

FRANCISCA GRACION FREIRE GIRÃO

COMPARAÇÃO ENTRE OS MÉTODOS DE SORO-NEUTRALIZAÇÃO (SN), INIBIÇÃO DA HEMAGLUTINAÇÃO (IH) E IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA NA PESQUISA DE ANTICORPOS NO SORO SANGUÍNEO E GEMA DE OVOS DE GALINHAS VACINADAS CONTRA A DOENÇA DE NEWCASTLE (AMOSTRA LASOTA)

Tese apresentada ao Departamento de MEDICINA VETERINÁRIA PREVENTIVA da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais, como exigência regulamentar para obtenção do grau de MESTRE EM MEDICINA VETERINÁRIA

Belo Horizonte  
Minas Gerais - Brasil  
1976

Aprovada em 22 / 03 / 76

*P. C. Brant*

---

Prof. Paulo Caldeira Brant  
- Orientador -

*Ronaldos R-*

---

Prof. Ronaldo Reis

*Elvio Carlos Moreira*

---

Prof. Elvio Carlos Moreira

## AGRADECIMENTOS

A autora deseja expressar seus agradecimentos às seguintes pessoas e instituições:

À Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais, pela amável acolhida;

Ao Hilton pelo encorajamento;

Ao Prof. Regino Leonardo de Oliveira, pelo estímulo, colaboração e amizade e ao Prof. Paulo Caldeira Brant, pela orientação;

Ao funcionário Ismael Faustino, pela ajuda;

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq, pelo suporte financeiro indispensável;

À Somai S/A, pelo indispensável auxílio financeiro;

Aos colegas do curso de Pós-Graduação, pelo convívio sadio e a todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização do presente trabalho.

## RESUMO

Fez-se um estudo objetivando comparar os títulos de anticorpos através das técnicas de soro-neutralização, inibição da hemaglutinação e imunofluorescência indireta em soro e gema oriundos de galinhas vacinadas contra a doença de Newcastle. O método que ofereceu títulos mais baixos e também mais uniformes foi o da inibição da hemaglutinação, tanto nos soros como nas gemas. Pelo teste de imunofluorescência indireta obtiveram-se títulos superiores aos da inibição da hemaglutinação e equivalentes aos da soro-neutralização.

## ÍNDICE

	Página
1. INTRODUÇÃO .....	1
2. LITERATURA .....	3
3. MATERIAL E MÉTODOS .....	7
3.1. Animais .....	7
3.2. Tratamento da gema .....	7
3.3. Colheita do soro .....	8
3.4. Esquema de trabalho .....	8
3.5. Sorologia .....	9
4. RESULTADOS .....	12
5. DISCUSSÃO .....	21
6. CONCLUSÕES .....	24
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	25

## 1. INTRODUÇÃO

A doença de Newcastle ainda se constitui numa séria ameaça para a avicultura justificando, dessa forma, o grande número de pesquisas a que vem sendo submetida nos seus mais diferentes aspectos principalmente com relação a imunidade pós-vacinal.

Rotineiramente, o teste de inibição da hemaglutinação, por ser mais rápido e de execução simples, é utilizado para investigar a resposta do animal à exposição ao vírus. A técnica de inibição da hemaglutinação é baseada na propriedade que tem o vírus da doença de aglutinar eritrócitos de várias espécies animais, inclusive das aves, além de ser essa reação inibida especificamente pelo soro de aves imunes (BURNET, 1942 e LUSH, 1943). Não só o soro, mas também a gema dos ovos de galinhas imunes apresentam anticorpos. A transferência desses anticorpos para a gema se dá através da circulação materna (ROSSI et alii, 1966) e foi estudada inicialmente por BRANDLY et alii (1946).

A técnica de soro-neutralização tem sido pouco usada pelo fato de ser demorada e onerosa. Baseia-se na propriedade dos anticorpos de se combinarem com o vírus e, quando em proporções corretas, de neutralizá-los, tornando-o não infeccioso. Para RUBIN & FRANKLIN (1957), o vírus da doença de Newcastle é neutralizado pelo soro imune em relação exponencial, ne

cessitando de uma molécula de anticorpo para inativar cada molécula do vírus.

A técnica de imunofluorescência indireta vem sendo utilizada atualmente com a finalidade de titular anticorpos. Testes comparativos entre a soro-neutralização e a imunofluorescência indireta feitos por AULISIO & SHELOKOV (1967) e CANCELLOTTI et alii (1972), utilizando soros positivos respectivamente para a doença de Gumboro e Sarcoma de Roux, demonstraram maior sensibilidade da imunofluorescência indireta, em contraposição à soro-neutralização.

O objetivo deste trabalho foi comparar as técnicas de soro-neutralização, inibição da hemaglutinação e imunofluorescência indireta para medir a taxa de anticorpo pós-vacinal no soro sanguíneo e na gema de ovos de galinhas vacinadas. Além disto, tentou-se correlacionar os títulos de anticorpos obtidos através dessas técnicas com o grau de imunidade, bem como averiguar a aplicabilidade do método de imunofluorescência indireta para soro e gema.

## 2. LITERATURA

BRANDLY et alii (1946) titularam anticorpos no soro sangüíneo e gema de aves vacinadas com vacina morta utilizando as técnicas de inibição da hemaglutinação e soro-neutralização. Verificaram que os dois métodos deram reação positiva com o soro e gema aos sete e dez dias, respectivamente, após a vacinação. Os títulos obtidos pela soro-neutralização foram sempre mais elevados, mas se mantiveram proporcionais aos resultados da prova de inibição da hemaglutinação. Os títulos encontrados nas gemas, com raras exceções, mostraram-se de dez a cem vezes mais baixos do que os do soro.

BEACH (1948), utilizando 173 amostras de soros oriundos de frangos sabidamente imunes à doença de Newcastle, notou que soros com o mesmo título, quando testados pela técnica de soro-neutralização, apresentavam títulos variáveis pela técnica de inibição da hemaglutinação.

