados com fosfatase alcalina) foram submetidos a diluições seriadas para padronizar o ELISA indireto para detecção de IgG de codorna contra VDN e o ELISA indireto para detecção de IgG de codorna contra VDN utilizando conjugado anti-galinha. Os valores de absorbância obtidos pelos ELISAs foram submetidos a planilha TG-ROC e calculados os pontos de corte de cada um. Na análise dos dados, observou-se total correlação entre os testes de ELISA e IH, usada como técnica de referência. Os dois ELISAs foram eficientes na identificação de soros positivos e negativos, apresentando valores máximos de sensibilidade e especificidade (igual a um, 100%), sem resultados falso-positivos e falso-negativos. Estes resultados indicam o uso do ELISA indireto para a doença de Newcastle como técnica de triagem de soros de codorna na rotina laboratorial.

Palavras-chave: codorna, *Coturnix coturnix japonica*, ELISA, IH, IgG de codorna, doença de Newcastle.

## ABSTRACT

Two indirect ELISA's, one containing secondary antibody against quail IgG and the other one conjugated anti-chicken IgG, were developed and compared for the detection of quail (*Coturnix coturnix japonica*) IgG specific to Newcastle disease virus (NDV). For the production of secondary antibody (mice IgG anti-quail IgG), purification methods of quail IgG were evaluated using 30 quail serum and egg yolk samples confirmed by electrophoresis. Only IgG purified from serum due to its higher purity were inoculated into mice in oil emulsion containing 50µg protein/dose for the production of secondary antibody. Thirty positive quail serum against NDV and 30 negative serum previously tested by the haemagglutination inhibition test (HI) were used in the block standardization of ELISA. The NDV, positive and negative serum, secondary antibody and conjugates (goat anti-mouse IgG and rabbit anti-chicken IgG conjugated with alkaline phosphatase) were diluted serially to standardize the indirect ELISA to detect quail IgG against NDV and indirect ELISA to detect quail IgG against NDV using anti-chicken conjugated. The absorbance values from both ELISA were evaluated in a TG-ROC spreadsheet and the cut-off points were determined to each ELISA. Based on the results it was observed a total correlation between ELISA and IH test, used as a gold test. Both ELISA were efficient on positive and negative serum identification, presenting highest values of sensibility and specificity (100%) without false-positive and false-negative results. These results indicate the use of indirect ELISA to Newcastle disease as an excellent test to detect antibody in quail serum and your use in a laboratory routine.

Keywords: Quail, *Coturnix coturnix japonica*, ELISA, HI, quail IgG, Newcastle disease.

## 1. INTRODUÇÃO

A criação comercial de codorna japonesa teve início no século XI no Japão, China e Coréia. A partir de 1910, após muitos cruzamentos e estudos realizados por japoneses e chineses, foi selecionada uma variedade domesticada, a *Coturnix coturnix japonica*, que apresentou uma alta fertilidade, abundante postura de ovos, rápido desenvolvimento (quando comparado com outras aves), exigência de pouco espaço para seu confinamento e fácil transporte (Mills et al., 1997).

A codorna é uma ave classificada na ordem dos Galliformes, família Phasianidae, gênero *Coturnix*. Existe uma grande variedade de espécies, sendo a *Coturnix coturnix japonica* (codorna japonesa ou codorna doméstica) uma das mais utilizadas com finalidade comercial (Barral, 1994; Mills et al., 1997).

A coturnicultura vem apresentando um desenvolvimento significativo desde a década de 50, quando as codornas japonesas chegaram ao Brasil trazidas por imigrantes japoneses e italianos. Segundo dados estatísticos, o plantel brasileiro conta com cerca de 6 milhões de codornas (IBGE, 2001; Fujikura, 2002; Oliveira, 2002). Apesar da evolução na produção e no consumo de ovos de codornas, os coturnicultores brasileiros enfrentam problemas de manejo, nutrição e sanidade que, juntos, causam grandes perdas de produtividade. As informações sobre produção e sanidade, bem como pesquisas científicas, ainda são escassas, mesmo em países como Índia, Japão e Coréia, que exploram a atividade há mais tempo e possuem grandes plantéis de codornas (Oliveira, 2002).

No Brasil, são poucas as informações e pesquisas sobre a epidemiologia das doenças que afetam as codornas. Os problemas que ocorrem no campo muitas vezes não são devidamente definidos. É feito um diagnóstico presuntivo, com a finalidade de solucionar o quadro clínico apresentado naquele momento, permanecendo desta forma desconhecidos os eventuais microrganismos envolvidos nos

surtos. Outra situação relativamente freqüente na avicultura industrial são as falhas de medidas de biossegurança, como a proximidade entre galpões de galinhas e de codornas, muitas vezes de idades e procedências múltiplas, situação esta, que pode estar reciclando vários patógenos como, por exemplo, o vírus da doença de Newcastle (VDN).

Com o crescimento do número de criações comerciais de codornas, é presumível que haja um aumento no número de eventuais aves portadoras de agentes infecto-contagiosos. Desta forma, o risco de ocorrência da doença nas regiões de maior concentração de aves (codornas de postura ou de corte, poedeiras, frangos, aves ornamentais), torna-se preocupação adicional para o avicultor (Jeurissen e Janse, 1998).

Dados de literatura confirmam a susceptibilidade das codornas a doenças como a bronquite infecciosa das codornas causada por adenovírus tipo I (Chew-Lim, 1979; Jack et al., 1994; Jeurissen e Janse, 1998; Martins et al., 2000; Reed e Jack, 2003), micoplasmose, doença de Marek, encefalomielite, doença de Newcastle (Alexander, 1997), influenza aviária (Easterday et al., 1997), síndrome da queda de postura (EDS), salmoneloses (Das e Pradham, 1992; Shivaprasad, 1997) entre outras, que são importantes por causarem danos nos sistemas respiratório, nervoso e reprodutivo. Apesar da preconizada refratariedade da codorna à infecção pelo vírus da doença de Gumboro, sua detecção sorológica está descrita na literatura (Weisman e Hitchner, 1978; Lukert e Saif, 1997).

Entre as doenças que repercutem negativamente no mercado de produtos avícolas, a doença de Newcastle (DN) aparece entre as mais importantes. É uma doença infecciosa causada pelo *Paramyxovirus* tipo 1, de distribuição mundial (Alexander, 1990; Barral, 1994; Velan et al., 1995; Alexander, 1997; Paulillo e Doretto Junior, 2000), fazendo parte da lista A do código zoosanitário internacional do Escritório Internacional de Epizootias –

OIE, de notificação obrigatória (Paulillo e Doretto Junior, 2000; OIE, 2002). Por ser uma doença que gera um impacto negativo na economia, torna-se necessário o seu estudo em criações de codornas. As codornas são susceptíveis à infecção pelo VDN, podendo não manifestar os sinais típicos observados em galinhas, porém, podem se comportar como "portadoras assintomáticas", causando grandes prejuízos para a avicultura industrial (López, 1976; Paulillo e Doretto Junior, 2000; Gama, 2002;). O diagnóstico presuntivo pode ser feito através do levantamento dos sinais clínicos e lesões, mas a confirmação depende de análise laboratorial. A sorologia é o recurso de diagnóstico laboratorial mais amplamente utilizado, sendo que, para se comprovar a infecção, vacinal ou não pelo VDN, a técnica de IH é o teste de eleição. O ELISA também é utilizado, mas em menor escala, já que o seu custo é superior ao do IH. Para o diagnóstico, entretanto, são necessários o isolamento e caracterização viral em ovos embrionados de galinhas SPF (OEG/SPF) a partir de órgãos com lesões sugestivas (Reynolds e Maraga, 1999; Gama, 2002).

Os diagnósticos sorológicos feitos em codornas, normalmente seguem os mesmos procedimentos técnicos daqueles realizados para galinhas, pois ainda não há um ELISA específico para codornas. Segundo Losonczy et al. (1999), as imunoglobulinas G das galinhas e codornas se assemelham, o que possibilitaria seu uso em um ELISA único.

No Brasil ainda não está estabelecido um programa de vacinação para codornas. Porém, quando se refere à DN, Kumanan et al. (1990) verificaram a eficiência do programa de vacinação usado por criadores de codornas da Índia, indicando vacinações as 4 e 8 semanas com a estirpe LaSota.

Um grande número de reagentes e técnicas têm sido desenvolvidos para diagnóstico sorológico da DN em galinhas nas últimas duas décadas; em contrapartida, não existe diagnóstico destinado especificamente para sorologia de codornas, como por exemplo o ELISA.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. OBJETIVO GERAL

Este trabalho teve como objetivo padronizar um ELISA indireto para detecção de IgGs de codorna para o VDN e compará-lo com resultados obtidos com o método padrão - inibição da hemaglutinação (IH).

### 2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Os objetivos específicos deste estudo são:

1. Purificar imunoglobulina G (IgG) de codorna.
2. Produzir anticorpos de camundongos específicos contra a IgG de codorna.
3. Desenvolver um ELISA indireto utilizando anticorpos policlonais de camundongo anti-IgG de codorna.
4. Desenvolver um ELISA indireto para detecção de IgG de codorna utilizando conjugado anti-galinha
5. Avaliar o desempenho deste ELISA indireto frente aos resultados de IH dos soros de codornas vacinadas e não vacinadas contra VDN.
6. Avaliação da eficiência de detecção dos anticorpos de codorna contra o vírus da doença de Newcastle em ELISA indireto, usando anticorpo anti-IgG de codorna e conjugado anti-galinha.

## 3. REVISÃO DE LITERATURA

### 3.1. DOENÇA DE NEWCASTLE

#### 3.1.1. Etiologia

A doença de Newcastle (DN) é uma doença infecciosa causada por um vírus da família Paramixoviridae, subfamília Paramyxovirinae, gênero *Avulavirus*, *Paramyxovirus* tipo 1 (PMV-1). É um vírus de genoma RNA, envelopado, com propriedades enteropneumotrópicas e neurotrópicas (Waterson, 1964; Alexander, 1990; Barral, 1994).

Os *Paramyxovirus* são constituídos de RNA de fita simples, de peso molecular de cerca

de  $5 \times 10^6$  daltons e sua seqüência genômica contem cerca de 15.186 nucleotídeos. Seu genoma codifica proteínas importantes para sua estrutura (Figura 1) como a proteína L, que é o RNA direto associado com o nucleocapsídeo; as projeções maiores são as glicoproteínas, HN (hemaglutinina - neuraminidase) que são responsáveis pelas atividades de hemaglutinação e neuraminidase, formando duas projeções na sua superfície; F, proteína de fusão, que apesar de ser uma das menores projeções da superfície viral, está associada à habilidade do envelope viral fundir-se às membranas celulares do hospedeiro para infecção; NP, proteína do nucleocapsídeo; P, proteína fosforilada e M, matriz (Paulillo e Doretto Junior, 2000; Alexander, 2003). A hemaglutinação talvez seja a função mais importante e estudada deste vírus, por ser também uma importante ferramenta no diagnóstico. A HN intermedia a adsorção do

vírião à célula e também é a responsável pela aglutinação das hemácias das aves (Alexander, 2003).

As estirpes do VDN são classificadas de acordo com a sua virulência em cinco patotipos: entéricos assintomáticos, que normalmente causam infecção entérica subclínica; lentogênicos, que desencadeiam infecções respiratórias brandas ou subclínicas e normalmente são usados como vacinas; mesogênicos, que causam sinais respiratórios, mortalidade de até 50% e ocasionalmente sintomatologia nervosa; velogênicos neurotrópicos, que causam alta mortalidade, sendo observados sinais nervosos e respiratórios; velogênicos viscerotrópicos, que são altamente patogênicos, culminando em altos índices de mortalidade com lesões intestinais e respiratórias hemorrágicas (Alexander, 1997; Paulillo e Doretto Junior, 2000; Alexander, 2003).

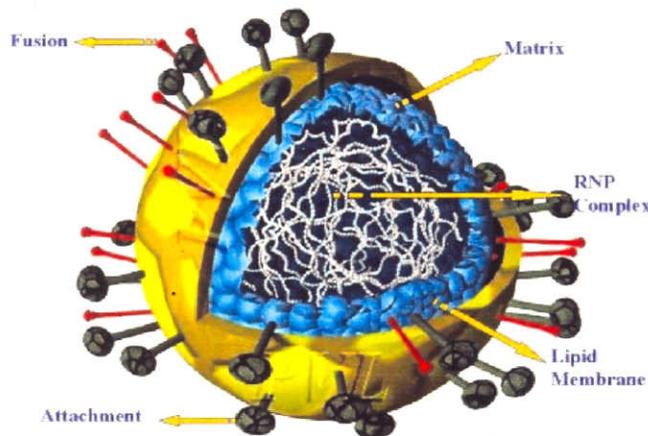


Figura 1. Ilustração esquemática das proteínas estruturais e não estruturais do vírus da doença de Newcastle.

### 3.1.2. Doença de Newcastle

A DN é considerada um dos problemas mais preocupantes na indústria avícola mundial, em virtude dos elevados prejuízos que ocasionou e ainda ocasiona desde a sua descrição na década de 20 em galinhas na Inglaterra (Alexander, 1997). Tem sido comprovado a sua presença em 27 das 50 ordens de aves existentes, principalmente aves silvestres criadas em cativeiro inclusive codornas. (López, 1976; Alexander, 1997; Lima, 2001).

A transmissão da DN é principalmente horizontal, normalmente através de secreções do trato gastro-intestinal (fezes) e do trato respiratório. Em um surto, os fatores mais importantes para a disseminação da doença são a movimentação de aves, pessoas e equipamentos. Esta disseminação também pode ocorrer via água de bebida, alimento contaminado, cama, ou até mesmo, através de vacinas contaminadas ou com inativação incompleta (Lúcio, 1976a; Alexander, 2003).

Vários fatores influenciam o aparecimento dos sinais clínicos e o período de incubação pode variar de 2 a 15 dias. Entre eles está a estirpe do vírus, a idade das aves; o nível de desafio de campo, a exposição ao vírus (via de entrada) e o *status* imunológico da ave. De acordo com o patótipo, a morbidade pode chegar a 100%, enquanto a mortalidade pode ser considerada baixa quando atinge aves adultas previamente imunes. Entretanto, a mortalidade pode alcançar 50% em aves adultas e até 90% em pintinhos. Não é possível destacar uma lesão patognomônica para a DN. O vírus de baixa patogenicidade (estirpes lentogênicas) produz infecção clinicamente inaparente, com lesões mínimas ou inexistentes, enquanto outros patótipos podem produzir sinais clínicos variados da doença, com lesões sistêmicas (Alexander, 1997; Paulillo e Doretto Junior, 2000).

Galinhas infectadas com estirpes patogênicas (mesogênicas e velogênicas) apresentam um quadro respiratório acentuado com respiração acelerada, prostração e morte, além de diarreia com coloração esverdeada, tremores

musculares, torcicolo, paralisia das pernas, asas e opistótono. Quando atinge aves em postura, há queda acentuada na produção de ovos, além de prejuízos na qualidade da casca destes ovos. Quando há envolvimento de estirpes neurotrópicas, a sintomatologia nervosa é facilmente identificada (Alexander, 1997; Paulillo e Doretto Junior, 2000). À necrópsia, pode-se observar traqueíte, sinusite, hemorragia no trato gastro-intestinal com focos de necrose e úlceras; nas tonsilas cecais pode-se encontrar hemorragia e edema. Normalmente encontram-se infecções secundárias por *Mycoplasma gallisepticum*, *Escherichia coli* e outras bactérias que agravam o prognóstico para as aves (Alexander, 1997).

As codornas japonesas são susceptíveis à infecção pelo VDN, mas podem não manifestar os sinais típicos observados em galinhas (edema ao redor dos olhos, anorexia, depressão, respiração acelerada, descarga nasal e ocular, estertor, rinite, convulsões, tremores, queda de postura, entre outros) disseminando o vírus para outras aves mais susceptíveis (Paulillo e Doretto Junior, 2000; Gama, 2002). Lima (2001) realizou um trabalho explorando a importância epidemiológica da codorna japonesa frente à DN, concluindo que a codorna é de fundamental importância como portador e disseminador do VDN. Islam et al. (1994) verificaram que mesmo as codornas japonesas sendo menos susceptíveis à infecção pelo VDN, podem se infectar e apresentar a doença clínica sob condições de *stress*, sendo importantes transmissores assintomáticos da doença. Quando VDN isolados de codornas japonesas foram submetidos a passagens intracerebrais em galinhas SPF (*Specific Pathogen Free* – Livres de Patógenos Especificados) de várias idades, estes se revelaram letais, demonstrando propriedades velogênicas.

### 3.1.3. A doença no Brasil

O primeiro surto da DN no Brasil em galinhas, ocorreu em 1953 em Belém (Levine, 1964). Após o primeiro impacto na década de 50, a DN foi observada

esporadicamente e os focos foram controlados rapidamente através de vacinação e medidas profiláticas (Paulillo e Doretto Junior, 2000). Com a implantação do Plano Nacional de Sanidade Avícola em 1994 pelo Ministério da Agricultura, o controle e a vigilância da doença ficaram mais rígidos. Segundo a OIE (2002), não há notificação da ocorrência da DN na avicultura industrial (galinhas) há mais de cinco anos, nos principais estados produtores avícolas localizados nas regiões Sul e Sudeste do Brasil. A ausência da DN no Brasil nos últimos anos foi confirmada através da coleta de sangue, secreções traqueais e cloacais em abatedouros de frango de corte, que foram enviados para o laboratório (LARA-Campinas) para que fossem feitos exames sorológicos, isolamento e tipificação viral. Em primeiro de setembro de 2003, nove estados brasileiros foram declarados como áreas livres da DN pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Os estados declarados livres desta enfermidade foram: Distrito Federal, Goiás, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Paraná, Rio Grande do Sul, Santa Catarina e São Paulo. Atualmente, esses estados respondem por 80% da produção nacional e da exportação brasileira de frango. Nestas regiões também é encontrada quase a totalidade do plantel brasileiro de codornas (Fujikura, 2002), justificando a importância da vigilância e controle de doenças nestas aves, principalmente da DN, mesmo sem relatos da ocorrência de surtos.

#### 3.1.4. Diagnóstico

O diagnóstico presuntivo pode ser feito por sorologia, associado à observação dos sinais clínicos e de lesões à necropsia. Porém, para um diagnóstico definitivo é necessário o isolamento do VDN em ovos embrionados de aves SPF e posterior caracterização (Paulillo e Doretto Junior, 2000).

A sorologia é uma ferramenta importante tanto no diagnóstico da enfermidade quanto no monitoramento pós-vacinal para avaliar a eficiência da vacinação (Alexander, 1997; Rosales, 1999; Paulillo e Doretto Junior,

2000; Alexander, 2003). Os testes sorológicos baseiam-se na reação de amostras de soro com antígenos específicos, sendo detectada e avaliada a capacidade de se formar complexos antígeno - anticorpo. A resposta imune humoral é mediada por anticorpos, sendo as imunoglobulinas IgM produzidas no início da resposta, seguida de elevação dos níveis de imunoglobulinas IgG.