OSTEEN & ANDERSEN (1948), examinando 203 amostras de soros pelas técnicas de inibição da hemaglutinação e soro-neutralização, encontraram os seguintes resultados: (1) 51% foram positivas em ambas as técnicas; (2) 42% foram negativas pelos dois métodos; (3) 1% reagiu negativamente à técnica de inibição da hemaglutinação e positivamente à de soro-neutralização; (4) 1,5% apresentaram-se positivos para inibição da hemaglutinação e negativos para soro-neutralização; (5) 4,5% dos



casos deram resultados insatisfatórios ao teste de inibição da hemaglutinação, sendo que, no teste de soro-neutralização, 80% destes foram negativos e 20% positivos. Segundo os autores, os anticorpos inibidores da hemaglutinação aparecem antes dos anticorpos neutralizantes. O título mais alto obtido pela técnica de inibição da hemaglutinação foi de  $10^2$ , enquanto que pela soro-neutralização a maioria das amostras apresentou título de  $10^5$ .

FABRICANT (1949) comparou os resultados dos testes de soro-neutralização e inibição da hemaglutinação em 56 amostras de soro de aves de granjas e 24 amostras de soro de aves criadas em laboratório. Os resultados mostram que, tanto em condições de campo como de laboratório, as duas técnicas mostraram-se eficientes, havendo concordância nos achados, embora os títulos obtidos através da soro-neutralização fossem sempre mais elevados. O autor sugere que o método de escolha para titulações de anticorpos seja o de inibição da hemaglutinação por ser mais rápido e fácil.

DOLL et alii (1950), trabalhando com diversas amostras de vírus e vários esquemas de vacinação, verificaram a possibilidade de estabelecer correlação entre os títulos obtidos nos testes de soro-neutralização e inibição da hemaglutinação. Salientam que, pela técnica de soro-neutralização, evidenciam-se anticorpos mais precocemente do que pela técnica de inibição da hemaglutinação. Neste trabalho os autores encontraram íntima correlação entre os títulos de anticorpos inibidores da hemaglutinação em soros e gemas provenientes de galinhas imunes à doença de Newcastle.

HANSON et alii (1950), usando galinhas imunizadas, compararam os títulos de anticorpos pelas técnicas de inibição da hemaglutinação e de soro-neutralização. Os resultados indicam que os anticorpos neutralizantes e inibidores da hemaglutinação aparecem simultaneamente, no soro, no 5º dia após a exposição ao vírus. Acrescente-se que o maior título não foi alcançado ao mesmo tempo, nas duas provas, mas houve concordância dos

resultados quando compararam positividade e negatividade.

LEVINE & FABRICANT (1950) realizaram um experimento usando galinhas vacinadas e galinhas recuperadas da doença de Newcastle. No mesmo estudo foram usados pintos nascidos destas aves, numa tentativa de correlacionar os títulos de anticorpos pelas técnicas de inibição da hemaglutinação e soro-neutralização. Os resultados mostraram-se correlatos nas duas provas, tanto nas galinhas como nos pintos, mas tal correlação foi relativa pois o título alto de anticorpos neutralizantes nem sempre correspondia ao elevado título de anticorpos inibidores da hemaglutinação.

Em galinhas clinicamente normais com relação à doença de Newcastle e em aves vacinadas, SCHMITTLE (1950) comparou o título de anticorpos inibidores da hemaglutinação em amostras de soro e gema ficando demonstrado uma estreita concordância entre os títulos obtidos em ambos. O autor sugere a substituição do soro pela gema, em matrizes e aves de postura comerciais, como material de escolha para o teste por ser mais fácil a colheita.

BORNSTEIN et alii (1952) vacinaram um grupo de galinhas e fizeram, durante um período de três meses, pesquisas de anticorpos pelo método de inibição da hemaglutinação em amostras de soro e de gema, verificando a existência de correlação dos títulos no soro e na gema, tanto em aves com o título alto como naquelas de títulos baixos. Em alguns casos, o título da gema apresentou-se mais elevado do que no soro o que, segundo os autores, poderia dever-se a contaminação da gema com a clara na hora da colheita.

Os títulos de anticorpos inibidores da hemaglutinação e neutralizantes foram medidos por MONTI (1954), em amostras de soro e de gema obtidos de galinhas vacinadas. Pela técnica de inibição da hemaglutinação, quando o soro apresentou título baixo (1:20/1:40), o mesmo na gema era negativo. Sempre que o título no soro era acima de 1:80, na gema era igual ou um pouco inferior. Com a técnica de soro-neutralização os resultados desse autor demonstram não existir concordância en

tre os títulos encontrados no soro e na gema, de vez que hou<sup>ve</sup>ram casos de títulos elevados no soro com ausência de títulos na gema. Ainda, segundo o autor, pintos provenientes de galinhas vacinadas com vacina atenuada não tem imunidade passiva, podendo, no entanto, apresentarem títulos de anticorpos inibidores da hemaglutinação mas sem capacidade de neutralizar o vírus, quando expostos.

MAGLIONE & DOTTA (1957), ao dosarem a taxa de anticorpos, utilizando as técnicas de inibição da hemaglutinação e soro-neutralização, em soros de galinhas imunizadas verificaram que, enquanto os anticorpos inibidores da hemaglutinação atingiram nível elevado (1:1000), os anticorpos neutralizantes apresentavam títulos baixos (1:10). Estas aves foram usadas para estudar imunidade congênita. O mesmo quadro foi encontrado nos descendentes até a idade de vinte dias.

WHEELOCK & TAMM (1959) demonstraram, através da técnica de imunofluorescência indireta, a presença de vírus da doença de Newcastle em cultura de células.

Utilizando o método de imunofluorescência indireta, HEUSCHELE & EASTERDAY (1970) obtiveram anticorpos nas células da traquéia de aves imunes para doença de Newcastle.

A técnica de imunofluorescência indireta foi comparada à de soro-neutralização na pesquisa de anticorpos contra o vírus do sarcoma de Roux, doença de Gumboro e encefalomielite respectivamente por AULISIO & SHELOKOV (1967), CANCELLOTTI et alii (1972) e CHOI & MIURA (1972), sendo que os dois primeiros a utilizaram também na gema.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. Animais

O grupo experimental foi composto de seis galinhas de seis meses de idade, criadas em gaiolas individuais e identificadas com os números de um a seis. Para a análise estatística, o grupo foi dividido em dois sub-grupos de três aves cada um. O primeiro grupo constituiu-se das aves numeradas de um a três (SG I) e o segundo grupo de quatro a seis (SG II). Fez-se uma titulação inicial de anticorpos pelas provas de inibição da hemaglutinação, soro-neutralização e imunofluorescência indireta.