Alguns testes sorológicos apresentam apenas resultados qualitativos - positivo ou negativo (ex.: precipitação em gel de ágar), enquanto outros apresentam resultados quantitativos - títulos de anticorpos (ex.: inibição da hemaglutinação, ELISA) (Rosales, 1999). Entre os testes sorológicos mais usados para a DN, estão a inibição da hemaglutinação (IH) e ELISA (Alexander, 1997; Paulillo e Doretto Junior, 2000). Alexander (1997) comenta que apesar de existir uma correlação entre os testes de ELISA e IH, convencionalmente os anticorpos contra o VDN têm sido detectados e quantificados pelo teste de IH, considerado teste de referência.

#### 3.2. INIBIÇÃO DA HEMAGLUTINAÇÃO (IH)

Alguns vírus e bactérias possuem em sua superfície estruturas capazes de se combinar com receptores específicos presentes em hemácias de determinadas espécies e produzir hemaglutinação (HA). Entre os agentes mais comuns em avicultura que possuem esta propriedade, estão os vírus da doença de Newcastle e da influenza aviária, e a bactéria *Haemophilus paragallinarum* (Beard, 1980; Santos e Silva, 2000).

Enquanto a reação de hemaglutinação revela uma atividade biológica do agente infeccioso, a reação de IH resulta da inibição da HA, que pode ser empregada como método para identificação de um agente específico ou para medir os níveis de anticorpos séricos. É uma prova sorológica quantitativa, que objetiva titular principalmente as imunoglobulinas da classe IgG (Galván, 1976; Santos e Silva, 2000). O IH é o teste sorológico mais frequentemente usado para diagnóstico e detecção de resposta imunológica para a DN em aves

por ser um teste altamente específico (Miers et al., 1994; Czifra et al., 1996). Os componentes básicos para o teste de IH são o antígeno hemaglutinante, o soro em diluições seriadas duplas e a suspensão de hemácias. Variações no ensaio, como a "técnica *Beta*", realizada com diluições seriadas do soro misturadas com concentrações fixas e constantes de antígeno são mais comumente utilizadas do que a "técnica *Alfa*", que utiliza diluição constante do soro e antígeno diluído (Beard, 1980).

### 3.3. ELISA – ENZYME LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY

O ELISA é um método sorológico descrito pela primeira vez por Engvall e Perlman em 1972 para detecção de anticorpos no soro (Souza, 1999; Souza, 2000). É um procedimento que tem sido usado rotineiramente em avicultura para detecção de anticorpos (principalmente IgG e IgM) e antígenos em populações avícolas. Além de ser rápido e sensível, este método detecta quantidades mínimas de anticorpos. O tipo mais utilizado em laboratórios de diagnóstico avícola é o ELISA indireto para detecção de anticorpos (Santos e Silva, 2000). Os anticorpos são detectados em uma micropilaca sensibilizada com antígenos.

O ELISA se baseia no uso de antígenos e anticorpos que ligados a um conjugado possuem atividade imunológica e enzimática (Santos e Silva, 2000). Com a adição de um substrato cromogênico específico após a adição do conjugado, ocorre a revelação em forma de cor. O produto cromogênico formado pode ser visualizado e/ou mensurado através de um fotolorímetro provido de filtro de luz adequado ou de espectrofotômetro (Santos e Silva, 2000).

Através do ELISA é possível determinar o perfil sorológico de populações avícolas, fazer o monitoramento dos programas de vacinação de uma maneira rápida (Souza, 1999; Jeurissen et al., 2000; Santos e Silva, 2000) e altamente sensível (Miers et al., 1994). Tem sido provado que para a doença de Newcastle, o ELISA é mais sensível ou pelo menos, tão sensível quanto o teste de

IH, podendo ser mais eficiente na detecção de resposta imune precoce (Snyder et al., 1983; Sahle e Burgess, 2002). Apesar do IH ser o teste padrão para a detecção de anticorpos para a DN, vários autores como Adair et al. (1989), Bozorghmehrifard e Mayahi (2000), Brown et al. (1990), Das et al. (1997) e Marquardt et al. (1985) mostraram que há uma boa correlação entre os resultados deste teste e o de ELISA para a detecção de anticorpos para o VDN, podendo este último ser usado com alta eficiência no monitoramento e diagnóstico desta enfermidade em galinhas poedeiras e de corte.

### 3.4. ELETROFORESE – SISTEMA PAGE

A eletroforese é um teste usado para separar moléculas em uma matriz "porosa", tendo como base a migração daquelas sob um campo elétrico, proporcional à carga elétrica da molécula e sua massa molecular (Alfenas, 1998).

Um dos sistemas de eletroforese usados na separação de cadeias polipeptídicas é o que contém dodecil sulfato de sódio (SDS – *sodium dodecyl sulfate*) (SDS-PAGE). O termo PAGE originou-se do inglês "PolyAcrylamide Gel Electrophoresis", ou seja, eletroforese em gel de poliacrilamida (Westermeier, 1993).

Proteínas padrão com peso molecular conhecido são usadas como referência para determinar o tamanho das moléculas de proteína da amostra (Alfenas, 1998). As cadeias polipeptídicas são providas de acentuada carga negativa, proporcional ao comprimento da cadeia polipeptídica; migram com velocidades definidas apenas por diferenças de seus tamanhos moleculares (peneiramento molecular). Após o fim da corrida eletroforética, faz-se a revelação das proteínas no gel através de colorações como *Coomassie blue* ou prata. Se o objetivo da corrida eletroforética for um *western blot*, o gel deverá ser corado após a transferência (Westermeier, 1993; Alfenas, 1998).

### 3.5. WESTERN BLOT

O método de *immunoblotting* tem evoluído de velhas técnicas a protocolos pioneiros, nos quais os anticorpos eram usados para "marcar" diretamente o gel de poliacrilamida para técnicas mais recentes em que os polipeptídeos separados são transferidos para membranas de nitrocelulose, papel quimicamente ativado ou nylon. Contudo, há muitas variações deste sistema básico e o método mais comum envolve transferência eletroforética para membrana de nitrocelulose. O método padrão para transferir proteínas de géis de poliacrilamida para membranas é o *western blot* (Hudson e Hay, 1989; Westermeier, 1993; Alfenas, 1998) originalmente desenvolvido por Towbin et al em 1979, citado por Souza (2000), em que a transferência das proteínas do gel para a membrana se faz por eletrodifusão (Alfenas, 1998).

A técnica pode ser dividida em seis passos: preparação da amostra, eletroforese em gel de poliacrilamida, transferência para membrana de nitrocelulose, bloqueio, adição de anticorpo e detecção ou revelação (Harlow e Lane, 1988). Para confirmar a transferência das proteínas do gel de poliacrilamida para a membrana de nitrocelulose, a membrana é corada com *Ponceau S*.

### 3.6. IMUNOGLOBULINAS DE CODORNAS (IgG E IgY)

No soro das aves, a maior parte dos anticorpos encontrados são da classe IgG. Esta IgG pode ser transportada para o ovo conferindo imunidade passiva para o pintinho recém eclodido (Tini et al., 2002). No ovo, a IgG (IgY - imunoglobulina da "gema" do ovo - do inglês "yolk") é encontrada em maiores concentrações na gema do que na clara, sendo as concentrações de IgG na gema maiores do que as encontradas no soro das galinhas (Larsson et al., 1993; Tini et al., 2002).

A gema de ovo pode ser usada como fonte de anticorpos, porém os lipídeos da gema podem interferir nos testes sorológicos. Por isto, os anticorpos presentes na gema normalmente precisam ser processados

antes do seu emprego em sorologia. Os anticorpos são estáveis por algum tempo, sendo que alguns autores têm estocado estas preparações de IgG por dez anos a 4°C sem nenhuma perda significativa da sua atividade (Larsson et al., 1993).

Quando anticorpos purificados de uma espécie animal são injetados em outra espécie diferente, estes anticorpos são reconhecidos como antígeno e provocam uma forte resposta humoral. Esta característica é usada para produzir anti-imunoglobulinas específicas. Em geral, animais de diferentes gêneros responderão a um número de epitopos, tanto da cadeia leve quanto da cadeia pesada. Desta forma, estes imunógenos induzirão uma resposta humoral (Harlow e Lane, 1988).

No experimento realizado por Keck et al. (1993), no qual foi testado um ELISA comercial com anticorpos extraídos da gema do ovo e soros de galinhas, observou-se que os títulos possuíam boa correlação, principalmente quando usados para avaliar os níveis de anticorpos da progênie.

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1. LOCAL DE REALIZAÇÃO DOS EXPERIMENTOS

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório do Setor de Doenças das Aves, no Departamento de Medicina Veterinária Preventiva da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais e as técnicas de eletroforese e *western blot* foram executadas no Laboratório de Virologia Comparada do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG.

### 4.2. ANIMAIS UTILIZADOS NO EXPERIMENTO

Foram usadas neste experimento codornas japonesas de diferentes idades, provenientes do Aviário Santo Antônio (Lavras, MG), Granja Fujikura (Mogi das Cruzes, SP) e também da Fazenda Experimental da UFMG (Igarapé, MG) para obtenção de soros e ovos. Fêmeas de camundongos Balb/c com seis semanas de

idade foram obtidas no Biotério do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG.

#### 4.3. PURIFICAÇÃO DE IMUNOGLOBULINA G E Y DE CODORNA

##### 4.3.1. Purificação de IgG do soro de codornas

A purificação de IgG do soro de codornas foi feita seguindo o protocolo de Bhanushali et al. (1994), descrito originalmente para purificação de IgG do soro de galinha. Foram usados 10mL de soro de codorna diluído a 1:5 em tampão acetato. A este material foi adicionado ácido caprílico lentamente e em constante homogeneização a 4°C até a concentração de 25µL/mL de soro, incubando *overnight*. O sobrenadante foi removido após centrifugação (Centrífuga RC5B, Rotor GSA, Sorvall, DuPont, EUA) a 10.000xg (30min/4°C) e filtrado através de membrana clarificante e esterilizante (8/0,2µm, Millipore, EUA) para remoção de partículas e misturado com solução salina tamponada (PBS pH7,2) na proporção 1:10.

Uma segunda precipitação foi feita com o intuito de separar e coletar as imunoglobulinas G do soro, adicionando solução saturada de sulfato de amônio (apêndice 8.15) lentamente, gota a gota, sob homogeneização constante (agitação magnética em banho de gelo) por 30 minutos até atingir 36% de saturação de sulfato de amônio na mistura final. Esta solução foi centrifugada (10.000xg/30min/4°C) para coletar o precipitado. Para obter maior aproveitamento do material, foram feitas três centrifugações. O *pellet* foi ressuspenso em 1mL de PBS pH7,2 e dialisado. A diálise foi feita em tubo de celulose (limite de exclusão 10.000Da, THOMAS, EUA), fechado nas duas extremidades e colocado em um litro de PBS pH7,2, fazendo mais duas trocas de PBS em leve agitação magnética constante por 24 horas a 4°C. As amostras foram armazenadas a 4°C sem conservantes como indicado por Larsson et al. (1993).

##### 4.3.2. Purificação de IgY da gema de ovos de codorna

A purificação de IgY da gema de ovos de codorna foi baseada em uma combinação dos protocolos de Akita et al. (1992), Abbassi et al. (1999) e Chicken [200-] na forma descrita a seguir.

Foram coletadas gemas de ovos de codornas de várias idades. As gemas foram separadas da clara e o conteúdo da gema separado da membrana da gema. Foram colocados volumes iguais do *pool* de gemas e água ultrapura acidificada com HCl 0,1N para obter um pH final entre 5,0 e 5,2, o qual, segundo Akita et al. (1992) é o ideal para a recuperação de IgY, já que a gema tem pH entre 6,5 e 7,5. O pH da mistura gema mais água ultrapura (MilliQ, Millipore, EUA) acidificada foi medido com fita de pH (P4536, Range 4,5-10,0, Sigma, EUA). Foram adicionados dois volumes de clorofórmio e as fases desta mistura foram separadas por centrifugação (30 min/TA/3000xg). A fase aquosa superior que continha a IgY foi separada e para cada 10mL deste sobrenadante aquoso, foram adicionados 5mL de solução 36% (p/v) PEG-6000 (Polietileno Glicol / Carbowax 771, INLAB, Brasil), preparada em PBS pH7,2 para se obter uma concentração final de 12% (p/v) PEG-6000. O material foi homogeneizado e a mistura deixada em repouso por 30 minutos a 4°C. Em seguida, foi feita coleta do material precipitado em centrífuga (10min/TA/3000xg). O sobrenadante foi descartado e o *pellet* coletado foi dissolvido com PBS pH 7,2 em volume equivalente a 1% do volume original de gemas utilizadas. Foi adicionado etanol gelado (-20°C) fazendo uma mistura final de 50% (v/v) a -20°C, que foi centrifugada (modelo RC5B, Sorvall / DuPont, EUA) a 10.000xg por 30min a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspenso com PBS em ¼ do volume do *pool* de gemas inicial, dividido em placas de Petri estéreis e colocado em estufa de 37°C por aproximadamente 2h para a evaporação do álcool. Os sólidos foram ressuspendidos no mesmo volume inicial das gemas com água ultrapura (18MΩ, MilliQ, Millipore, EUA). Para o

armazenamento das amostras a 4°C, foram adicionados 200µL de azida sódica (solução 50% em PBS pH 7,2) para cada 1mL.

#### 4.4. DOSAGEM DE PROTEÍNA

A dosagem de proteína foi feita pelo método de Lowry segundo protocolo do kit Sigma (Protein Assay Kit, P 5656, Sigma, EUA) com a leitura em espectrofotômetro a 650nm (Microplate Reader, Model 550, Bio-Rad, EUA).

#### 4.5. ELETROFORESE

##### 4.5.1. Preparo das amostras

As amostras de IgG purificadas de codorna tiveram sua concentração de proteína determinada e foram preparadas para serem aplicadas no SDS-PAGE. Em cada canaleta do gel foi colocada 100µg de proteína em 10µL. Em cada amostra foram adicionados 3µL de tampão de amostra (apêndice 8.17) e 1µL de β-mercaptoetanol. Foram usados 2µL de padrão de pesos moleculares (*Prestained Protein Molecular Weight Standards 14,300 – 200,000 Range*, Gibco BRL, EUA) preparado com 1µL de EDTA 500mM, 3µL de tampão de amostra e 1µL de β-mercaptoetanol. As amostras foram colocadas em água fervente por sete minutos antes de serem aplicadas no gel.

O gel de poliacrilamida com SDS (SDS-PAGE) foi montado entre placas de vidro de 90x60mm, com espaçadores de 0,75mm de espessura. O gel constituiu-se de uma camada de corrida ou separação com concentração total de poliacrilamida 10% (apêndice 8.8) e outra de empilhamento ou aplicação com concentração total de poliacrilamida de 4% (apêndice 8.7). Após a polimerização, foi feita a aplicação das amostras, do padrão de peso molecular e de IgG purificada de galinha (Chicken IgG, I-4881, Sigma, EUA), que foi utilizada como controle e colocado tampão de corrida 1x (apêndice 8.24) na cuba de eletroforese. A eletroforese foi feita utilizando uma fonte (Mighty Slim Power Supply, SX250-115V, Pharmacia, EUA) em temperatura ambiente a 80 volts.

Foram feitos também, géis preparativos de canaleta única, nos quais foram aplicados 400µg de proteína (IgY), para obtenção de IgG purificada para imunização dos camundongos. Os géis foram corados com *Coomassie blue* (apêndice 8.10) para visualização das bandas.

##### 4.5.2. Coloração dos géis SDS-PAGE por *Coomassie blue*

Para coloração dos géis de SDS-PAGE com *Coomassie blue*, estes foram lavados com água deionizada por 4 vezes, para então acrescentar ao gel a solução corante (apêndice 8.10). Os géis foram incubados por 30 minutos à temperatura ambiente (TA) em constante agitação. Após este período, os géis foram lavados com solução descorante de ácido acético 12% (apêndice 8.11), com trocas periódicas desta solução, até a descoloração do gel e visualização das bandas (Harlow et al., 1988; Westermeier, 1993; Alfenas, 1998).

#### 4.6. WESTERN BLOT

4.6.1. *Western blot* para confirmação de identidade da IgG purificada do soro e da gema de ovos de codorna

A utilização do *western blot* nesta etapa do trabalho foi confirmar a identidade das proteínas purificadas, se compatíveis com a massa molecular de IgG ou IgY.

Feita a eletroforese (como descrito no item 4.5), o gel, a membrana de nitrocelulose e os papéis filtro foram colocados em um tampão de transferência (apêndice 8.25) por 30 minutos à TA. No aparelho de transferência, foi montado um "sanduíche", colocando papel filtro, a membrana de nitrocelulose, o gel e outro papel filtro, previamente umedecidos, no aparelho de transferência *Trans-Blot<sup>®</sup>, semi-dry electrophoretic transfer cell* (Bio-Rad<sup>®</sup>) como recomendado pelo manual de instruções e por Makkay et al. (1999). A transferência foi feita por duas horas a 25 volts. O material contido no gel SDS-PAGE foi transferido para a membrana de nitrocelulose, corada com *Ponceau S* e o gel com *Coomassie blue*, para confirmar a transferência.

A membrana foi incubada por uma hora com tampão de bloqueio de leite em pó desnatado 3% (apêndice 8.23). Após o bloqueio, foi feita a incubação da membrana com IgG de coelho anti-IgG de galinha (*Alkaline phosphatase conjugated rabbit anti-chicken IgG - whole molecule*, A9171, Sigma, EUA).

Para revelação da membrana, o conjugado anti-IgG de galinha (Sigma) foi diluído a 1:5000 em PBS-T (PBS Tween 20, apêndice 8.5), e a membrana incubada *overnight* a 4°C. Após a incubação, foram feitas lavagens seqüenciais da membrana (10 minutos com PBS-T, PBS pH7,2 e tampão AP - apêndice 8.20). Terminada a lavagem da membrana, foi adicionado o substrato que se constituiu de 10mL de tampão AP, 64µL de NBT (*NitroBlue Tetrazolium*, N5514, Sigma, EUA) e 34µL de BCIP (5-bromo, 4-chloro, 3 indolyl-phosphate, S3771, Promega, EUA). A membrana foi deixada sob agitação até o aparecimento das bandas. Para parar a reação, o substrato foi descartado e a membrana lavada três vezes com água ultrapura por 15 minutos.

4.6.2. *Western blot* para avaliação da produção de IgG de camundongos anti-IgG de codorna

Outro *western blot* foi feito para verificar a especificidade da resposta dos camundongos imunizados contra imunoglobulina de codorna. A técnica usada foi semelhante à citada no item 4.6.1. Após a transferência do material do gel para a membrana de nitrocelulose e bloqueio com leite em pó desnatado 3% (apêndice 8.23), a membrana com IgG de codorna foi incubada com um *pool* de soros dos camundongos imunizados com IgG purificada dos soros de codornas, diluído a 1:500. Foi feita a lavagem da membrana e posterior incubação com anti-IgG de camundongo (*Anti-mouse IgG - whole molecule - alkaline phosphatase conjugated*, A3562, Sigma, EUA) e revelação como descrito anteriormente.

#### 4.7. PRODUÇÃO DE ANTICORPOS ANTI-IgG DE CODORNAS EM CAMUNDONGOS

##### 4.7.1. Imunização dos camundongos

Todo o processo de imunização seguiu o protocolo descrito em Harlow et al. (1988).

O imunógeno foi preparado com 0,05mL de amostra de IgG purificada (50µg de proteína) e 0,05mL de adjuvante de Freund.

A imunização com IgG purificada de codorna foi feita em fêmeas de camundongos Balb/c, com 6 semanas de idade pela via intraperitoneal. As fêmeas de camundongo foram separadas em dois grupos de dez. O primeiro grupo foi imunizado com IgG purificada do soro de codorna, sendo que cada camundongo recebeu uma dose de 50µg de proteína em 100µl de adjuvante. O segundo grupo de camundongos foi imunizado com a banda do gel SDS-PAGE correspondente a cadeia pesada da IgG purificada de codorna, contendo 50µg de proteína. Um PAGE preparativo foi feito para que a banda da cadeia pesada fosse recortada com lâmina de bisturi, macerada (gral + pistilo) e misturada posteriormente, com adjuvante completo ou incompleto de Freund. A primeira imunização foi feita com adjuvante completo de Freund (*Freund's Adjuvant, complete*, F5881, Sigma, EUA), e as demais foram feitas usando adjuvante incompleto de Freund (*Freund's Adjuvant, incomplete*, F5506, Sigma, EUA) na mesma proporção. Após a terceira imunização, foi avaliada a reatividade de IgG de camundongo anti-IgG de codorna no soro destes camundongos através de ELISA em microplacas sensibilizadas com IgG purificada de codorna e IgG de galinha como controle.

4.7.2. Coleta de sangue de camundongo para avaliação da reatividade de anticorpos anti-IgG de codorna

Para os ensaios de reatividade da IgG de camundongo anti-IgG de codorna foi coletado sangue dos camundongos da veia caudal. Com uma lâmina de bisturi, a ponta da cauda de cada camundongo foi cortada, e aproximadamente 50µL do sangue foram colocados em oito disquinhos de papel filtro

Whatman N° 1 (Rivetz et al., 1985; Jorge et al., 1986) em cada pocinho da microplaca de ELISA. Foi feita uma diluição 1:2 do sangue de cada camundongo nos pocinhos da microplaca, adicionando 50µL de PBS pH 7,2 estéril.

#### 4.7.3. Sangria dos camundongos

A sangria foi feita com os camundongos previamente anestesiados com clorofórmio, via veia jugular. Após a separação dos soros, estes foram armazenados individualmente a -20°C para uso posterior. Para confirmar a especificidade da resposta imune dos soros dos camundongos contra a IgG de codorna, foi feito um *western blot* usando os soros coletados como descrito no item 4.6.2.

#### 4.8. TITULAÇÃO DA VACINA CONTRA A DOENÇA DE NEWCASTLE

A titulação da vacina com estirpe LaSota foi feita de acordo com Villegas e Purchase (1980). A vacina liofilizada (frasco de 1000 doses, Merial) foi reconstituída com 30mL de PBS pH 7,2 estéril e, posteriormente, foram feitas diluições seriadas de 10<sup>-1</sup> a 10<sup>-10</sup>, sendo utilizadas somente as diluições de 10<sup>-4</sup> a 10<sup>-10</sup>. Foi inoculado 0,2mL de cada diluição na cavidade corioalantóide de cinco ovos embrionados de galinhas livres de patógenos específicos (OEG/SPF) entre 9 e 11 dias de incubação. O controle negativo foi preparado com solução salina estéril sem vírus. Os OEG/SPF foram incubados a 37°C por três dias, acompanhados por ovoscopia diária. Após 72 horas de incubação, os OEG/SPF (inoculados e controles negativos) foram colocados *overnight* em geladeira (4°C) para morte embrionária. No dia seguinte foi feito o teste de HA (hemaglutinação) dos líquidos alantóides de todos os OEG/SPF, usando uma suspensão salina de hemácias de galinha a 5% em solução salina a 0,85%. O título foi calculado de acordo com Reed & Muench (Lúcio, 1976b).

##### 4.8.1. Preparo da suspensão de hemácias de galinha

Para o preparo das hemácias, foi coletado (via intracardíaca) sangue de galinhas SPF

em seringa estéril (10 mL) contendo solução anti-coagulante (solução de citrato de sódio a 4,5% em água ultrapura, autoclavada). Esta mistura 1:1 de sangue com anti-coagulante foi homogeneizada, colocada em tubo de centrifuga graduado e centrifugada (10min/500xg/TA). O sobrenadante foi descartado e as hemácias ressuspendidas com PBS pH 7,2 até o volume original, para nova centrifugação, sendo este procedimento repetido por três vezes. Após a última lavagem, foi preparada uma suspensão de hemácias de galinha 5% (v/v) com PBS pH 7,2.

##### 4.8.2. Teste de hemaglutinação (HA) rápida

Foram misturados 50µL de líquido alantóide de cada ovo usado para titulação da vacina de Newcastle com 50µL de suspensão de hemácias de galinha 5% em uma lâmina de vidro, agitada por um minuto para que fosse feita a leitura (ausência ou presença de atividade hemaglutinante).

#### 4.9. COLETA DE SOROS DE CODORNAS NEGATIVOS E HIPERIMUNES PARA O VDN

##### 4.9.1. Coleta de soros negativos

Os soros presumivelmente negativos foram coletados de 30 codornas com duas semanas de idade, sabidamente não vacinadas, vindas de matrizes também não vacinadas. O sangue foi coletado pela via intra-cardíaca e os soros obtidos foram armazenados a -20°C até o uso.

##### 4.9.2. Imunização de codornas com VDN, produção e coleta dos soros hiperimunes

Para a obtenção de soros positivos, 50 codornas adultas foram vacinadas com vacina contra o VDN (LaSota, Merial), 10<sup>5,8</sup>DIE<sub>50</sub>/dose de 0,1mL, reconstituída em 30 mL de solução salina estéril, como descrito por Villegas e Purchase (1980).

As codornas foram vacinadas três vezes com 0, 21, 42 dias.

O primeiro grupo de 20 codornas foi vacinado com duas gotas de vacina viva via ocular (2x10<sup>5,8</sup>DIE<sub>50</sub>/0,03mL), com vacinações sucessivas 21 e 42 dias após a primeira vacinação, também com vacina

viva via ocular. As outras 30 codornas foram vacinadas primeiramente com duas gotas da vacina viva via ocular ( $2 \times 10^{5,8}$  DIE<sub>50</sub>/0,03 mL), e as vacinações sucessivas (21 e 42 dias após a primeira vacinação) foram feitas inoculando em cada codorna 0,1mL de vacina inativada na musculatura do peito de cada codorna. Quinze dias após a terceira inoculação, o sangue das codornas dos dois grupos foi coletado individualmente pela via intra-cardíaca. Após a separação do soro, estes foram armazenados individualmente a -20°C até o uso.

#### 4.10. CULTIVO, CONCENTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DO VDN

Para a replicação do VDN (vírus vacinal da doença de Newcastle, reconstituído) foram utilizados OEG/SPF. A inoculação foi feita via cavidade alantóidea com aproximadamente  $10^{6,75}$  DIE<sub>50</sub> /mL (dose infectante embrionária 50%) e incubação dos ovos por 72 horas a 37°C. Os embriões que morreram nas primeiras 24 horas após a inoculação foram descartados. A coleta do líquido alantóideo (LA) foi feita após o período de incubação e posterior resfriamento dos ovos para morte embrionária. Os LA foram coletados em *pool* em frascos esterilizados e mantidos sob refrigeração para posterior centrifugação (30min/4°C/5.000xg) para clarificação (centrífuga refrigerada mod. RC5B/rotor GSA, Sorvall / DuPont, EUA). Após a clarificação, o LA sobrenadante foi concentrado aproximadamente 500 vezes por precipitação com sulfato de amônio. Uma solução saturada de sulfato de amônio tamponada pH 7,2 (apêndice 8.15) foi gotejada por 3 horas sobre o LA em agitação lenta constante e em banho de gelo até atingir a saturação final de 36%. Esta mistura final contendo vírus insolubilizado foi centrifugada (30min/4°C/10.000xg). O sedimento foi ressuscitado em água destilada estéril (1:100) e dialisado 3 vezes contra PBS pH 7,2 (membranas de diálise código 3787 D42, limite de exclusão 12.000 Da, Spectrapore, EUA). Para a concentração por desidratação, o material retido na membrana foi imerso em solução saturada de PVP 360 (polivinil pirrolidona, peso

molecular 360.000 DA, SIGMA, EUA) por 48 horas a 4°C e ressuscitado em PBS pH7,2 a 1:500 do volume inicial do LA.

A purificação do vírus foi feita em gradiente contínuo de sacarose. A solução estoque de sacarose de 66% (peso/volume) (apêndice 8.13) mantida sob refrigeração, foi utilizada como solução de origem para a preparação das demais concentrações de 25 a 55% em água ultrapura. As soluções de sacarose foram colocadas em tubos de polipropileno (Beckman, EUA) com o auxílio de uma seringa com agulha 40x20mm equipada com tubo de silicone na extremidade, iniciando pela solução de sacarose menos concentrada, sendo esta colocada no tubo, distribuindo 2mL por concentração. Após a distribuição, os tubos foram mantidos refrigerados por 18 horas, para a formação do gradiente contínuo de sacarose. O concentrado viral foi ressuscitado em 10mL de solução tampão NET (apêndice 8.3) e 1mL adicionado lentamente no topo da camada superior do gradiente. Os tubos de polipropileno contendo o gradiente de sacarose carregado com o concentrado da amostra viral foram centrifugados a 40.000xg por 16 horas a 4°C. Após a centrifugação, foram recolhidas no fundo do tubo alíquotas de 1mL. Em cada alíquota foi adicionada uma solução de Fluoreto de Fenil Metil Sulfonil (PMSF, apêndice 8.6) e foram armazenadas a -20°C. A concentração de proteínas totais do VDN foi determinada pelo método de Lowry segundo instruções do *kit Sigma (Protein Assay Kit, P 5656, Sigma, EUA)* conforme Souza (2000).

#### 4.11. ESTABELECIMENTO DA INIBIÇÃO DA HEMAGLUTINAÇÃO (IH) COMO TÉCNICA DE REFERÊNCIA

Foi realizada conforme descrito por Beard (1980)

##### 4.11.1. Hemaglutinação (HA) para titulação do antígeno viral

Foram utilizadas microplacas de poliestireno contendo 96 pocinhos com capacidade para 200µL por pocinho, com fundo em "V". Em cada pocinho foram colocados 50µL de PBS pH7,2, 50µL do VDN no primeiro pocinho seguindo diluições seriadas de 1/2 a 1:2048

e 50µL de hemácias de galinha 0,5% em todos os pocinhos. A microplaca foi agitada e incubada por 45 minutos à TA. Na leitura, foi determinando o título hemaglutinante da preparação do vírus. Este foi expresso como sendo a recíproca da maior diluição que causou completa aglutinação, correspondendo a uma unidade hemaglutinante.

#### 4.11.2. Inibição da Hemaglutinação – IH para titulação de soros

Em cada pocinho da microplaca de IH, foram colocados 50µL de antígeno diluído em PBS pH7,2 contendo 4 UHA (unidades hemaglutinantes). No primeiro pocinho foram colocados 25µL de soro e 100µL de antígeno, diluição 1:5, para que as diluições seriadas pudessem ser feitas, transferindo-se 50µL de soro mais antígeno até o último pocinho, obtendo-se assim as demais diluições. A microplaca foi incubada por 45min à TA. Após este período de incubação, foram adicionados 50µL de suspensão de hemácias de galinha 0,5% em cada pocinho e a microplaca foi agitada e incubada novamente por 45 minutos à TA. Em seguida, efetuou-se a leitura dos resultados, onde foi determinada a mais alta diluição do soro na qual é observada a IH. A recíproca desta diluição é o título do soro, que foi expresso por média geométrica de títulos (GMT).

Soros controles positivos e negativos, bem como controles de hemácias e de antígeno foram incluídos no teste.

#### 4.12. DESENVOLVIMENTO E PADRONIZAÇÃO DOS ELISAS (ENZYME LINKED IMMUNOSSORBENT ASSAYS)

##### 4.12.1. ELISA de captura para a detecção de anti-IgG de codornas nos soros de camundongos hiperimunes

O desenvolvimento deste ELISA foi feito com base nas técnicas descritas por Rivetz et al.

(1985) e Otani et al. (1993). Uma ilustração esquemática pode ser vista na figura 2.

Para a avaliação da resposta dos camundongos inoculados com IgG purificada do soro de codorna, por precipitação com sulfato de amônio ou eletroforese preparativa, microplacas de poliestireno de 96 cavidades, de fundo chato (25805-96, Corning, EUA) foram sensibilizadas *overnight* a 4°C com imunoglobulinas de codorna (purificada do soro e da gema e com IgG de galinha (Sigma, EUA) como controle, em concentrações de 30µg/mL em tampão carbonato/bicarbonato pH 9,6 (apêndice 8.21). Após a sensibilização e lavagem das placas, estas foram incubadas a 37°C por 1 hora em câmara úmida com tampão de bloqueio de leite em pó desnatado 3% (apêndice 8.23).

Os soros dos camundongos previamente imunizados e soros controle negativos (camundongos não inoculados) foram diluídos a 1:100 em PBS mais Tween a 0,05% (PBS-T) e incubados nas placas sensibilizadas em câmara úmida por 2 horas a 37°C. Os anticorpos de camundongos (IgG) anti-IgG de codorna foram detectados com conjugado IgG de cabra anti-IgG de camundongo conjugado com fosfatase alcalina (*Alkaline phosphatase conjugated goat anti-mouse IgG – whole molecule, affinity isolated antibody*, A3562, Sigma, EUA) a 1:10.000 em PBS-T por 30min a 37°C. Entre cada reação, foram feitas três lavagens das microplacas com PBS-T 0,05%. A revelação da reação foi feita por conversão colorimétrica (30min/37°C) de p-nitrofenil fosfato (pNPP, N2765, Sigma, EUA) (apêndice 8.16). As microplacas foram lidas em espectrofotômetro para ELISA (Microplate Reader, Model 550, Bio-Rad, EUA) com filtro de comprimento de onda de 405nm.

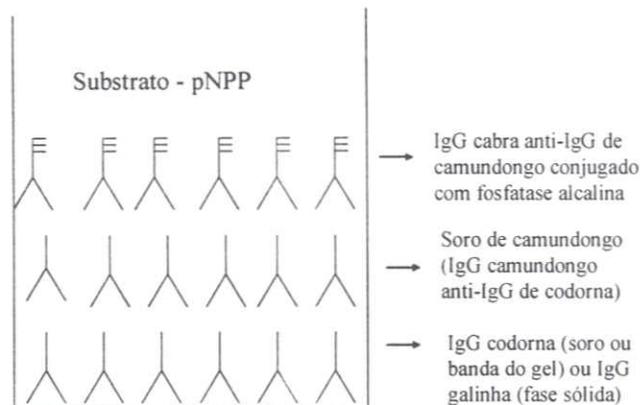


Figura 2. Ilustração esquemática de ELISA de captura para avaliação da resposta imune dos camundongos imunizados contra IgG de codorna.

4.12.2. ELISA indireto para a detecção de IgG de codorna contra o VDN utilizando anticorpo secundário anti-espécie (anti-IgG de codornas)

O desenvolvimento do ELISA indireto para detecção de anticorpos de codorna contra o VDN utilizando anticorpo secundário de camundongo anti-IgG de codorna ("ELISA indireto para codorna") foi feito baseando-se na técnica descrita por Folitse et al. (1998); Williams et al. (1997) e Sahle e Burgess (2002). A representação das etapas deste ELISA pode ser vista na Figura 3.

A titulação em blocos dos reagentes foi feita considerando variáveis como quantidade de vírus, soro, anticorpo secundário (policlonal) de camundongo anti-IgG de codorna, IgG de cabra anti-IgG de camundongo conjugado com fosfatase alcalina (*Alkaline phosphatase conjugated goat anti-mouse IgG - whole molecule, affinity isolated antibody*, A3562, Sigma, EUA)

Para sensibilização das microplacas de ELISA com 96 pocinhos de fundo chato (25805-96, Corning, EUA) com o VDN

(estirpe LaSota, propagada em ovos embrionados de galinhas SPF e purificada por precipitação com sulfato de amônio 36% (v/v) foram utilizadas quatro concentrações de concentrado viral - CV/VDN (100ng, 300ng, 10µg, 30µg) em tampão carbonato/bicarbonato (apêndice 8.21), incubado por 2h a 37°C, e bloqueio com leite em pó desnatado 3% (apêndice 8.23) por 1h. As etapas seguintes constituíram-se da diluição dos soros positivos e negativos para VDN de codorna e de galinha (soros controle) a 1:50 e 1:100, também incubados por 1h a 37°C; diluição do anticorpo secundário - IgG de camundongo anti-IgG de codorna (1:100, 1:500, 1:1.000, 1:5.000, 1:10.000, 1:15.000 e 1:20.000) conjugado - IgG de cabra anti-IgG de camundongo conjugado com fosfatase alcalina (1:1.000, 1:5.000, 1:10.000, 1:15.000 e 1:30.000) com incubação de 1h a 37°C. Entre cada etapa do ELISA, as microplacas foram lavadas três vezes com PBS-T 0,05%. Após a adição do substrato - pNPP (apêndice 8.16), a leitura das microplacas foram feitas em espectrofotômetro com comprimento de ondas de 405nm, após 30 minutos de incubação a 37°C.

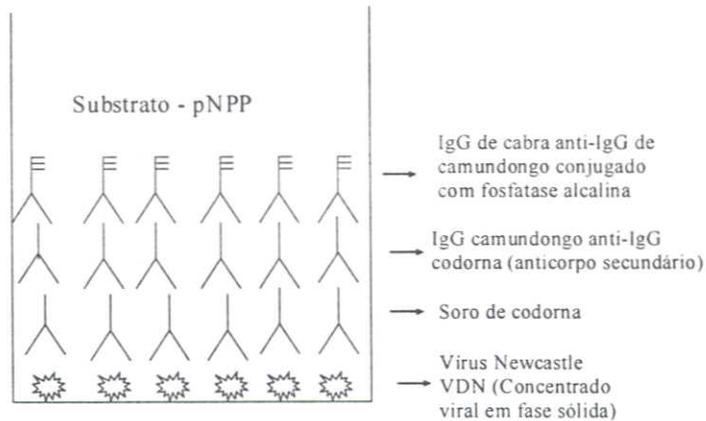


Figura 3. Representação das etapas de montagem do "ELISA indireto para codorna" desenvolvido para detecção de IgG anti-VDN no soro de codornas.