#### 3.2. Tratamento da gema

Semanalmente, colhiam-se ovos de três das seis aves do grupo experimental (um ovo de cada uma das três, que compunham um sub-grupo). As gemas, antes de serem utilizadas, foram tratadas pelo dicloreto de etileno e éter, seguindo a técnica abaixo descrita por SCHMITTLE (1950): (1) após quebrar-se a casca e desprezar-se a clara, lava-se a gema três vezes com água destilada e duas com salina tamponada pH 7,2, estéreis; (2) com pipeta de dois ml, esterilizada, perfura-se a membrana da gema, da qual aspiram-se 1,5 ml que são colocados em tubo com pampa de rosca contendo seis ml de salina tamponada pH 7,2; (3) faz-se homogeneização por inclinação do tubo; (4) a

seguir, acrescentam-se dois ml de dicloreto de etileno<sup>1</sup> e um ml de éter e procede-se à homogeneização como na etapa anterior; (5) a mistura é colocada em banho-maria a 50°C, por quatro horas e, em seguida, em refrigeração a 4°C por um mínimo de oito horas. Neste trabalho, o período utilizado foi de 12 horas; (6) subseqüentemente, a mistura era centrifugada a 400 g (1.500 rpm), sob refrigeração a 15°C. Após isto, o material se apresentava separado em três camadas: a inferior, contendo dicloreto de etileno e éter; a intermediária, composta de gordura que formava um anel de separação entre as demais camadas e a superior, aquosa, contendo anticorpos. Esta camada apresentava uma diluição de gema 1:5 e foi utilizada em todos os testes.

### 3.3. Colheita de soro

Uma vez por semana, colhia-se sangue de três aves do grupo experimental (cinco ml de cada uma), através de punção da veia da asa.

### 3.4. Esquema de trabalho

3.4.1. Durante quatro semanas, antes da vacinação, fizeram-se titulações dos anticorpos no soro e gema pelas técnicas de inibição da hemaglutinação, soro-neutralização e imunofluorescência indireta, para verificar possíveis alterações nos títulos antes observados.

3.4.2. Após a colheita de sangue (quarta semana), as aves foram vacinadas, por via intramuscular, com 0,2 ml de vacina viva modificada (amostra La Sota comercial)<sup>2</sup> com o título hemaglutinante de 1:64 e a DL<sub>50</sub> de 10<sup>7,30</sup>. Preferiu-se a via intramuscular porque esta vacina, quando aplicada via nasal, sempre determina reação orgânica envolvendo o sistema respiratório.

---

1. E. Merck, Darmstadt Alemanha

2. Vacina Newcastle - Instituto Veterinário Rhodia-Merieux

3.4.3. Até a oitava semana após a vacinação, a taxa de anticorpos era medida a cada sete dias, quando as aves foram desafiadas com 0,5 ml de uma suspensão de vírus de rua amostra 733/EV-UFGM (OLIVEIRA, 1975) via intramuscular (BEARD & EASTERDAY, 1967a), contendo  $5 \times 10^8$   $DL_{50}$ .

3.4.4. As aves foram mantidas em observação durante quatro semanas após o desafio, procedendo-se, neste período, as titulações de anticorpos como nos períodos anteriores.

### 3.5. Sorologia

#### 3.5.1. Técnica de inibição da hemaglutinação (IH)

O método "alfa", segundo CUNNINGHAM (1956), foi utilizado em todos os testes. A amostra do vírus foi a mesma usada no desafio, sendo que o soro e a gema foram usados na diluição de 1:10. A quantidade de 0,2 ml de cada diluição do vírus foi misturada com igual quantidade de soro ou gema e deixados em repouso durante 30 minutos à temperatura ambiente, quando então eram colocados 0,2 ml de suspensão de hemácias a 0,5%, em salina. Após 30 a 40 minutos, ainda em temperatura ambiente, procedia-se a leitura. Prepararam-se tubos testemunhas do soro, gema, vírus e hemácias para cada material testado.

#### 3.5.2. Técnica de soro-neutralização (SN)

Soros e gemas foram submetidos ao método de soro-neutralização, descrito por CUNNINGHAM (1956). A mesma amostra velogênica do vírus foi usada para inoculação fazendo-se diluições decimais. Soros e gemas foram misturados na proporção de 1:2, com as várias diluições do vírus, deixando-se em repouso por 30 minutos à temperatura ambiente. Decorrido este tempo 0,1 ml do vírus e 0,2 ml da mistura (soro ou gema / vírus) foram inoculados na cavidade alantóide de ovos embrio

nados, com 10 dias de incubação, segundo a técnica descrita por GORHAM (1957).

Usaram-se seis ovos, provenientes de galinhas imunes, com título médio de anticorpos inibidores da hemaglutinação de  $10^3$ , para cada diluição. Um total de 160 ovos foram examinados durante o período. Os inoculados foram examinados 24 horas após e, a partir daí, a cada 24 horas, até o quinto dia. A mortalidade embrionária ocorrida nas primeiras 24 horas foi atribuída a causas inespecíficas, não sendo incluída na taxa de mortalidade final. O índice de neutralização de 50%, de todos os soros e gemas foi calculado pelo método de REED & MUENCH (1938).

### 3.5.3. Técnica de imunofluorescência indireta (IFI)

#### 3.5.3.1. Preparação de anti-gama-globulina

A anti-gama-globulina aviária foi preparada em coelhos, através de inoculações semanais de soros de galinhas normais, obedecendo o esquema seguinte:

a) Na primeira semana os coelhos foram inoculados, por via intraperitoneal, com emulsão de soros e adjuvante completo de Freund em volumes iguais.

b) A mesma mistura foi inoculada duas vezes por semana, por via subcutânea. Este esquema foi seguido até que os coelhos apresentassem reação de Arthus evidente e título de anticorpos 1:40 (imunodifusão), quando foi feita a sangria total.

A preparação do conjugado anti-gama-globulina aviária seguiu o método de CORSTVET & SADLER (1964).