#### 4.12.3. ELISA indireto para a detecção de IgG de codorna contra o VDN utilizando conjugado heterólogo

Um ELISA indireto para a detecção de anticorpos de codorna específicos para VDN ("ELISA para galinha") foi desenvolvido, como descrito no item 4.11.2. exceto pela ausência da reação de anticorpo secundário de camundongo anti-IgG de codorna e ao

conjugado de cabra anti-IgG de camundongo. Estes dois reagentes foram substituídos por IgG de coelho anti-IgG de galinha conjugado com fosfatase alcalina nas diluições 1:100, 1:500, 1:1.000, 1:2.000, 1:5.000, 1:10.000, 1:15.000, 1:30.000 e 1:45.000. A Figura 4 ilustra este ELISA.

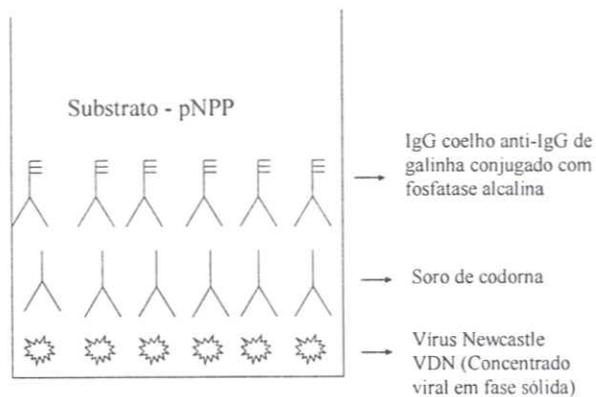


Figura 4. Etapas do "ELISA indireto para galinha" desenvolvido para detecção de IgG de codorna anti-VDN no soro de codornas.

#### 4.13. ANÁLISE ESTATÍSTICA

A avaliação da significância estatística dos resultados das leituras dos testes de ELISA utilizados neste trabalho, foi feita pelo teste t de Student através do programa estatístico SAEG.

A análise estatística da padronização do ELISA e dos resultados foi feita pelo método TG-ROC (Two-Graph Receiver Operating Characteristic) descrito por Greiner (1995) e Xu et al. (1997), o qual permitiu avaliar o ponto de corte quanto à eficiência do teste e índice de Youden.

Para eliminar diferenças entre as microplacas de ELISA, cada valor de absorbância obtido pelo ELISA foi multiplicado por um fator de correção (Folgueras, 1998), já que esta variação entre microplacas, se maior que 10%, prejudica a correlação entre as repetições das amostras (Silim e Venne, 1989).

Greiner (1995) descreveu uma planilha que seleciona valores de ponto de corte em testes de diagnóstico, indicando o valor mais adequado para que se tenha sensibilidade e especificidade ótimas, mínimo de soros falso-positivos e falso-negativos, com o menor risco possível (valor preditivo). Os gráficos foram calculados para um grau de confiança de 95%.

Alguns conceitos importantes com suas respectivas fórmulas são definidos a seguir (Brown et al., 1990; Folgueras, 1998; Makkay et al., 1999):

**f (fator de correção)** = 1 / média das leituras dos soros controle positivo

**Sensibilidade (Se):** é a capacidade do ELISA de detectar amostras positivas quando estas são positivas também no IH (teste de referência).

$$Se = \frac{\text{Número soros positivos em IH e ELISA}}{\text{Número soros positivos em IH}}$$

**Especificidade (Es):** é a capacidade de detectar soros negativos verdadeiros (em relação ao teste de referência), ou seja, a

amostra de soro deve ser negativa tanto no IH quanto no ELISA.

$$Es = \frac{\text{Nº soros negativos em IH e ELISA}}{\text{Nº soros negativos em IH}}$$

**Taxa de Falso Negativo (TFN):**

$$TFN = \frac{\text{Nº soros pos. em IH e neg. em ELISA}}{\text{Nº soros neg. em ELISA} \times 100}$$

**Taxa de Falso Positivo (TFP):**

$$TFP = \frac{\text{Nº soros neg. em IH e pos. em ELISA}}{\text{Nº soros pos. em ELISA} \times 100}$$

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1. PURIFICAÇÃO DE IMUNOGLOBULINAS

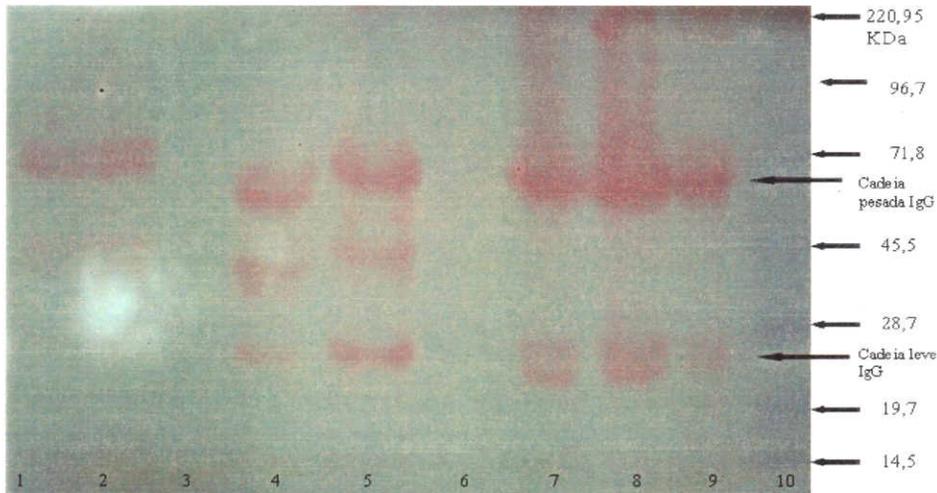
A purificação de IgG do soro e IgY da gema de ovos de codorna foi feita com o objetivo de produzir anticorpos secundários anti-espécie através da inoculação de camundongos.

Uma vez purificadas, foi determinada a concentração de proteína de cada amostra de IgG purificada do soro e IgY da gema. As amostras de soro tinham em média 4939,4µg de proteína total/mL e as amostras de IgY purificada da gema, 7467,5 µg de proteína total/mL. Esta diferença na concentração protéica é esperada (Otani et al., 1993; Bizhanov et al., 2000; Tini et al., 2002).

Para confirmar a purificação de IgG e IgY de cada amostra, foram feitos eletroforese e *western blot* (Figuras 5 a 9). Na eletroforese, foi verificada a separação das cadeias leve e pesada das imunoglobulinas. O peso molecular de cada banda foi determinado de acordo com o padrão de peso molecular. Quando analisamos o PAGE referente ao material de gema (Figura 6, canaletas 5 a 7), foi possível observar a presença marcante de bandas de proteína, com peso molecular (45,5 kDa) diferente das cadeias leve e pesada da IgG. A presença desta banda foi determinante para a exclusão destas amostras para imunização dos camundongos, pois uma resposta dos

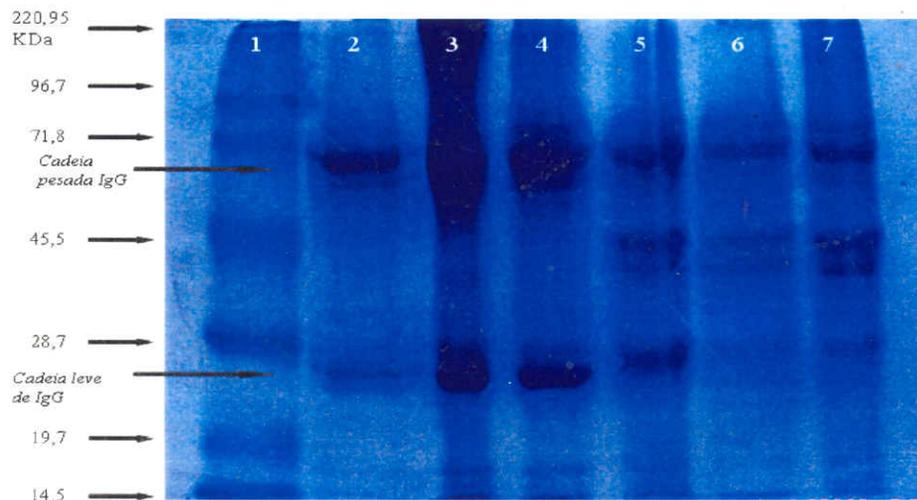
camundongos contra esta proteína, a ovoalbumina, poderia prejudicar a validação do "ELISA indireto para codorna". Com base nos dados de dosagem de proteína já citados, análise do PAGE e da membrana de *western blot*, foi concluído que o melhor

material para imunização dos camundongos seria a imunoglobulina purificada de soro por sua maior pureza, apesar da gema do ovo possuir maior concentração de proteínas totais que o soro (Otañi et al., 1993).



Legenda: 1,2,4,5-IgG da gema de ovos de codorna; 6-IgG de galinha; 7 a 9-IgG de soro de codorna; 10-padrão de peso molecular

Figura 5. Membrana de *western blot* corada com Ponceau S como teste confirmatório da transferência do material do gel de poliácridamida [IgGs purificadas de codorna a partir de soro de codorna e gema de ovos de codorna, e IgG de galinha comercial (Sigma)] para a membrana de nitrocelulose.



Legenda: 1-padrão de peso molecular; 2 a 4-IgG do soro de codornas; 5 a 7-IgG da gema de ovos de codornas

Figura 6. Gel de poliácridamida corado com *Coomassie blue* contendo amostras de IgG purificadas do soro de codorna e da gema de ovos de codorna, mostrando separação das cadeias leve e pesada.

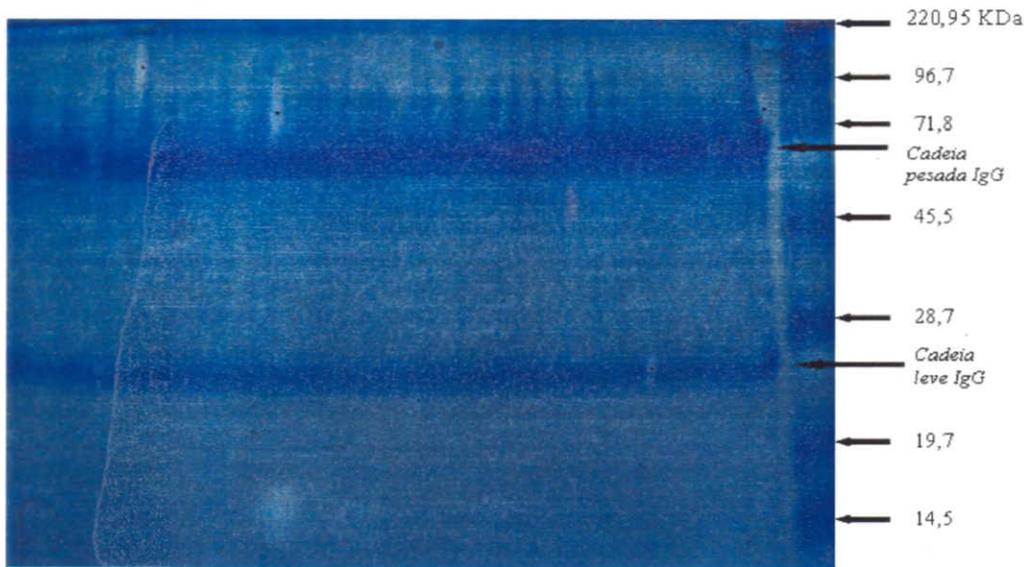
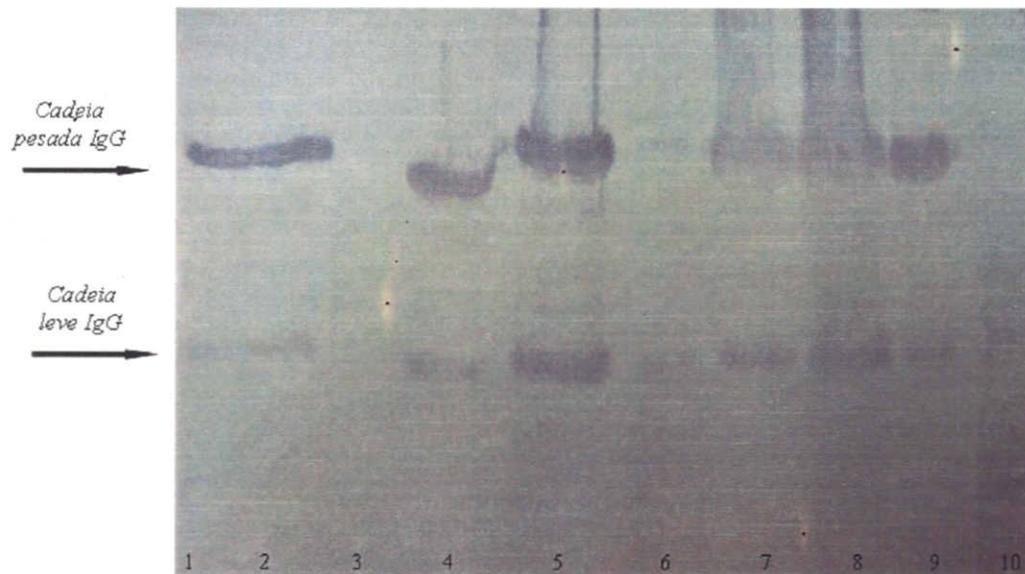


Figura 7. Gel de poliacrilamida preparativo apresentando as bandas das cadeias leve e pesada de IgG purificada do soro de codornas, corado com *Coomassie blue*.



Legenda: 1,2,4,5 - IgG da gema de ovos de codornas; 6 - IgG galinha; 7 a 9 - IgG do soro de codornas; 10 - padrão de peso molecular.

Figura 8. Membrana de *western blot* com amostras de IgG do soro e da gema de ovos de codornas e IgG de galinha (Sigma), revelada com IgG de cabra anti-IgG de galinha e corada com NBT e BCIP.

## 5.2. IMUNIZAÇÃO DOS CAMUNDONGOS

Foram feitas quatro imunizações nos camundongos com IgG do soro de codornas e com cadeia pesada da IgG isolada (extraída do PAGE), e a resposta imune dos camundongos foi avaliada pelo ELISA de captura. As leituras de densidade óptica (DO) em ELISA feitas com amostras do soro de camundongos imunizados com IgG do soro de codorna foram significativamente maiores que as leituras dos soros dos camundongos imunizados com a banda do PAGE referente a cadeia pesada de IgG (Tabela 1). A imunização dos camundongos com somente a cadeia pesada da IgG de codorna se deve ao fato da cadeia pesada ser estruturalmente diferente para cada classe ou subclasse de imunoglobulina.

Quando as amostras de IgG de camundongo anti-IgG do soro de codorna reagiram com IgG purificada da gema em ELISA, estas apresentaram valores de absorbância significativamente maiores que quando em reação com IgG do soro de

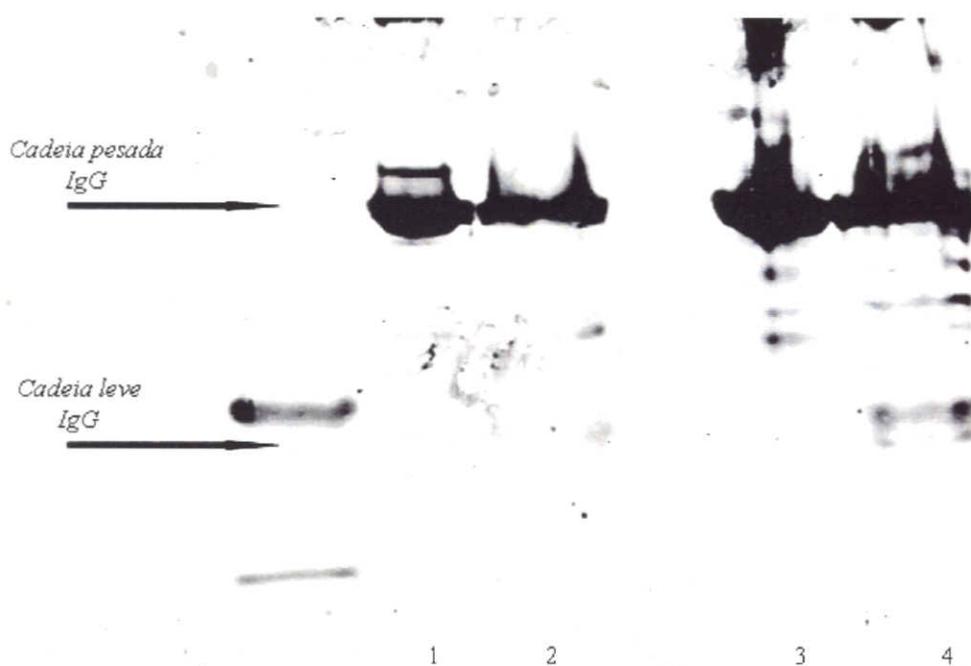
codorna e IgG de galinha como mostra a Tabela 1. O fato da IgG de camundongo anti-IgG de codorna ter reconhecido com maior intensidade (DO) IgG da gema que IgG do soro, provavelmente se justifica pela maior proporção relativa de IgG na gema do ovo que no soro da codorna (Otani et al., 1993), facilitando talvez a ligação antígeno (IgG da gema)-anticorpo (IgG camundongo anti-IgG de codorna) pela maior quantidade de IgG disponível.

Para verificar a especificidade da resposta do sistema imunológico dos camundongos frente à IgG purificada a partir de soros de codornas imunizadas, foi feito *western blot* das amostras (Figura 9). O *western blot* mostrou que o soro de camundongo contendo IgGs anti-IgG de codorna detectou tanto IgG de codorna quanto IgG de galinha, provavelmente devido às suas semelhanças, concordando com os resultados encontrados por Losonczi et al (1999). O resultado do ELISA mostra que esta reação cruzada existe com menor intensidade do que a reação específica.

Tabela 1. Média das leituras em absorbância por ELISA dos soros de camundongos imunizados com IgG purificada de soro de codorna por precipitação com sulfato de amônio  $[NH_4(SO_4)_2]$  e eletroforese preparativa (PAGE)\*.

	Fase sólida		
	IgG do soro de codorna	IgG da gema de ovo de codorna	IgG de galinha (Sigma) controle
IgG camundongo anti-IgG de soro de codorna purificado com $NH_4(SO_4)_2$	0,801 <sup>Ba</sup>	0,921 <sup>Aa</sup>	0,477 <sup>Ca</sup>
IgG camundongo anti-IgG de codorna a partir de eletroforese preparatória - PAGE	0,160 <sup>Ab</sup>	0,188 <sup>Ab</sup>	0,193 <sup>Ab</sup>

\* Letras diferentes, maiúsculas na linha e minúsculas na coluna indicam diferença estatística (P<0,05)



Legenda: 1 - IgG do soro de codorna; 2 - IgG de galinha; 3 a 4 - IgG da gema de ovos de codorna

Figura 9. Membrana de *western blot* contendo IgG purificada do soro de codorna, IgG de galinha (Sigma) e IgG purificada da gema de ovos de codorna, incubada com IgG de camundongo anti-IgG de codorna e corada com NBT e BCIP para confirmar a resposta da imunização dos camundongos com IgG purificada do soro de codornas.

### 5.3. INIBIÇÃO DA HEMAGLUTINAÇÃO – IH COMO TÉCNICA DE REFERÊNCIA

O teste de IH, padrão para quantificar anticorpos contra o VDN, foi utilizado para avaliar os soros de codorna, classificando-os como positivos e negativos.

Do total de soros de codorna positivos (50), 20 foram obtidos de codornas vacinadas somente com vacina viva, via ocular (VO) e os outros 30, de codornas que receberam vacina viva (VO) e inativada (intramuscular – IM) como descrito no item 4.9. Os soros das codornas que receberam somente vacina viva tiveram títulos de IH menores que  $2^7$ , com média geométrica de títulos (GMT) de 17,04, situação esta que provavelmente se explica pela estimulação, preferencialmente, da imunidade local (Alexander, 2003). Os soros das codornas vacinadas com vacina viva (VO) e inativada

(IM), apresentaram títulos maiores que as anteriores, com GMT de 315,17, chegando a títulos individuais de  $2^{11}$ . Este alto título dos soros das codornas vacinadas com vacina viva e inativada deve-se ao fato da vacina inativada estimular a imunidade sistêmica humoral, que de certa forma é a mais importante para a avaliação do *status* imunológico de um lote. A Tabela 2 apresenta os valores encontrados para cada grupo de soros coletados das codornas. Estes resultados corroboram os de Alexander (2003), que considera os títulos sorológicos para IH das galinhas vacinadas com vacina viva em no máximo  $2^{4 a 6}$  e em galinhas vacinadas com vacina inativada estes títulos podem chegar facilmente a  $2^{11 a 12}$ . Para fins de padronização do teste de ELISA, os soros das codornas vacinadas somente com vacina viva, por apresentarem títulos menores que  $2^7$ , foram excluídos do experimento.

Tabela 2. Médias geométricas dos títulos (GMT) obtidos por IH nos soros de codornas positivos contra o VDN e soros negativos.

Soros	Vacina / Via de Inoculação	GMT
Positivos 1 em IH	Viva / VO	17,04 <sup>b</sup>
Positivos 2 em IH	Viva / VO e inativada / IM	315,17 <sup>c</sup>
Negativos em IH	-	0 <sup>a</sup>

1 - soros de codornas vacinadas com vacina viva

2 - soros de codornas vacinadas com vacina viva, via ocular (VO) e inativada, intramuscular (IM)

<sup>a,b,c</sup> Letras diferentes na mesma coluna significa diferença estatística entre os valores

A técnica de referência IH, por sua alta especificidade, foi de grande importância na classificação dos soros de codorna em positivos e negativos. Com os dados de titulação em log<sub>2</sub> e GMT foi possível fazer uma avaliação da resposta imunológica das codornas frente à vacinação. Com os dados obtidos, verifica-se que a vacina contra o VDN foi tão eficiente na indução da produção de IgG anti-VDN de codornas quanto em galinha, levando em consideração o tipo de vacina (viva ou inativada) e o método de vacinação (via ocular ou intramuscular) utilizado, corroborando com aqueles encontrados por Alexander (2003) para galinha.

#### 5.4. ELISA

Como resultado da titulação em bloco dos reagentes dos ELISAs, buscando as maiores leituras em DO encontradas frente a diferentes concentrações do concentrado viral do vírus da doença de Newcastle (CV/VDN) na fase sólida e diferentes diluições dos soros positivos e negativos de codorna (previamente estabelecidos por IH), anticorpo secundário

(IgG de camundongo anti-IgG de codorna) e conjugados, foram encontradas as concentrações ideais dos reagentes usados nos "ELISA indireto para codorna" e "ELISA indireto para galinha", como mostra a Tabela 3.

Foram feitos dois modelos gráficos para determinação das melhores diluições e concentrações dos reagentes e soros. Os gráficos 1 e 3 ilustram as médias das DOs de soros de codorna positivos e negativos em IH para cada combinação das diferentes concentrações do CV/VDN e diluições dos soros e/ou anticorpos e conjugados no "ELISA indireto para codorna" e no "ELISA indireto para galinha" respectivamente.

Os gráficos 2 e 4 mostram as diferenças das leituras de DO entre os soros positivos e negativos em IH na mesma diluição dos mesmos ensaios de titulação em bloco dos reagentes do "ELISA indireto para codorna" e do "ELISA indireto para galinha", respectivamente.

Tabela 3. Concentrações ótimas determinadas para os reagentes utilizados no ELISA indireto para detecção de IgG de codorna e no ELISA indireto para detecção de IgG de codorna com conjugado anti-galinha, contra o vírus da doença de Newcastle.

	CV/VDN <sup>a</sup> fase sólida	Soro codorna	Anticorpo secundário <sup>b</sup>	Conjugado anti- camundongo <sup>c</sup>	Conjugado anti-galinha <sup>d</sup>
"ELISA indireto para codorna"	30 µg	1:50	1:5000	1:5000	-
"ELISA indireto para galinha"	30 µg	1:50	-	-	1:500

<sup>a</sup> CV/VDN – concentrado viral de vírus da doença de Newcastle

<sup>b</sup> IgG de camundongo anti-IgG de codorna

<sup>c</sup> IgG de cabra anti-IgG de camundongo conjugado com fosfatase alcalina (Sigma)

<sup>d</sup> IgG de coelho anti-IgG de galinha conjugado com fosfatase alcalina (Sigma)

#### 5.4.1. ELISA indireto para detecção de IgG de codorna contra o VDN

Analisando o gráfico da titulação em bloco dos reagentes para o "ELISA indireto para codornas, com as médias das leituras de DO dos soros (Gráfico 1), observa-se que entre os soros positivos, não houve diferença estatística significativa entre as diluições 1:50 e 1:100 na mesma concentração de anticorpo secundário. Para os soros negativos, a diluição 1:50 foi significativamente mais específica, com leituras de DO mais baixas que a diluição 1:100. Quando analisamos as diluições do anticorpo secundário e a quantidade de CV/VDN na fase sólida, os resultados mais específicos dos soros negativos foram obtidos quando usamos 100ng de CV/VDN com diluições do anticorpo secundário 1:10.000 (0,098), e para os soros positivos, quando usamos 30µg de CV/VDN com anticorpo secundário diluído 1:500 (0,480). Para a titulação em bloco dos reagentes do teste, foi necessário estabelecer um conjunto de dados que apresentasse as maiores leituras para soros positivos e as menores leituras para os soros negativos na mesma diluição, para que o ELISA fosse capaz de diferenciar soros positivos e negativos. Pela necessidade deste tipo de análise, fez-se necessária a elaboração de gráficos com as diferenças entre as DOs dos soros positivos e negativos de mesma diluição (Gráfico 2). Pela análise do gráfico dessas diferenças, notou-se que as diferenças dos soros diluídos 1:50 foram significativamente maiores que as diferenças para os soros diluídos 1:100. Entre todas as concentrações do CV/VDN, as menores diferenças foram obtidas quando a microplaca foi sensibilizada com 300ng de CV/VDN, independente da concentração do anticorpo secundário empregada. Ainda, quando o anticorpo secundário é diluído 1:5000 reagindo com soro diluído 1:50, observaram-se as mais altas diferenças entre soros positivos e negativos, independentemente da quantidade do CV/VDN. Quando usados 100ng de CV/VDN com soro diluído 1:50 e anticorpo secundário diluído 1:5.000, a diferença entre

soro positivo e negativo (0,206) foi a maior observada no experimento, porém, como o CV/VDN usado no experimento não é constituído somente de vírus, podendo haver outras proteínas do líquido alantóideo que foram precipitadas junto com o vírus, fez-se necessário a análise de concentrações maiores de CV/VDN, garantindo assim a quantidade mínima de proteína purificada (VDN) na fase sólida do ELISA, como indicado na literatura (Harlow et al, 1988). Além da análise da quantidade de proteína purificada, observou-se que, quando aumentamos a quantidade de CV/VDN de 100ng para 300ng, não houve estabilidade nas DOs das médias obtidas em cada diluição do soro e anticorpo secundário, o que aconteceu quando utilizou-se 10µg e 30µg de CV/VDN. Mesmo usando o tampão de bloqueio, cujo objetivo é evitar inespecificidade nas ligações, ainda há possibilidade de ocorrer reação inespecífica, ou seja, o anticorpo presente no soro não se liga somente ao vírus, mas também em outras proteínas existentes no CV/VDN e até mesmo na microplaca se não houver quantidade suficiente de vírus aderido a ela. Harlow et al (1988) indicam 100ng de proteína purificada para sensibilização das microplacas de ELISA. O CV/VDN utilizado neste trabalho para sensibilização das microplacas, foi obtido a partir de líquido alantóideo de OEG/SPF. Este VDN pode conter algumas outras proteínas do líquido alantóideo, mesmo após a purificação. Para garantir esta quantidade mínima de proteína purificada (VDN) na fase sólida do ELISA, foram testadas maiores concentrações de CV/VDN na fase sólida. Partindo deste princípio, foi excluído os valores das leituras encontradas com 100ng de CV/VDN, que apesar de apresentar a mais alta leitura entre as diferenças entre os soros positivos e negativos de mesma diluição não apresentou uma estabilização dos resultados quando aumentamos a concentração do CV/VDN, como acontece nas leituras das diferenças quando os soros 1:50 reagem com anticorpo secundário diluído 1:5000 com 10µg de CV/VDN e 1:5000 e 1:10.000 com 30µg de CV/VDN.

As leituras dos soros com 300ng de CV/VDN na fase sólida também não foram utilizadas por apresentarem as mais baixas leituras encontradas, considerando todos os reagentes testados. Com 30µg de CV/VDN, houve uma estabilização no aumento das diferenças para as diluições 1:5000 (0,183) e 1:10.000 (0,187) do anticorpo secundário. Não houve diferença estatística significativa no gráfico das diferenças (Gráfico 2) do anticorpo secundário nas diluições 1:5000 com 10µg de CV/VDN e 1:5000 e 1:10.000 com 30µg de CV/VDN. Tomando por base as maiores leituras e maiores diferenças, a

diluição do soro foi padronizada em 1:50, sendo a microplaca de ELISA sensibilizada com 30µg de CV/VDN e o anticorpo secundário diluído 1:5000. Nas diluições testadas do CV/VDN, as maiores diferenças observadas foram encontradas na diluição 1:5.000. Apenas com 30µg de CV/VDN ocorreram diferenças altas do soro 1:50 com anticorpo secundário 1:10.000, sem diferença estatística significativa para diluição 1:5000.

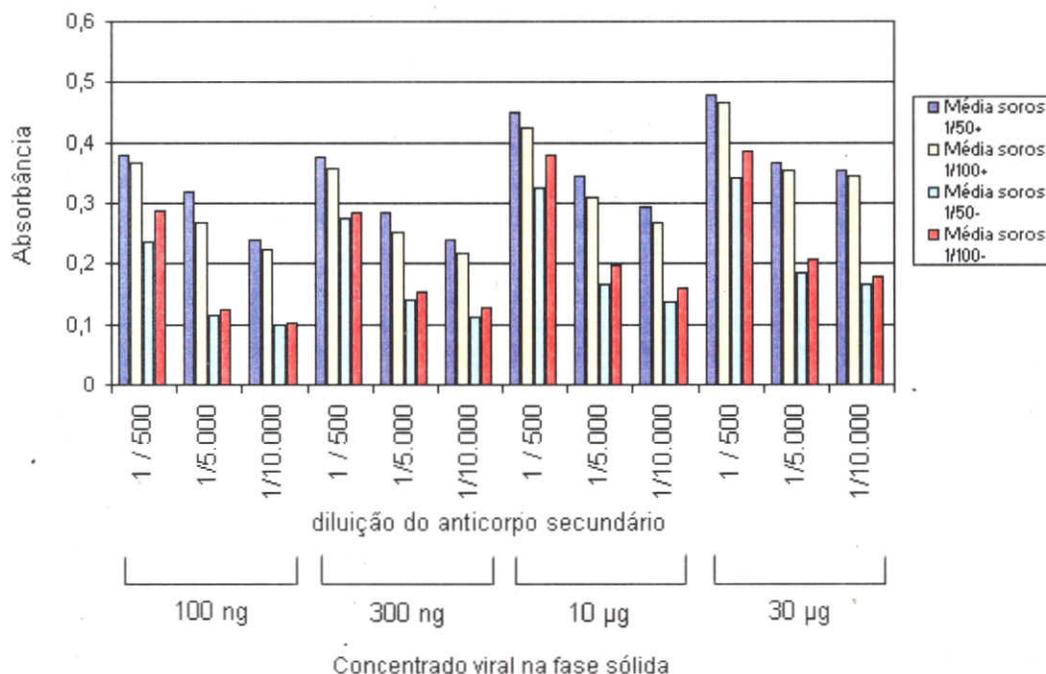


Gráfico 1. Valores em absorbância das médias das leituras dos soros positivos (+) e negativos (-) para cada uma das diluições dos soros, concentrado viral e anticorpo secundário testados na titulação em bloco do ELISA indireto para detecção de IgG de codorna contra o vírus da doença de Newcastle.

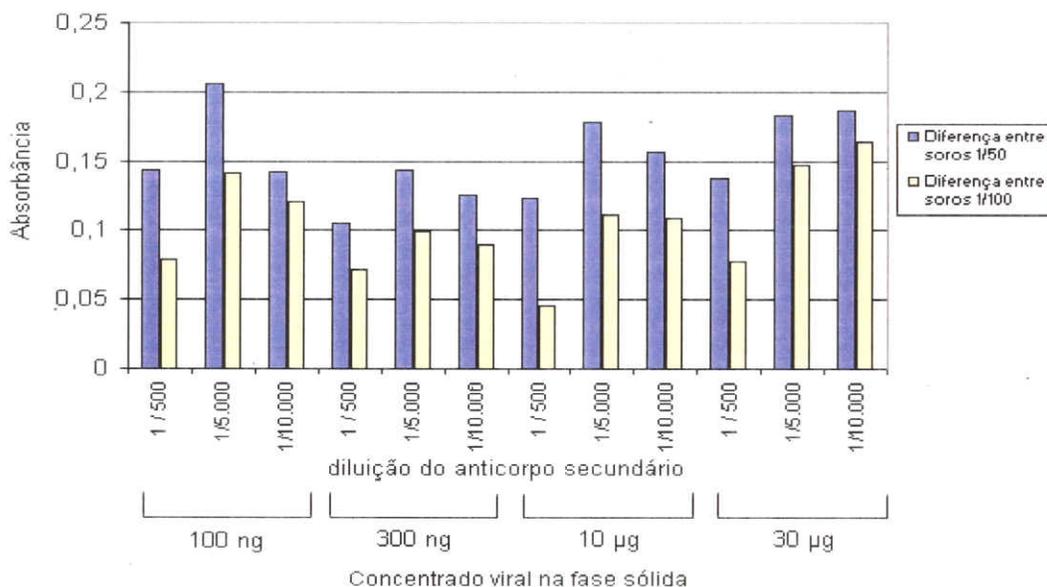


Gráfico 2. Valores de absorvância das diferenças das leituras entre soros positivos e negativos de mesma diluição em cada diluição do concentrado viral e anticorpo secundário testados na titulação em bloco do ELISA indireto para detecção de IgG de codorna contra o vírus da doença de Newcastle.

#### 5.4.2. ELISA indireto para detecção de IgG de codorna contra o VDN com conjugado anti-IgG de galinha

Analisando os dados da titulação em bloco dos reagentes usados no “ELISA indireto para galinha”, apresentados nos dois modelos gráficos das médias e das diferenças entre os soros positivos e negativos (gráficos 3 e 4 respectivamente) é possível observar que as DOs dos soros diluídos a 1:50 mostraram resultados mais específicos e diferenças maiores que quando estes mesmos soros foram diluídos 1:100. A microplaca sensibilizada com 30µg de CV/VDN obteve os melhores resultados, coincidindo com aqueles descritos no “ELISA indireto para codorna”, facilitando assim a comparação dos dois testes. Quando avaliada a diluição do conjugado (IgG de coelho anti-IgG de galinha conjugado com fosfatase alcalina), as maiores médias para os soros positivos e menores para os soros negativos foram obtidas com o conjugado diluído 1:500.

Na titulação em bloco dos reagentes usados nos ELISAs, quando nos referimos a

“reagentes” comuns tanto ao “ELISA indireto para codorna” quanto ao “ELISA indireto para galinha” (CV/VDN, soro) nota-se que estes se encontram nas mesmas concentrações, independente das etapas de cada teste. Para o “ELISA indireto para codorna” foi necessário a produção de um anticorpo secundário para, em uma etapa seguinte, adicionar o conjugado, diferente do “ELISA indireto para galinha” que emprega um conjugado comercial anti-IgG de galinha, excluindo a etapa de produção e uso do anticorpo secundário.

Com a concentração de cada reagente devidamente estabelecida para cada teste, foram testados todos os soros positivos e negativos em IH para VDN obtidos de codorna. Para cada microplaca de ELISA foi usado um fator de correção como já citado no item 4.12.

As absorvâncias encontradas foram analisadas pela planilha TG-ROC (Greiner, 1995) para estabelecer o ponto de corte para cada ELISA, com o intuito de coincidir este ponto de corte com resultados de sensibilidade e especificidade, ou seja, tendendo a um (100%), otimizando o teste de diagnóstico.

Muitos trabalhos usam o método estatístico do  $\chi^2$  para analisar os dados de padronização do ELISA, comparando-o sempre com IH (Tabela 4). O método

descrito por Greiner (1995) e Xu et al. (1997) usando as planilhas TG-ROC, otimiza os resultados do teste proposto, sugerindo um ponto de corte que atenderá às exigências para validação. Esta indicação do ponto de corte é feita usando os dados de sensibilidade e especificidade, tentando obter um mínimo de resultados falso-positivos e falso-negativos, que diminuem a eficiência do teste.