#### 3.5.3.2. Coloração das lâminas

As lâminas foram preparadas (com duas impressões) a partir de fragmentos do cerebelo e/ou traquéia, nos quais havia sido determinado a quantidade de aglomerados víricos pelo método direto. Os esfregaços eram secados em temperatura

ambiente, fixados com acetona a  $-15^{\circ}\text{C}$ , por 40 minutos e estocados a  $-20^{\circ}\text{C}$ , sendo usados num período máximo de sete dias. Usaram-se controles positivos e negativos. As impressões foram delimitadas com esmalte não cintilante e, após serem tratadas com as diluições dos soros e gemas, eram colocadas em câmara úmida, na estufa a  $37^{\circ}\text{C}$  por 45 minutos. As diluições de soro e gema também em salina tamponada pH 7,2, foram as mesmas utilizadas para o teste de soro-neutralização. Em seguida, as lâminas eram lavadas por 20 minutos em salina tamponada (pH 7,2), fria (duas lavagens) e rapidamente em água destilada. Após a secagem, em temperatura ambiente, eram cobertas com o conjugado previamente diluído e colocadas em estufa a  $37^{\circ}\text{C}$  por 30 minutos. Após este período, as lâminas eram lavadas com salina tamponada (pH 7,2), por 30 minutos, e rapidamente em água destilada. Após a nova secagem em temperatura ambiente, fazia-se montagens em glicerina tamponada (pH 7,2) e examinadas subsequentemente. As lâminas que não apresentaram fluorescência à diluição de  $10^1$  foram consideradas como negativas.

Na análise estatística as amostras eram tratadas como em ensaio inteiramente casualizado, obedecendo ao esquema fatorial onde o interesse foi avaliar a interação tempo (colheita) x método. Procurou-se também caracterizar os títulos obtidos em relação com o grau de imunidade das aves.



## 4. RESULTADOS

No período anterior à vacinação, os anticorpos neutralizantes ou não foram detectados ou o foram em títulos muito baixos ( $10^1$ ), tanto no soro como na gema. No que se refere a anticorpos inibidores da hemaglutinação, quase todos os materiais examinados reagiram positivamente a diluição de  $10^1$ , sendo que uma das gemas reagiu a diluição de  $10^2$ . Para anticorpos fluorescentes, três soros reagiram à diluição de  $10^1$ , e os demais, juntamente com as gemas, foram negativos.

Após a primeira semana de vacinação houve elevação dos títulos nos soros pelas três técnicas e as gemas apresentaram elevação de títulos somente na segunda semana. Neste período, os títulos variaram no soro: de  $10^{0,7}$  a  $10^{5,5}$  na soro-neutralização; de  $10^1$  a  $10^3$  na inibição da hemaglutinação e de  $10^1$  a  $10^4$  na imunofluorescência indireta. Nas gemas a variação foi de negativo a  $10^{5,7}$  na soro-neutralização; de  $10^1$  a  $10^3$  na prova de inibição da hemaglutinação e de negativo a  $10^5$  na imunofluorescência indireta.

Após o desafio (na oitava semana) as amostras de soros e gemas foram examinadas por mais quatro semanas. Nos soros a variação, neste período, foi de  $10^4$  a  $10^7$  na soro-neutralização,  $10^2$  a  $10^4$  na inibição da hemaglutinação e de  $10^3$  a  $10^6$  no teste de imunofluorescência indireta. Nas gemas, a variação foi de  $10^{1,5}$  a  $10^7$  na soro-neutralização; de  $10^2$  a

$10^4$  na inibição da hemaglutinação e de  $10^1$  a  $10^6$  na imunofluorescência indireta.

A interação dos títulos médios para os soros está representada nos Quadros I e III e para gemas no Quadro II.

No Gráfico I são mostrados os títulos médios dos anticorpos neutralizantes, inibidores da hemaglutinação e fluorescentes, no soro, enquanto no Gráfico II apresentam-se os títulos médios dos anticorpos na gema.

Para efeito de simplificação, os Gráficos III, IV e V apresentam, respectivamente, os títulos médios dos anticorpos neutralizantes, inibidores da hemaglutinação e fluorescentes no soro e na gema.

QUADRO I - Interação dos títulos médios para soros no sub-grupo I

Métodos	Colheita	Semanas após a vacinação					
		1. <sup>a</sup>	2. <sup>a</sup>	3. <sup>a</sup>	4. <sup>a</sup>	5. <sup>a</sup>	6. <sup>a</sup>
SN		4,00	4,03	5,00	4,37	6,17	5,83
IFI		2,67	3,00	3,33	3,33	6,00	4,33
IH		2,33	2,67	2,00	2,00	3,00	3,67

d.m.s. - para comparar médias de métodos dentro de cada colheita específica : 1,08

QUADRO II - Interação dos títulos médios para gemas do sub-grupo I

Métodos	Colheita	Semanas após a vacinação					
		1. <sup>a</sup>	2. <sup>a</sup>	3. <sup>a</sup>	4. <sup>a</sup>	5. <sup>a</sup>	6. <sup>a</sup>
SN		0,67	3,70	4,67	4,03	4,17	5,83
IFI		0,00	2,67	3,33	3,00	3,67	4,67
IH		1,00	2,00	2,33	2,00	2,00	3,33

d.m.s. - para comparar médias de métodos dentro de cada colheita específica : 1,15

QUADRO III - Interação dos títulos médios para soros do sub-grupo II

Métodos	Colheita	Semanas após a vacinação				
	1. <sup>a</sup>	2. <sup>a</sup>	3. <sup>a</sup>	4. <sup>a</sup>	5. <sup>a</sup>	6. <sup>a</sup>
SN	4,70	3,00	5,00	3,20	5,50	5,50
IFI	3,50	3,00	2,00	2,50	4,50	4,50
IH	2,00	2,00	2,00	2,00	3,50	3,50

d.m.s. - para comparar médias de métodos dentro de cada colheita específica : 1,92