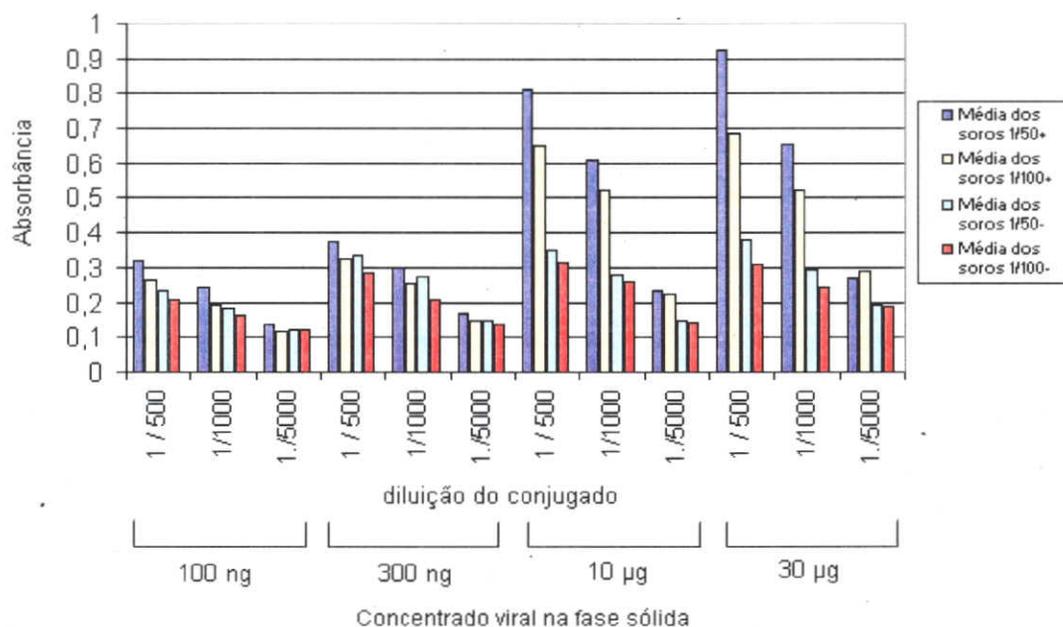


Gráfico 3. Valores médios das absorvâncias dos soros positivos (+) e negativos (-) de codorna para cada diluição dos soros, concentrado viral e conjugado testados na titulação em bloco do ELISA indireto para detecção de IgG de codorna contra o vírus da doença de Newcastle utilizando conjugado anti-IgG de galinha .

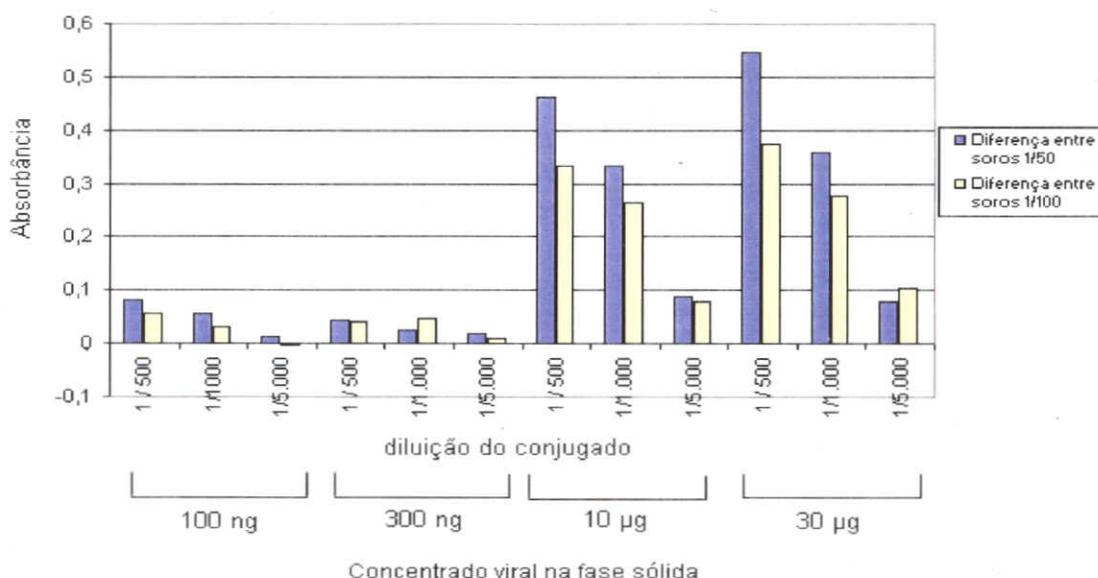


Gráfico 4. Valores das diferenças entre as médias das leituras dos soros de codorna positivos e negativos em cada diluição dos soros, concentrado viral e conjugado testados na titulação em bloco do ELISA indireto para detecção de IgG de codorna contra o vírus da doença de Newcastle utilizando conjugado anti-IgG de galinha .

Tabela 4. Classificação dos soros de codorna como positivos e negativos quanto à reatividade contra o vírus da doença de Newcastle (VDN) pelo método padrão (IH) e pelos ELISAs padronizados para detecção de IgG de codorna anti-VDN.

Soros de codorna	IH		"ELISA indireto para codorna"		"ELISA indireto para galinha"	
	+	-	+	-	+	-
N. de soros						
30 positivos	30	-	30	-	30	-
30 negativos	-	30	-	30	-	30

No "ELISA indireto para codorna", o ponto de corte estabelecido foi de 0,611 e para o "ELISA indireto para galinha", 0,461. Os Gráficos 5 e 10 ilustram a distribuição dos valores de absorbância encontrados nos seus respectivos ELISAs, transformados em valores de sensibilidade e especificidade para cada possível ponto de corte. Para alguns destes pontos, a sensibilidade e a especificidade atingiram seus valores máximos. Neste trabalho, como há uma grande faixa de sensibilidade e especificidade igual a 100%, a escolha do ponto de corte pela planilha TG-ROC foi feita encontrando o valor médio desses pontos de corte.

Para avaliar a performance do teste, a planilha TG-ROC lançou mão do índice de eficiência e do índice de Youden que mensuraram a eficiência do teste em separar soros positivos e negativos, com ausência de resultados falso-

positivos e falso-negativos, para cada possível ponto de corte. Estes índices de eficiência estão demonstrados no Gráfico 6 no "ELISA indireto para codorna" e no Gráfico 11 no "ELISA indireto para galinha". Estabelecido o ponto de corte, foi fácil observar que cada ELISA atinge o máximo de eficiência para o teste (100%), demonstrando ser um teste sensível e específico.

Em um de seus modelos gráficos de dispersão (Gráficos 7 e 12), a planilha de Greiner traça curvas de sensibilidade/especificidade obtidas com os dados de absorbância dos soros de ELISA, analisando a distribuição dos valores encontrados. A partir deste gráfico, a planilha transforma estes dados de sensibilidade (Gráficos 8 e 13) e de especificidade (Gráficos 9 e 14) em gráficos

de dispersão. Pelas dispersões apresentadas pelos resultados dos soros de codorna nos dois ELISAs, evidencia-se a inexistência de diferença estatística significativa entre a distribuição padrão e a dispersão dos resultados encontrados, confirmando mais uma vez a especificidade e sensibilidade do teste.

Apesar do teste de IH ser considerado o teste de eleição para DN quando se quer fazer triagem de soros, foi provado neste trabalho, concordando com outros

pesquisadores (Snyder et al., 1983; Marquardt et al., 1985; Das et al. 1997; Bozorghmehrifard e Mayahi, 2000) que, quando os soros foram submetidos ao teste de ELISA, já previamente testados por IH, estes apresentaram os mesmos resultados, mostrando que o teste de ELISA fornece ótimos resultados de sensibilidade e especificidade, com ausência de soros falso-positivos ou falso-negativos, como demonstrado na Tabela 5 e nos gráficos da planilha TG-ROC (Gráficos 5 a 14)

Tabela 5. Resultados dos soros de codorna positivos e negativos encontrados no ELISA indireto para detecção de IgG de codorna e no ELISA indireto para detecção de IgG de codorna com conjugado anti-galinha, contra o vírus da doença de Newcastle dados em absorbância e IH, dados em GMT.

IH (+)	IH (-)	"ELISA indireto para codorna"	"ELISA indireto para galinha"	IH
30	-	0,808 <sup>A*</sup>	0,785 <sup>A*</sup>	315,2 <sup>**</sup>
-	30	0,488 <sup>A*</sup>	0,334 <sup>B*</sup>	-

Letras maiúsculas diferentes na mesma linha indicam diferença estatística significativa (P<0,05)

\* média (absorbância)

\*\* média geométrica de título - GMT

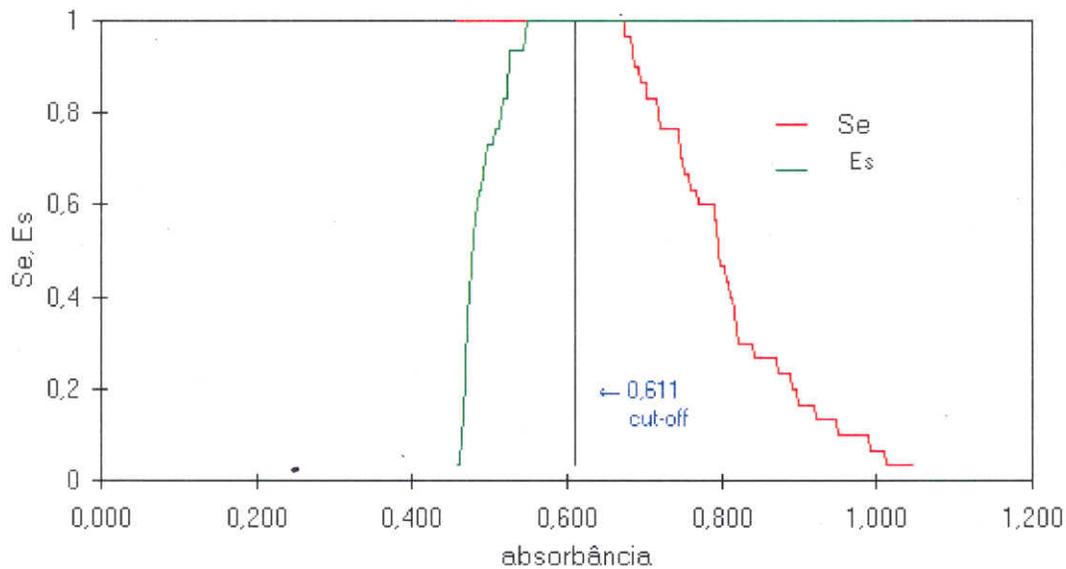
Apesar do IH ser um teste específico, a comparação de resultados entre laboratórios é difícil, devido à variação de protocolos. A utilização do ELISA como teste de diagnóstico para a DN facilitaria não só a rotina do laboratório, por empregar reagentes padronizados, mas também a comparação de resultados entre laboratórios, como ocorre para outras doenças. Esta sugestão tem sido feita por vários autores (Brown et al, 1990; Keck et al, 1993; Williams et al, 1997) para galinhas. Para a criação de codornas, pouco se sabe sobre ocorrência de doenças e métodos de diagnóstico comerciais disponíveis para esta espécie. A padronização do "ELISA indireto para codorna" foi feita com o objetivo não só de padronizar uma técnica de diagnóstico para esta espécie de ave, mas também, com o objetivo de comparar resultados obtidos com o "ELISA indireto para galinha". Uma questão levantada por este trabalho é sobre a eficiência do "ELISA indireto para galinha" na detecção de IgG anti-VDN de codornas.

Levando em consideração os gráficos da planilha TG-ROC, podemos observar não só o ponto de corte estabelecido, mas, também,

parâmetros importantes para a validação de um teste como eficiência, análise de sensibilidade e especificidade, que são reflexo da presença ou não de resultados falso-positivos ou falso-negativos. Por esta análise, pode-se concluir que os soros de codorna podem ser avaliados pelo "ELISA indireto para galinha". Porém, quando são analisados os dados de absorbância entre as médias dos soros positivos, não há diferença significativa mas é notável a diferença entre os valores médios dos soros negativos encontrados pelo "ELISA indireto para codorna" (0,488) e "ELISA indireto para galinha" (0,334). Codornas com duas semanas de idade foram usadas para coleta de soros negativos e provavelmente ainda possuíam anticorpos maternos. Como dito anteriormente, as duas primeiras etapas dos dois ELISAs foram iguais, ou seja, as microplacas foram sensibilizadas com a mesma quantidade de CV/VDN e os soros diluídos na mesma concentração. Sabendo disto, é possível questionar sobre o potencial de detecção de anticorpos de codorna pelo "ELISA indireto para galinha", já que o valor médio de absorbância obtido por este ELISA (0,334) foi significativamente menor que aquele

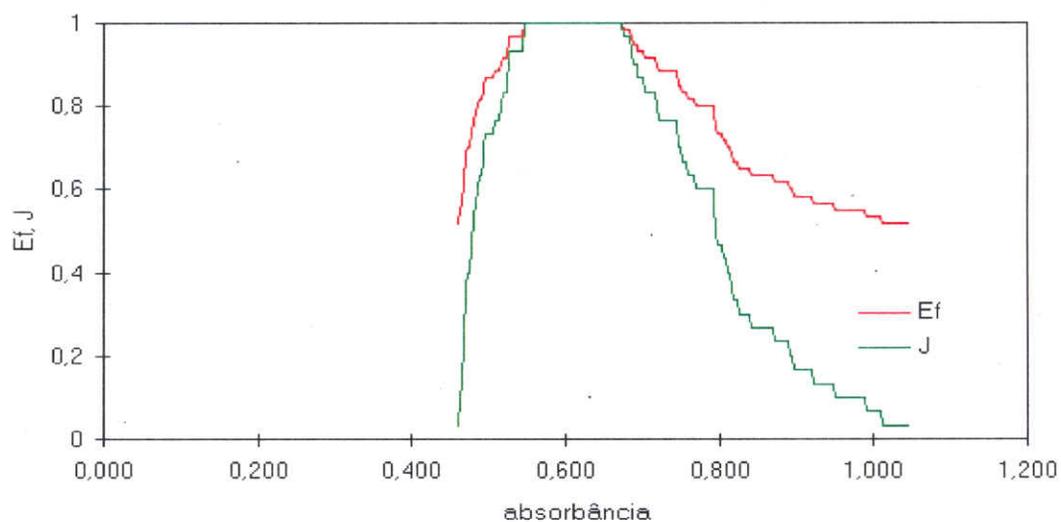
encontrado no "ELISA indireto para codorna" (0,488). Se mesclarmos os dois ELISA's trocando os valores de ponto de corte entre eles, é possível notar que no "ELISA indireto para codorna" com um ponto de corte de 0,461 a eficiência do teste diminuiu, passando a fornecer resultados falso-positivos. Quando o mesmo é feito com o "ELISA indireto para galinha", passamos a ter resultados falso-negativos, ou seja, há uma diminuição na

capacidade de detecção do teste. Considerando que atualmente, nos laboratórios de diagnóstico, a sorologia por ELISA para codornas é feita utilizando ELISA específico para galinhas, e a questão levantada anteriormente sobre a troca de ponto de corte, é possível que existam problemas relacionados à eficiência e viabilidade deste ELISA quando empregado para codorna.



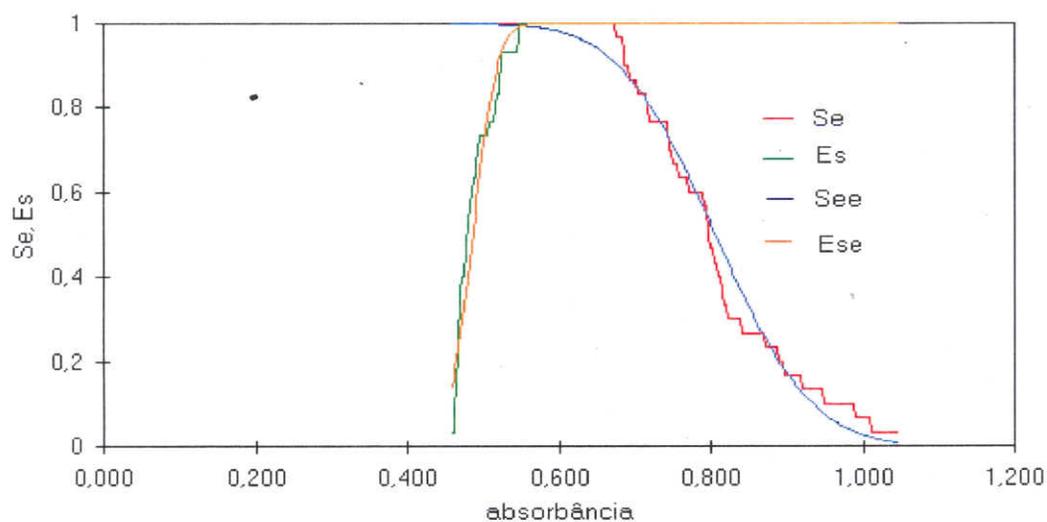
Legenda: Se – sensibilidade; Es – especificidade; cut-off – ponto de corte

Gráfico 5. Padronização do ponto de corte do ELISA indireto para detecção de IgG de codorna contra o vírus da doença de Newcastle a partir da análise dos dados de sensibilidade e especificidade pela planilha TG-ROC.



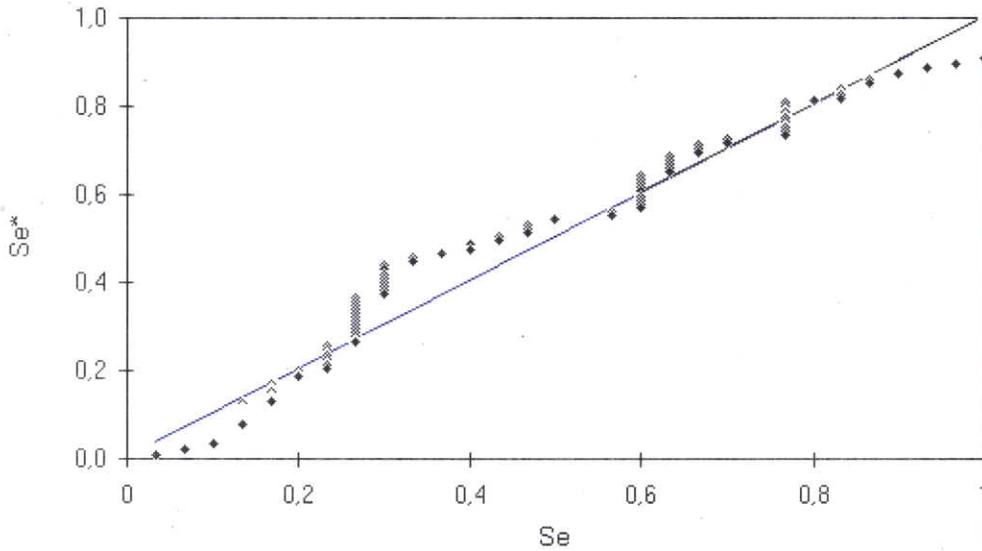
Legenda: Ef – eficiência; J – índice de Youden

Gráfico 6. Avaliação do ponto de corte quanto a eficiência do teste e índice de Youden obtidos pela planilha TG-ROG aplicada ao ELISA indireto para detecção de IgG de codorna contra o vírus da doença de Newcastle.