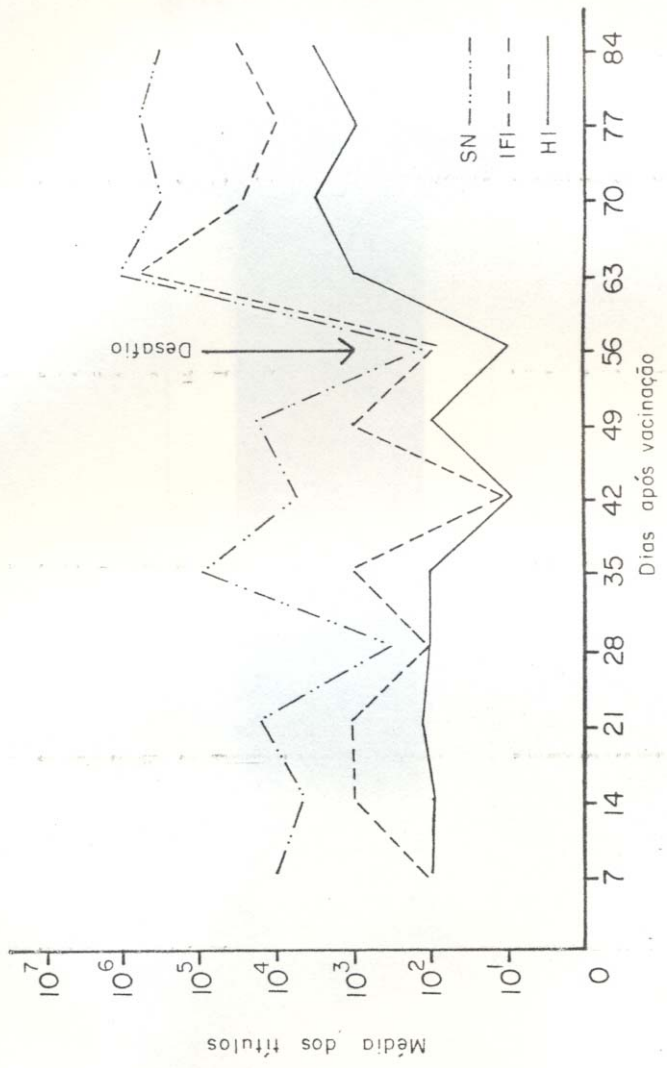


GRÁFICO I - Média dos títulos de anticorpos no soro de seis galinhas, determinados por SN, IFI e HI após vacinação e desafio

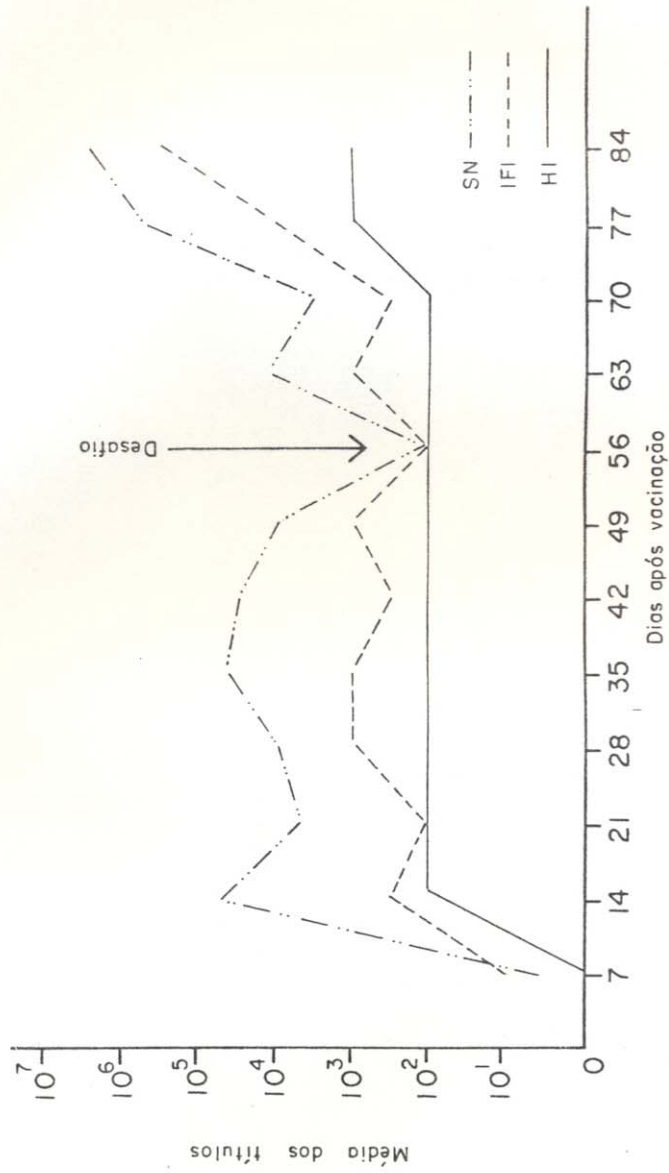


GRÁFICO II - Média dos títulos de anticorpos na gema de ovos de seis galinhas, determinados por SN, IFI e HI após vacinação e desafio.

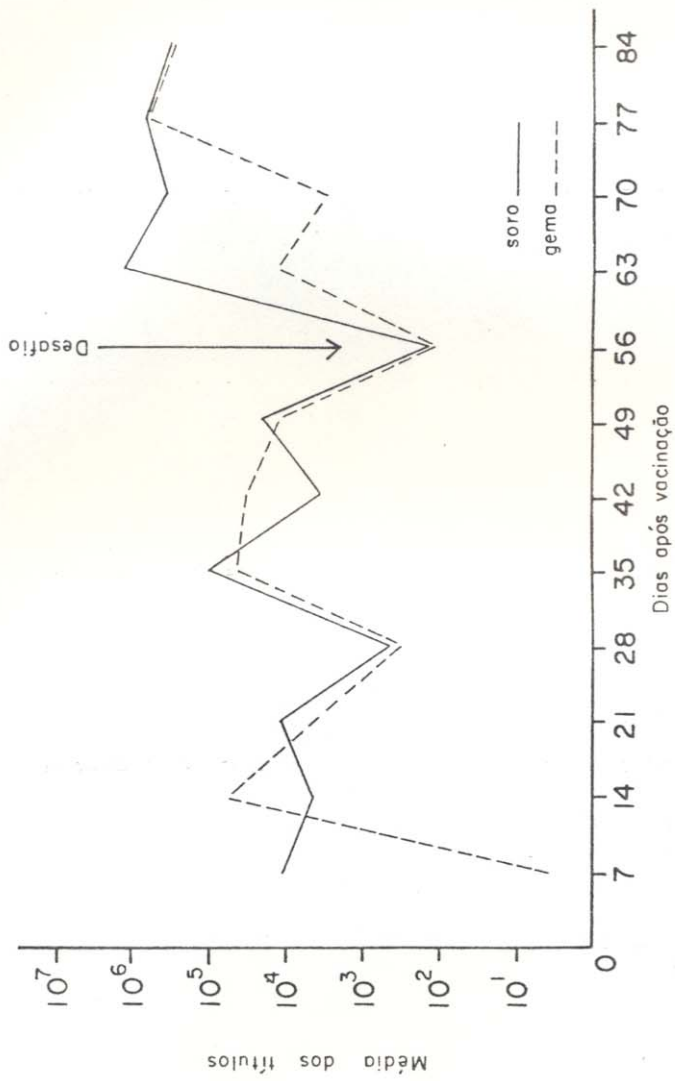


GRAFICO III - Média dos títulos de anticorpos neutralizantes, no soro e gemas de ovos, de seis galinhas após vacinação e desafio.

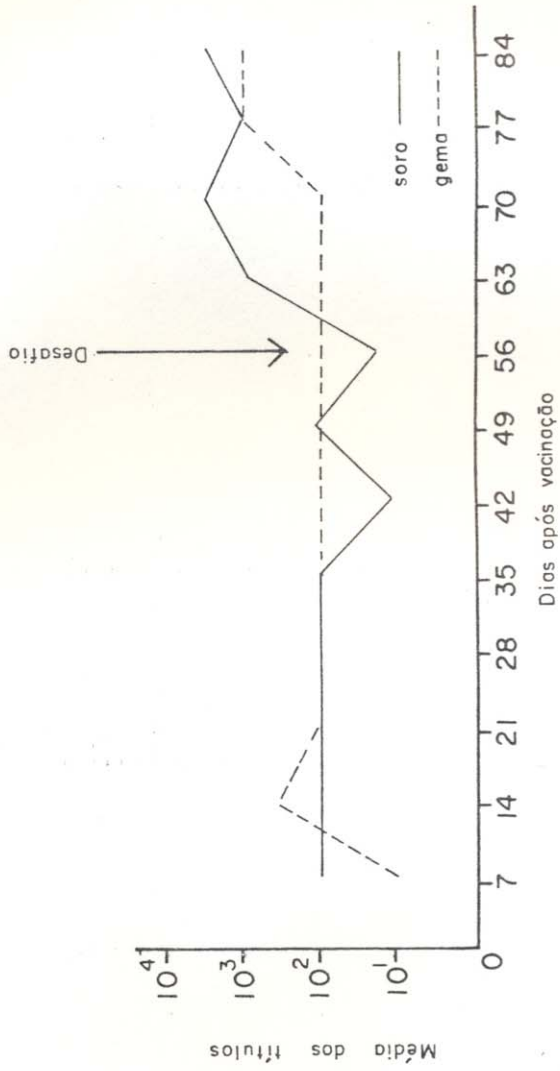


GRÁFICO IV - Média dos títulos de anticorpos inibidores da hemaglutinação, no soro e gema de seis galinhas após vacinação e desafio.



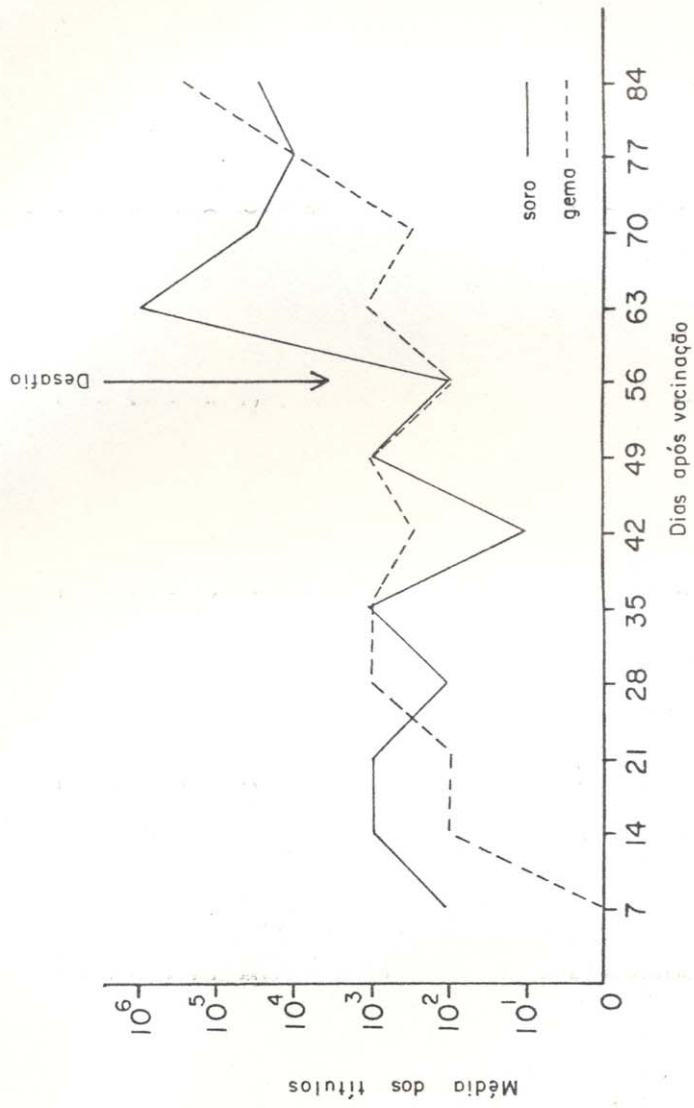


GRÁFICO V - Média dos títulos de anticorpos fluorescentes, no soro e gema de ovos de seis galinhas após vacinação e desafio.

## 5. DISCUSSÃO

Houve elevação dos títulos de anticorpos no soro na primeira semana após a vacinação, evidenciada pelas técnicas usadas; na gema, a elevação dos títulos só foi observada quatorze dias após a vacinação. O fato de os anticorpos neutralizantes e inibidores da hemaglutinação terem sido encontrados no soro simultaneamente está de acordo com os achados de BRANDLY et alii (1947), FABRICANT (1949) e HANSON et alii (1950). Por outro lado, discrepa daqueles obtidos por OSTEN & ANDERSEN (1948), já que estes autores dizem ser os anticorpos inibidores da hemaglutinação os primeiros a serem evidenciados. Esta discordância pode ser explicada pelo fato dos autores terem iniciado as titulações no quarto dia após a vacinação. DOLL et alii (1950) acham que os primeiros anticorpos detectados são os neutralizantes. Com relação ao aparecimento dos anticorpos neutralizantes e inibidores da hemaglutinação, na gema, BRANDLY et alii (1947) dizem que estes só são encontrados no décimo quarto dia após a vacinação e MONTE (1954) não conseguiram demonstrá-los nas gemas de ovos de aves imunes.