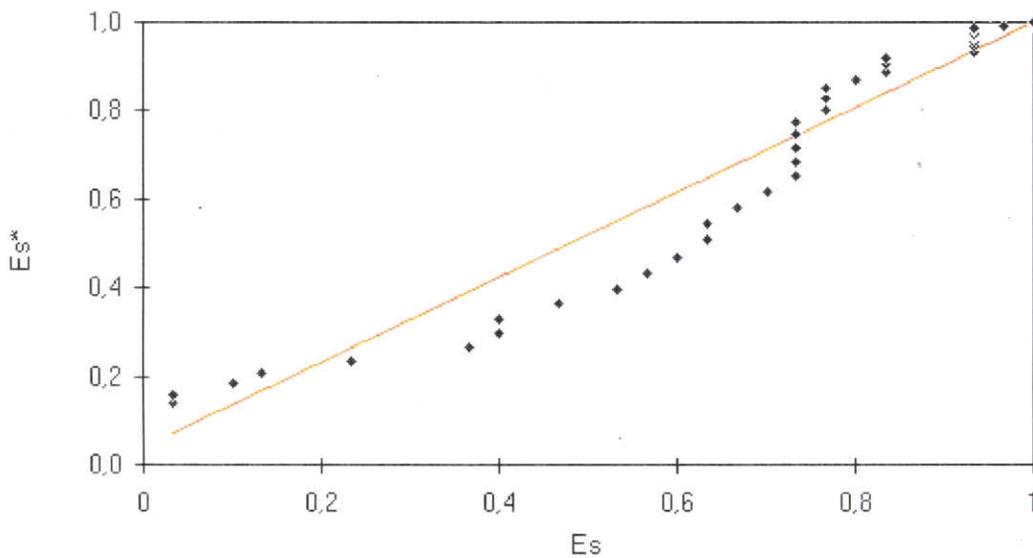
Legenda: Se – sensibilidade; Es – especificidade; See – sensibilidade esperada; Ese – especificidade esperada

Gráfico 7. Correlação entre os dados obtidos de sensibilidade e especificidade e esperados do ELISA indireto para detecção de IgG de codorna contra o vírus da doença de Newcastle, estabelecidos pela planilha TG-ROC.



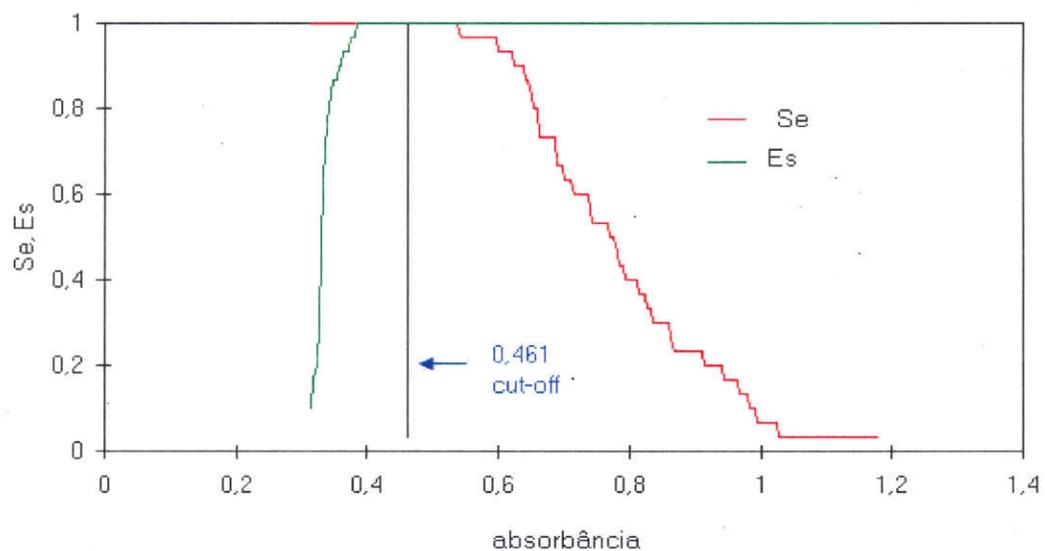
Legenda: Se – sensibilidade obtida; Se\* – sensibilidade esperada

Gráfico 8. Gráfico comparativo da dispersão dos dados obtidos pelo ELISA indireto para detecção de IgG de codorna contra o vírus da doença de Newcastle e esperados de sensibilidade estabelecidos pela planilha TG-ROC.



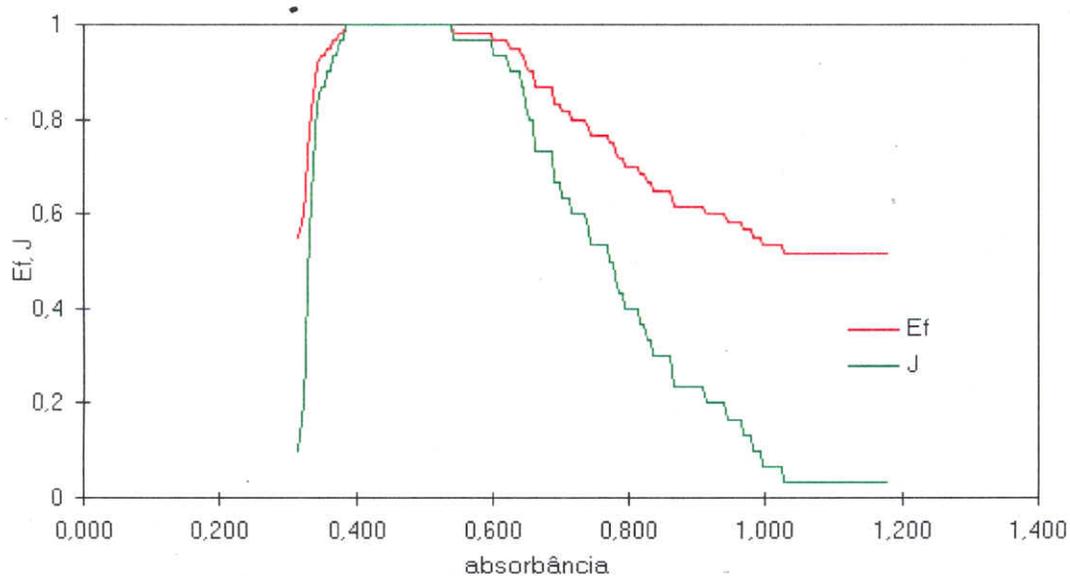
Legenda: Es – especificidade obtida; Es\* – especificidade esperada

Gráfico 9. Gráfico comparativo da dispersão dos dados obtidos pelo ELISA indireto para detecção de IgG de codorna contra o vírus da doença de Newcastle e esperados de especificidade estabelecidos pela planilha TG-ROC.



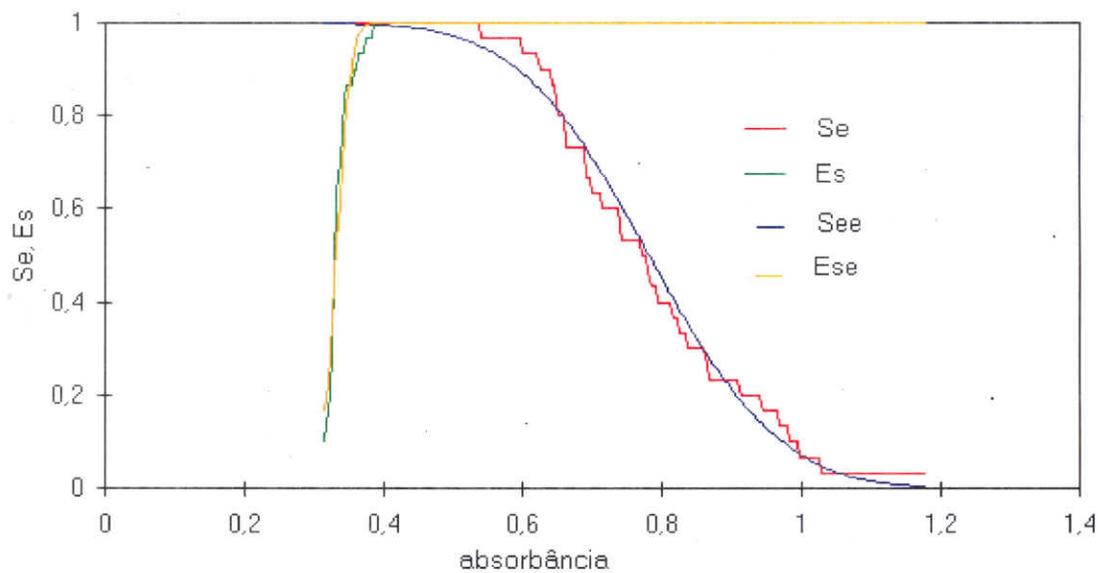
Legenda: Se – sensibilidade; Es – especificidade; cut-off – ponto de corte

Gráfico 10. Padronização do ponto de corte do ELISA indireto para detecção de IgG de codorna contra o vírus da doença de Newcastle utilizando conjugado anti-IgG de galinha a partir da análise dos dados de sensibilidade e especificidade pela planilha TG-ROC.



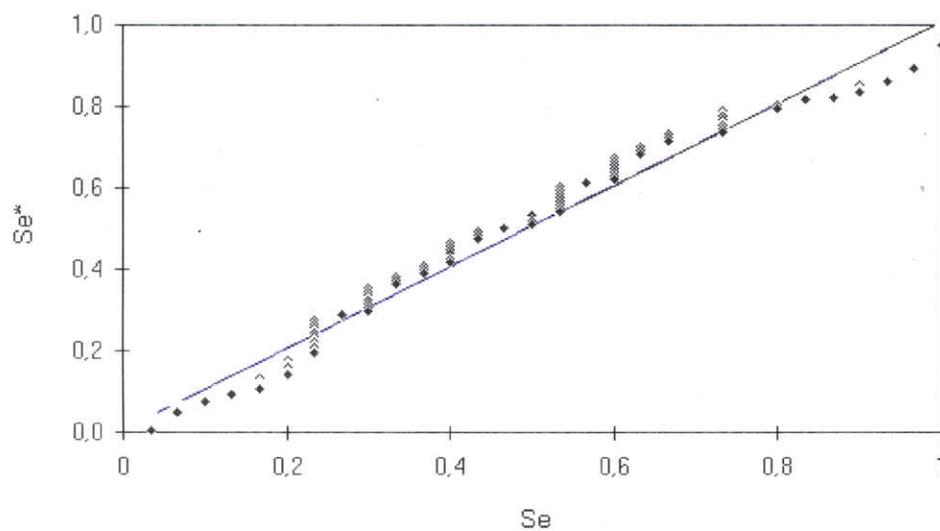
Legenda: Ef – eficiência; J – índice de Youden

Gráfico 11. Avaliação do ponto de corte quanto à eficiência do teste e índice de Youden obtidos através da planilha TG-ROC para o ELISA indireto para detecção de IgG de codorna contra o vírus da doença de Newcastle utilizando conjugado anti-IgG de galinha.



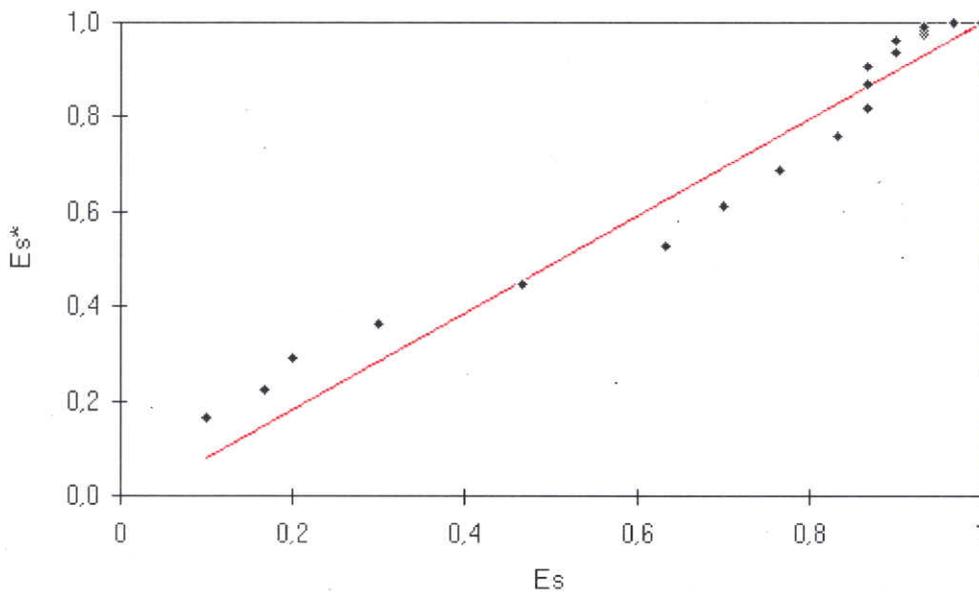
Legenda: Se – sensibilidade; Es – especificidade; See – sensibilidade esperada; Ese – especificidade esperada

Gráfico 12. Correlação entre os dados obtidos pelo ELISA indireto para detecção de IgG de codorna contra o vírus da doença de Newcastle utilizando conjugado anti-IgG de galinha de sensibilidade e especificidade e esperados estabelecidos pela planilha TG-ROC.



Legenda: Se – sensibilidade obtida; Se\* – sensibilidade esperada

Gráfico 13. Gráfico comparativo da dispersão dos dados obtidos pelo ELISA indireto para detecção de IgG de codorna contra o vírus da doença de Newcastle utilizando conjugado anti-IgG de galinha e esperados de sensibilidade estabelecidos pela planilha TG-ROC.



Legenda: Es – especificidade obtida; Es\* – especificidade esperada

Gráfico 14. Gráfico comparativo da dispersão dos dados obtidos pelo ELISA indireto para detecção de IgG de codorna contra o vírus da doença de Newcastle utilizando conjugado anti-IgG de galinha e esperados de especificidade estabelecidos pela planilha TG-ROC.

## 6. CONCLUSÕES

Os métodos de purificação de imunoglobulina G (IgG) do soro e da gema de ovos de codorna se mostraram eficientes, mesmo tendo sido adaptados a partir de protocolo inicial para galinha. A quantidade de proteína total purificada da gema de ovos de codorna foi maior do que a de soro, entretanto, foi menos pura, apresentando contaminação por ovoalbumina.

Nas etapas iniciais deste trabalho, as IgGs de codorna e de galinha foram reconhecidas em *western blot* por IgG de camundongo anti-IgG de codorna. Os resultados obtidos em ELISA mostraram que a reatividade específica (anti-espécie) é maior do que a reação cruzada (heteróloga).

A vacinação das codornas somente com vacina viva contra o vírus da doença de Newcastle, via ocular, não se mostrou adequada para a produção de soros hiperimunes. O método mais adequado foi o de vacinação via ocular com vacina viva

seguida de inoculações intra-musculares com vírus inativado. Usando este método, a vacina contra o vírus da doença de Newcastle é tão eficiente na produção de IgG em codornas quanto em galinhas.

Desde que padronizados com soros positivos e negativos de codornas, previamente avaliados por inibição da hemaglutinação (IH), os resultados de especificidade e sensibilidade dos dois testes de ELISA avaliados (“ELISA indireto para codorna” e “ELISA indireto para galinha”) foram semelhantes entre si e coincidentes com a técnica de IH, usada como técnica de referência.

O ponto de corte encontrado para “ELISA indireto para galinha”, quando aplicado ao “ELISA indireto para codorna”, e vice versa, mostra o aparecimento de soros falso-positivos e falso-negativos, respectivamente. Considerando que atualmente, nos laboratórios de diagnóstico, a sorologia por ELISA para codornas é feita utilizando ELISA específico para galinhas, estes dados questionam a validade do uso

de um "ELISA indireto para galinha" padronizado e destinado para uso com soros de galinha, no diagnóstico de soros de codornas.

## 7. BIBLIOGRAFIA

ABBASSI, P.H.; TOQUIN, D.; GUITTET, M.; RIVALLAN, G.; COTTE, J.P.; ETERRADOSSI, N. Comparaison de trois méthodes d'extraction des immunoglobulines vitellines: application à l'extraction d'anticorps neutralisant le virus de la bursite infectieuse. *Recueil de Médecine Vétérinaire*, n.3/4, p.107-117, Avril, 1999.

ADAIR, B.M.; McNULTY, B.M.; TODD, D.; CONNOR, T.J.; BURNS, K. Quantitative estimation of Newcastle disease virus antibody levels in chickens and turkeys by ELISA. *Avian Pathology*, v.18, n.1, p.175-192, 1989.

AKITA, E.M.; NAKAI, S. Immunoglobulins from egg yolk: isolation and purification. *Journal of food and science*, v.57, n.3, p.629-634, 1992.

ALEXANDER, D.J. Avian Paramyxoviridae – recent developments. *Veterinary Microbiology*, v.23, p.103-114, 1990.

ALEXANDER, D.J. Newcastle Disease and other avian *Paramyxoviridae* infections. In: CALNEK, B. W. (Eds.). *Diseases of Poultry*. 10. Ames: Iowa State University Press, p.541-570, 1997.

ALEXANDER, D.J. Newcastle Disease, other avian *Paramyxoviruses*, and pneumovirus infections. In: SAIF, Y.M. (Ed.). *Diseases of Poultry*. 11. Ames: Iowa State University Press, p.63-100, 2003.

ALFENAS, A.C. (Ed). Eletroforese de isoenzimas e proteínas afins: fundamentos e aplicações em plantas e microrganismos. Viçosa: Editora UFV, 1998.

BARRAL, A.D. *Manual de la codorniz: cría industrial y para la caza*. Madrid: Dilagro, 1994. 268p.

BEARD, C.W. Serologic procedures. In: HITCHNER, S.B. (Ed.). *Isolation and identification of avian pathogens*. 2.ed. Texas: Creative Printing Company, 1980. p.129-135.

BHANUSHALI, J.K.; GILBERT, J.M.; McDOUGALD, L.R. Simple method to purify chicken immunoglobulin G. *Poultry Science*, v.73, n.7-9, 1994.

BIZHANOV, G.; VYSHNIAUSKIS, G. A comparison of three methods for extracting IgY from the egg yolk of hens immunized with Sendai virus. *Veterinary Research Communications*, v.24, p.103-113, 2000.

BOZORGHMEHRIFARD, M.H.; MAYAHI, M. Comparison of enzyme linked-immunosorbent assay and haemagglutination inhibition test for the detection of antibodies against Newcastle disease vaccine in broiler chicks. *Indian Journal of Animal Sciences*, v.70, n.1, p.39-40, Jan, 2000.

BROWN, J.; RESURRECCION, R.S.; DICKSON, T.G. The relationship between the hemagglutination-inhibition test and the enzyme linked immunosorbent assay for the detection of antibody to Newcastle Disease. *Avian Diseases*, v.34, n.3, p.585-587, 1990.

CHEW-LIM, M. Adult coturnix quail bronchitis. *Avian Diseases*, v.24, n.2, p.520-526, 1979.

CHICKEN antibody preparation, purification and testing [200-]. Disponível em: <<http://www.igtech.it/services/tech-notes/tech-notes.htm>>. Acessado em 18/02/03.