O achado dos anticorpos fluorescentes foi simultâneo aos das outras técnicas empregadas, tanto no soro como na gema. HEUSCHELE & EASTERDAY (1970) conseguiram evidenciar anticorpos, através da imunofluorescência indireta em células de traquéia, aos 21 dias após a exposição com aerossóis.

A técnica que apresentou títulos mais baixos foi

a de inibição da hemaglutinação, mas também foi a que se manteve mais uniforme durante todo o período do experimento. O teste de imunofluorescência indireta demonstrou títulos, na maioria dos casos, equivalentes aos da técnica de soro-neutralização e deu reações satisfatórias tanto nas gemas quanto nos soros testados. AULISIO & SHELOKOV (1967), CANCELLOTTI et alii (1972) e CHOI & MIURA (1972) respectivamente, para vírus de sarcoma de Roux, da doença de Gumboro e da encefalomielite aviária, verificaram que a técnica de imunofluorescência apresentou resultados semelhantes aos da soro-neutralização, no soro e na gema, e por isso deveria ser a escolhida pela facilidade de execução e pelo tempo gasto. WHEELLOCK & TAMM (1959) e HEUSCHELL & EASTERDAY (1970) trabalharam com imunofluorescência indireta para pesquisa de anticorpos em doença de Newcastle e obtiveram excelentes resultados. Na soro-neutralização foram obtidos títulos mais elevados do que na prova de inibição da hemaglutinação o que está de acordo com o verificado por BRANDLY et alii (1947), BEACH (1948) e OSTEEEN & ANDERSEN (1948). Por outro lado, MAGLIONE & DOTTA (1957) obtiveram títulos de anticorpos inibidores da hemaglutinação sempre mais alto que os demais. O uso de ovos de galinhas imunes à doença de Newcastle pode ter sido a causa do achado de títulos mais elevados na soro-neutralização, pois BRANDLY et alii (1946), GALGIARDI (1960) e HIGGINS (1970) afirmam que os anticorpos da gema tem efeito inibidor para vírus inoculado em embriões, via cavidade alantoide. No entanto, HITCHNER et alii (1951), TEKLINSKA & TEKLISKI (1959) e DINCULESCU et alii (1962) não concordam que haja diferença significativa entre o crescimento do vírus cultivado em ovos proveniente de galinhas imunes e susceptíveis.

Títulos mais elevados nas gemas do que nos soros foi um achado comum às três técnicas (Gráficos III, IV e V), fato que SCHMITTLE (1950) e BORNSTEIN et alii (1952) acreditam ser devido a contaminação do material com clara durante a coleta. No presente trabalho isto não ocorreu de vez que a gema era lavada antes da colheita com água destilada e depois com salina tamponada (pH 7,2).

No Quadro I demonstra-se a interação entre os três métodos no soro (grupo I), onde se verifica que entre a soro-neutralização e a imunofluorescência houve interação na maioria dos casos. O método de inibição da hemaglutinação, apesar de apresentar títulos mais baixos, foi que se apresentou mais uniforme durante todo o período.

Para as gemas foi notado também maior equivalência entre os métodos de soro-neutralização e imunofluorescência e a prova de inibição da hemaglutinação se manteve mais uniforme em todo o período. Embora se verifique que a precisão para a gema foi menor que a do soro (Quadro II), os achados do Quadro I foram aqui confirmados.

Quando se pensa em imunidade, os títulos obtidos após a vacinação indicam que as aves estariam protegidas e seriam capazes de resistir ao desafio com a amostra virulenta. CHU & RIZK (1972) e HANSON (1974) concordam que a resistência das aves depende do título de anticorpos circulantes e também da uniformidade dos mesmos. ALLAN et alii (1973) salientam que aves com títulos de anticorpos, em média de 1:256, teriam condições de suportar um desafio sem ocorrer mortalidade.

Na análise das variáveis (tempo/método-colheita) no soro do subgrupo II, para confirmação, nota-se que o d.m.s. é mais elevado (d.m.s. = 1,92). Mesmo nestas circunstâncias, pode se notar a interação, na maioria dos casos, entre as provas de soro-neutralização e imunofluorescência, sendo que a prova de inibição da hemaglutinação, neste grupo, se aproximou dos resultados encontrados para o teste de imunofluorescência.

## 6. CONCLUSÕES

1. A técnica de inibição da hemaglutinação foi a que ofereceu menores títulos, tanto nos soros como nas gemas, e a que se manteve mais uniforme.

2. Na maioria dos casos, as técnicas de soro-neutralização e imunofluorescência indireta mostraram títulos equivalentes.

3. As três técnicas testadas podem ser usadas em gema, com resultados equivalentes aos apresentados pelo soro.

4. Dos três métodos, o de inibição da hemaglutinação é ainda o de elaboração mais simples.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ALLAN, W.H.; LANCASTER, J.E.; TÓTH, B. The production and use of Newcastle disease vaccine. Rome, Food and Agriculture Organization of the United Nations, 1973. 33p.
2. AULISIO, C.G. & SHELOKOV, A. Substitution of egg yolk for serum in indirect fluorescent assay for Roux sarcoma virus antibody. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., New York, 126(1):312-5, 1967.
3. BEACH, J.R. The application of the hemagglutination inhibition test in the diagnosis of avian pneumoencephalitis (Newcastle disease). J. Amer. Vet. Med. Assoc., Schaumburg, 112(851):85-91, 1948.
4. BEARD, C.W. & EASTERDAY, B.C. The influence of the route of administration of Newcastle disease virus on host response. J. Infect. Dis., Chicago, 117(1):62-5, 1967a.
5. BEARD, C.W. & EASTERDAY, B.C. The influence of the route of administration of Newcastle disease virus on host response. III. Immunofluorescent and histopathological studies. J. Infect. Dis., Chicago, 117(1):66-70, 1967b.
6. BORNSTEIN, S.; RAUTENSTEIN-ARAZI, A.; SAMBERG, Y. Some aspect of congenital passive immunity to Newcastle disease in chicks. I. The transfer of hemagglutination inhibitors