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

DAS, B.B.; PRADHAN, H.K. Outbreaks of egg drop syndrome due to EDS-76 virus in quail (*Coturnix coturnix japonica*). *Veterinary Record*, v.131, p. 264-265, 1992.

- DAS, S.; SHARMA, K.; SARMAH, D.K.; KALITA, N. Correlation of HI and ELISA tests for detection of Newcastle disease virus antibodies. *Indian Journal of Animal Sciences*, v.67, n.4, p.286-287, 1997.
- EASTERDAY, B. C., HINSHAW, V. S., HALVORSON, D. A. Influenza. In: CALNEK, B. W. (Ed.). *Diseases of Poultry*. 10. Ames: Iowa State University Press, p. 583-606, 1997.
- FOLGUERAS, A.V. *Desenvolvimento e padronização de teste imunoenzimático (ELISA) para a detecção de anticorpos contra o herpes vírus bovino*. 1998. 70f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Instituto de Ciências Biológicas, UFMG, Belo Horizonte.
- 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.
- FUJIKURA, W.S. Situação e perspectivas da coturnicultura no Brasil. In: *Simpósio Internacional de Coturnicultura*, 1., 2002, Lavras. Anais. Lavras: SUPREMA, p1-10, 2002.
- GALVÁN, G. Relación entre título de inhibición de la hemoaglutinación y protección contra la enfermedad de Newcastle. *Veterinaria Mexicana*. N.7, 1976.
- GAMA, N.M.S.Q. Biosseguridade em granjas de codornas. In: *Simpósio Internacional de Coturnicultura*, 1., 2002, Lavras. Anais. Lavras: SUPREMA, p37-48, 2002.
- GREINER, M. Two-graph receiver operating characteristic (TG-ROC): a Microsoft-EXCEL template for the selection of cut-off values in diagnostic tests. *Journal of immunological methods*. n.185, p.145-146, 1995.
- HARLOW, E. & LANE, D. *Antibodies: a laboratory manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1988.
- HUDSON, L.; HAY, F. *Practical Immunology*. 3.ed. Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1989. 507p.
- IBGE. Banco de dados agregados (2001). Disponível em: <<http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/pecua/default.asp>>. Acessado em: 18/11/2003.
- ISLAM, M.A.; ITO, T.; TAKAKUWA, H.; TAKADA, A.; ITAKURA, C.; KIDA, H. Acquisition of pathogenicity of a Newcastle disease virus isolated from a Japanese quail by intracerebral passage in chickens. *Japanese Journal of Veterinary Research*, v.42, n.3-4, p.147-156, 1994.
- JACK, S.W.; REED, W.M.; BURNSTEIN, T. The pathogenesis of quail bronchitis. *Avian Diseases*, v.38, p.548-556, 1994.
- JEURISSEN, S.H.M.; BOONSTRA-BLOM, A.G.; AL-GARIB, S.O.; HARTOG, L.; KOCH, G. Defence mechanisms against viral infection in poultry: a review. *Veterinary Quartely*, v.22, p.204-208, 2000.
- JEURISSEN, S.H.M.; JANSE, E.M. The use of chicken-specific antibodies in veterinary research involving three other avian species. *The Veterinary Quartely*, v.20, n.4, p.140-143, 1998.
- JORGE, M.A.; TSUHAKO, M.H.; SILVA, E.N.; HIPÓLITO, O. Diagnóstico sorológico do *Mycoplasma gallisepticum* com eluídos de sangue absorvido e seco em papel filtro. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.38, n.3, p.309-321, 1986.
- KECK, L.D.; SKEELES, J.K.; McNEW, R.W. Antibody detection in matched chicken sera and egg-yolk samples by commercial enzyme-linked immunosorbent assay kits for Newcastle disease virus, Infectious Bronchitis virus, Infectious Bursal disease virus and Avian Reovirus. *Avian Diseases*, v.37, p.825-828, 1993.
- KUMANAN, K.; THYAGARAJAN, D.; PALANISWAMY, K.S.; SUNDARARASU, V.; VENKATESAN, R.A. Ranikhet disease vaccination programmes for Japanese quails. *Indian Journal of Animal Sciences*, v.60, n.8, p.921-923, 1990.

- LARSSON, A.; BALOW, R.-M.; LINDAHL, T.L.; FORSBERG, P.-O. Chicken antibodies: taking advantage of evolution – a review. *Poultry Science*, v.72, p.1807-1812, 1993.
- LEVINE, P.P. World dissemination of Newcastle Disease. In: HANSON, R.P. (Ed.). *Newcastle disease virus*. Madison: The University of Wisconsin Press, 1964. p.65-70.
- LIMA, F.S. *Estudo de parâmetros clínicos, zootécnicos e imunitários da vacinação contra a moléstia de Newcastle em codornas (Coturnix coturnix japonica). Pesquisa do estado de portador do vírus e sua importância epidemiológica*. 2001. 84f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária, Patologia Animal) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Unesp, Jaboticabal.
- LÓPEZ, J.E. Importancia de las aves silvestres en la transmisión de la enfermedad de Newcastle. *Veterinaria Mexicana*, n.7, p.37-40, 1976.
- LOSONCZY, S.; SZABÓ, C.; KISS, Z.; BÁRDOS, L. Application of an anti – HQIgY antibody for the measurement of IgY concentrations of hen's and quail's serum and yolk. *Acta Physiologica Hungarica*, v.86, n.3-4, p.253-258, 1999.
- LÚCIO, B. Panorama de la enfermedad de Newcastle en México. *Veterinaria Mexicana*, n.7, p.30-34, 1976a.
- LÚCIO, B. Resolución del comité nombrado para estandarizar la técnica de titulación de la vacuna contra la enfermedad de Newcastle. *Veterinaria Mexicana*, n.7, p.66-69, 1976b.
- LUKERT, P.D.; SAIF, Y.M. Infectious bursal disease. In: CALNEK, B. W. (Ed.). *Diseases of Poultry*. 10. Ames: Iowa State University Press, p. 721-738, 1997.
- MAKKAY, A.; KRELL, P.J.; NAGY, E. Antibody detection-based differential ELISA for NDV-infected or vaccinated chickens versus NDV HN-subunit vaccinated chickens. *Veterinary Microbiology*, v.66, p.209-222, 1999.
- MARQUARDT, W.W.; SNYDER, D.B.; SAVAGE, P.K.; KADAVIL, S.K.; YANCEY, F.S. Antibody response to Newcastle disease virus given by two different routes as measured by ELISA and hemagglutination-inhibition test and associated tracheal immunity. *Avian Diseases*, v.29, n.1, p.71-79, 1985.
- MARTINS, N.R.S.; RESENDE, J.S.; JORGE, M.A. Adenoviroses, reoviroses e Rotaviroses. In: BERCHIERI JUNIOR, A.; MACARI, M. (Eds.). *Doenças das aves*. Campinas: FACTA, p.315-325, 2000.
- 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.1112-1125, 1994.
- MILLS, A.D.; CRAWFORD, L.L.; DOMJAN, M.; FAURE, J.M. The behavior of the japanese or domestic quail *Coturnix japonica*. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, v.21, n.3, p.261-281, 1997.
- OIE. Newcastle disease (2002). Disponível em: <<http://www.oie.int/eng/maladies/fiches/a160.htm>>. Acessado em: 16/11/03.
- OLIVEIRA, B.L. Manejo racional e produtividade das codornas (*Coturnix coturnix japonica*). In: *Simpósio Internacional de Coturnicultura*, 1., 2002, Lavras. Anais. Lavras: SUPREMA, p77-84, 2002.
- OTANI, H.; MATSUMOTO, K.; HIRAO, M. Antigenic reactivity of the egg yolk antibody in the japanese quail towards the anti-chicken IgG antibody. *Animal Science Technology (Japanese)*, v.64, n.1, p.28-31, 1993.
- PAULILLO, A.C.; DORETTO JUNIOR, L. Doença de Newcastle. In: BERCHIERI JUNIOR, A.; MACARI, M. (Eds.). *Doenças das aves*. Campinas: FACTA, 2000. p.267-281.

- REED, W.M.; JACK, S.W. Quail bronchitis. In: SAIF, Y.M. (Ed.). *Diseases of Poultry*. 11. Ames: Iowa State University Press, p.248-251, 2003.
- REYNOLDS, D.L.; MARAGA, A.D. A rapid virus neutralization assay for Newcastle disease virus with the swine testicular continuous cell line. *Avian Diseases*, v.43, p.564-571, 1999.
- RIVETZ, B.; WEISMAN, M.; RITTERBAND, FISH, F.; HERZBERG, M. Evaluation of a novel rapid kit for the visual detection of Newcastle disease virus antibodies. *Avian Diseases*, v.29, n.4, p.929-942, 1985.
- ROSALES, A.G. Monitoria sorológica em aves. In: Conferência APINCO'99 de Ciência e tecnologia Avícolas, 1999, Campinas. *Anais*. Campinas: FACTA, 1999, p.47-51.
- SAHLE, M; BURGESS, G.W. Development of solid phase antigen for indirect ELISA for the detection of specific antibody responses to infection with Newcastle disease virus. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research*, v.69, p.237-242, 2002.
- SANTOS, C.H.C.; SILVA, E.N. Métodos de diagnósticos laboratoriais microbiológicos e sorológicos. In: BERCHIERI JUNIOR, A.; MACARI, M. (Eds.). *Doenças das aves*. Campinas: FACTA, p.171-182, 2000.
- SHIVAPRASAD, H.L. Pullorum disease and fowl typhoid. In: CALNEK, B. W. (Ed.). *Diseases of Poultry*. 10. Ames: Iowa State University Press, p. 82-96, 1997.
- SILIM, A.; VENNE, D. Comparison of egg-yolk and serum antibody titers to four avian viruses by enzyme linked immunosorbent assay using paired field samples. *Avian Diseases*, v.33, p.643-648, 1989.
- SNYDER, D.B.; MARQUARDT, W.W.; MALLINSON, E.T.; RUSSEK, E. Rapid serological profiling by Enzyme Linked Immunosorbent Assay. I. Measurement of antibody activity titer against Newcastle disease virus in a single serum dilution. *Avian Diseases*, v.27, n.1, p.161-170, 1983.
- SOUZA, C.M. *Produção de anticorpos monoclonais contra os componentes conservados do vírus da bronquite infecciosa das galinhas*. 2000. 40f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária, Medicina Veterinária Preventiva) - Escola de Veterinária, UFMG, Belo Horizonte.
- SOUZA, M.B. *Afinidades antigênicas de amostras de campo do vírus da bronquite infecciosa das galinhas com a amostra Massachusetts M41*. 1999. 75f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária, Medicina Veterinária Preventiva) - Escola de Veterinária, UFMG, Belo Horizonte.
- TINI, M.; JEWELL, U.R.; CAMENISCH, G.; CHILOV, D.; GASSMANN, M. Generation and application of chicken egg-yolk antibodies. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A*, n.131, p.569-574, 2002.
- VELAN, A.S.; ALBERT, A.; KUMANAN, K.; VENKATESAN, R.A. Comparative adaptability of Newcastle disease virus isolated from quails in cell culture systems. *Indian Veterinary Journal*, v.72, Oct., p.1019-1022, 1995.
- VILLEGAS, P.; PURCHASE, G. Titration of biological suspensions. In: HITCHNER, S.B. (Ed.). *Isolation and identification of avian pathogens*. 2ed. Texas: Creative Printing Company, 1980. p.124-128.
- WATERSON, A.P. The morphology and composition of Newcastle disease virus. In: HANSON, R.P. (Ed.). *Newcastle disease virus*. Madison: The University of Wisconsin Press, 1964. p.119-132.
- WEISMAN, J.; HITCHNER, S.B. Infectious bursal disease virus: infection attempts in turkeys and coturnix quail. *Avian Diseases*, v.22, n.4, p.604-609, 1978.
- WESTERMEIER, R. (ed.). *Electrophoresis in Practice*. Weinheim: VCH, 1993. 277p.

WILLIAMS, R.; BOSHOF, 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,  
p.864-869, 1997.

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*,  
v.208, p.61-64, 1997.

## 8. APÊNDICES

### 8.1. APS - Persulfato de amônio a 10%

Persulfato de amônio	100 mg
Água MilliQ 18MΩ	1,0 mL
Estocar a 4°C	

### 8.2. Solução de EDTA (etileno diamino tetra-acetato) 0,5M

EDTA (etileno diamino tetra-acetato).2H <sub>2</sub> O	18,6g
Água MilliQ 18,2MΩcm	100mL

Adicionar aproximadamente 50mL de água ao EDTA; ajustar o pH para 8,0 com auxílio de NaOH, para que o EDTA possa dissolver; completar o volume para 100mL.

### 8.3. Solução de tampão NET pH 7,4

NaCl (100mM)	5,85g/L
EDTA (1mM)	0,2922 g/L
Tris-HCl (10mM)	1,576g/L
Esterilizar por autoclave.	

### 8.4. Solução PBS 10X

NaCl (Cloreto de sódio)	80g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (Fosfato de potássio monobásico)	2g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·12H <sub>2</sub> O (Fosfato de sódio bibásico dodecahidratado)	29g
KCl (Cloreto de potássio)	2g
Água MilliQ 18,2MΩcm	1000mL
Esterilizar por autoclave.	

### 8.5. PBS Tween 20 (PBS-T)

PBS 10X	200mL
Tween 20	1mL
Água MilliQ 18,2MΩcm	2000mL

### 8.6. Solução de PMSF (Fluoreto de Fenil Metil Sulfonil) 0,2M

PMSF	3,5g
Etanol	3,5mL

### 8.7. Preparo do Gel de aplicação 4,0%

Água MilliQ 18,2MΩcm	6,4mL
Solução estoque de acrilamida 40% (apêndice 8.12)	1,0mL
Tampão do gel de aplicação 4x (apêndice 8.27)	2,5mL
APS (Persulfato de amônio) 10% (apêndice 8.1)	100μL
TEMED (N, N, N', N'-tetrametil etilenodiamino)	10μL

### 8.8. Preparo do gel de corrida 10%

Água MilliQ 18,2MΩcm	4,9mL
Solução estoque de acrilamida 40% (apêndice 8.12)	2,5mL
Tampão do gel de corrida 4x (apêndice 8.25)	2,5mL
APS (Persulfato de amônio) 10% (apêndice 8.1)	100μL
TEMED (N, N, N', N'-tetrametil etilenodiamino)	10μL

### 8.9. SDS 10%

SDS (Dodecil sulfato de sódio)	5 g
Água MilliQ 18MΩcm	5 mL

### 8.10. Solução corante para proteínas (Coomassie)

Brilhant Blue R-250	1g
Água MilliQ 18,2MΩcm	1000mL

**8.11. Solução descorante ácido acético**

Ácido acético	70mL
Água MilliQ 18,2MΩcm	1000mL

**8.12. Solução estoque de acrilamida T%40 e C%2,67**

Acrilamida	40,0 g
Bis acrilamida	1,1 g
Água MilliQ 18,2MΩcm	100 mL

Preparar esta solução utilizando luvas e máscaras, pois trata-se de uma substância neurotóxica. Coar em papel de filtro Whatman e filtrar em membrana de 0,22µm.

**8.13. Solução estoque para gradiente de sacarose 66%**

Sacarose	171g
NET estéril (apêndice 8.3)	90mL

**8.14. Solução NaOH 3N**

NaOH (Hidróxido de sódio)	30g
Água MilliQ 18,2MΩcm	250mL

**8.15. Solução saturada de sulfato de amônio**

Sulfato de amônio	200g
Água ultrapura	200mL
NaHPO <sub>4</sub> 12H <sub>2</sub> O	6,056g
Estabilizar em pH neutro 7,0	

**8.16. Substrato**

Tampão Dietanolamina pH 9,8 (apêndice 8.26)	20mL
Pastilha 20mg de pNPP (p-Nitrophenyl phosphate, N2765, Sigma, EUA)	1 unidade

Tris_Base amino metano	
Tris_HCl	0,3g
Água MilliQ 18,2MΩcm	7,5g

**8.18. Tampão 1M Tris\_HCl, pH 7,2**

Tris_Base amino metano	1,3g
Tris_HCl	14,0g
Água MilliQ 18,2MΩcm	100mL

**8.19. Tampão 1,5M Tris\_HCl, pH 8,8**

Tris_Base amino metano	15,2g
Tris_HCl	4,0g
Água MilliQ 18,2MΩcm	100mL

**8.20. Tampão AP**

100mM Tris HCl pH 9,5	10mL Tris HCl 1M
100mM NaCl	2mL NaCl 5M
5mM MgCl <sub>2</sub>	500µL MgCl <sub>2</sub> 1M
Água MilliQ 18,2MΩcm	87,50mL

**8.21. Tampão Carbonato/bicarbonato pH 9,6**

SOLUÇÃO ESTOQUE A	
NaCO <sub>3</sub> (Carbonato de sódio anidro)	21,2g
Água MilliQ 18,2MΩcm	1000mL
Armazenar em geladeira	

SOLUÇÃO ESTOQUE B	
NaHCO <sub>3</sub> (Bicarbonato de sódio)	16,8g
Água MilliQ 18,2MΩcm	1000mL
Armazenar em geladeira	

Misturar  
Solução estoque A 16mL  
Solução estoque B 34mL  
Armazenar em geladeira

#### 8.22. Tampão de amostra 2x

Azul de bromofenol 1%  
(Dissolvido em etanol  
resfriado) 100 $\mu$ L  
0,5M Tris\_HCl pH 6,8  
(apêndice 8.17) 5mL  
Água MilliQ 18,2M $\Omega$ .cm 3mL  
SDS (Dodecil sulfato de sódio)  
10% (apêndice 8.9) 2,0mL  
Armazenar em temperatura ambiente

#### 8.23. Tampão de bloqueio de leite em pó desnatado 3%

Leite em pó desnatado 3g  
PBS Tween 20 (apêndice 8.5) 100mL

#### 8.24. Tampão de corrida 5x

Tris\_Base (tris hidrometil  
amino metano) 15,0g  
Glicina livre de protease 72,0g  
SDS (Dodecil sulfato de sódio)  
livre de protease 5,0g  
Água MilliQ 18,2M $\Omega$ cm 1,0L

#### 8.25. Tampão de transferência

Tris Base 5,82g  
Glicina livre de protease 2,93g  
SDS (Dodecil sulfato de sódio)  
10% (apêndice 8.9) 3,75mL  
Metanol 200mL  
Água MilliQ 18,2M $\Omega$ cm <sub>qsp</sub> 1000mL  
Adicionar HCl fumegante para ajustar o pH  
para 9,8. Armazenar em geladeira  
protegido da luz.

#### 8.26. Tampão Dietanolamina

Dietanolamina 97mL  
NaN<sub>3</sub> (azida sódica) 0,2g  
MgCl<sub>2</sub> 100mg

#### 8.27. Tampão do gel de corrida 4x

1,5M Tris\_HCl, pH 8,8 100mL  
(apêndice 8.19)  
SDS (Dodecil sulfato de sódio)  
livre de protease 0,4g