- from the maternal yolk to the chick. Am. J. Vet. Res., Schaumburg, 13(47):373-8, 1952.
7. BRANDLY, C.A.; HOSES, H.E.; JUNGHERR, E.L. The transmission of antiviral activity via the egg and the role conjuntival passive immunity to Newcastle disease in chickens. Am. J. Vet. Res., Schaumburg, 7(24):333-42, 1946.
  8. BRANDLY, C.A.; HANSON, R.P.; LEWIS, S.H.; HOYT, H.H.; PRITCHARD, W.R.; NERLINGER, C.M. Variables and correlation in laboratory procedures for Newcastle disease diagnosis. Cornell Vet., Ithaca, 37(4):324-36, 1947.
  9. BURNET, F.M. The affinity of Newcastle disease virus to the influenza virus group. Aust. J. Biol. Med. Sci., Melburne, 20:81-8, 1942.
  10. CANCELLOTTI, F.; D'APRILE, P.N.; PETEK, M. Serological survey on Gumboro disease. Detection of antibodies in the yolk by indirect immunofluorescence and neutralization in tissue cultura. Nuova Vet., Faenza, 48(4):206-9, 1972.
  11. CHOI, W.P. & MIURA, S. Indirect fluorescent antibody technique the detection of avian encephalolielites antibody in chickens. Avian Dis., Kennett Square, Pa, 16(4):949-51, 1972.
  12. CHU, H.P. & RIZK, J. Newcastle disease-aWorld poultry problems. World Anim. Rev., Roma, (2):33-43, 1972.
  13. CORSTEVET, R.E. & SADLER, W.W. The diagnosis of cetain avian disease with the fluorescent antibody technique. Poult. Sc., Champaign, 43(11):1280-8, 1964.
  14. CUNNINGHAM, C.H. A Laboratory Guide in Virology. 3. ed. Minneapolis, Burgess, 1956. 145p.
  15. DINCULESCU, P.; NEDELCIU, D.; RISEMBLUM, M. Effects of yolk antibodies on vaccines prepared from embryonated eggs.

Lucr. Stiint. Inst. Seruri Vacc. Pasteur, Bucuresti, 6:  
145-54, 1962.

16. DOLL, E.R.; WALLACE, M.E.; MCCOLLUM, W.H. Interpretation of serologic for the diagnosis of Newcastle disease and infections bronchitis of fowls. I. The hemagglutination inhibition test for the diagnosis of Newcastle disease. Cornell Vet., Ithaca, 39(2):202-20, 1949.
17. GAGLIARDI, G. Effect on the yolk in Newcastle disease vaccines prepared from embryonated eggs. Vet. Ital., Teramo, 11:851-6, 1960.
18. GORHAM, J.R. Simple technique for the inoculation of the chorio allantoic membrane of chickens embryous. Am. J. Vet. Res., Schaumburg, 18(68):691-2, 1957.
19. HANSON, R.P. The reemergence of Newcastle Disease. Adv. Vet. Sci. Comp. Med., 18:213-29, 1974.
20. HANSON, R.P.; WINSLOW, N.S.; BRANDLY, C.A.; UPTON, E. The antiviral activity of Newcastle disease immune serum. J. Bacteriol., Washington, 60(5):557-60, 1950.
21. HEUSCHELE, W.P. & EASTERDAY, B.C. Local immunity and persistence of virus in the tracheas of chickens following infection with Newcastle disease virus. II. Immunofluorescent and histopatological studies. J. Infect. Dis., Chicago, 121(5):497-504, 1970.
22. HICHTNER, S.B.; REISING, G.; ROEKEL, H.V. Characteristics of the B1 strain of Newcastle disease virus. Am. J. Vet. Res., Schaumburg, 12(44):246-9, 1951.
23. HIGGNINS, D.A. Interation of lentogenic Newcastle disease virus and specific antibodies within the yolk sac. Avian Dis., Kenneth Square, Pa, 14(4):579-86, 1970.



24. LEVINE, P.P. & FABRICANT, J. Susceptibility to Newcastle infection of chicks with congenital serum antibody. Cornell Vet., Ithaca, 40(2):213-25, 1950.
25. LUSH, D. The chick red cell agglutination test with the viruses of Newcastle disease and fowl plague. J. Comp. Pathol. Therap., New York, 53(2):157-60, 1943.
26. MAESTRONE, G. & COFFIN, D.L. Study of Newcastle disease by means of fluorescent antibody technique. Am. J. Vet. Res., Schaumburg, 25(104):217-23, 1964.
27. MAGLIONE, E. & DOTTA, U. Contributo allo studio della eredo-immunita nella pseudopeste aviare. Ann. Fac. Med. Vet., Torino, 7:29-46, 1957.
28. MONTI, G. Comparison between haemagglutination-inhibiting and virus neutralizing antibodies in egg yolk of fowls vaccinated and hyperimmunized against Newcastle disease. Clin. Vet., Milano, 77:74-8, 1954.
29. OLIVEIRA, R.L. Utilização da imunofluorescencia no diagnóstico da doença de Newcastle e no estudo de seu agente em ovo embrionado. Belo Horizonte, Escola de Veterinária da UFMG, 1975. 71p. (Tese, Mestrado).
30. OSTEEEN, O.L. & ANDERSEN, W.A. Laboratory diagnosis of Newcastle disease. (Avian pneumoencephalitis). J. Am. Vet. Med. Assoc., Schaumburg, 112(850):40-4, 1948.
31. REED, L.J. & MENCH, H. A simple method of stimating fifty per cent endpoint. Am. J. Hyg., Baltimore, 27(3):493-7, 1938.
32. ROSSI, V.R.; GALLARDO, K.E.; BERDHOFF, M.G. Determination of antobodies against Newcastle disease in yolk and serum of vaccinated, non-vaccinated and convalescent fowls. Zoiatria, Santiago, 7(1-4):4-12, 1966.

33. RUBIM, H. & FRANKLIN, R.M. On the mechanism of Newcastle disease virus neutralization by immune serum. Virology, New York, 3(1):84-95, 1957.
34. SCHMITTLE, S.C. Studies on Newcastle disease. V. A comparison of Newcastle disease antibody titers in blood and egg yolk as measured by the hemagglutination-inhibition test. Am. J. Vet. Res., Schaumburg, 11(39):226-30, 1950.
35. TEKLINSKA, M. & TEKLINSKI, A. Evaluation of egg-passaged Newcastle disease vaccine. Med. Vet., Warszawa, 15:253-66, 1959.
36. WHEELLOCK, E.F. & TAMM, I. Mitosis and division in Hela cells infected with influenza or Newcastle disease virus. Virology, New York, 8(4):532-6, 1959.