

O ectima contagioso (EC) é uma virose aguda que acomete caprinos e ovinos, amplamente disseminada em todo o mundo. No Brasil, onde a ovinocaprinocultura é amplamente praticada para produção de pele, carne e leite, EC tem sido relatado como uma das principais enfermidades infecciosas de caprinos e ovinos. Em certas situações, EC pode ser clinicamente confundido com enfermidades vesiculares, como a febre aftosa, sendo assim necessário um teste laboratorial direto para definição do diagnóstico diferencial, preferencialmente de rápida execução, como a reação em cadeia da polimerase (PCR), que ainda não tem sido amplamente testada com amostras brasileiras do vírus EC. O presente trabalho foi desenvolvido com o objetivo de avaliar uma PCR para diagnóstico de EC. O DNA foi extraído de crostas de animais clinicamente afetados por EC e de sobrenadantes de células de córnea fetal caprina (FCC 40) após passagem dessas amostras. A PCR foi realizada empregando-se os oligonucleotídeos iniciadores PPP3 (5'-tac gtg gga agc gcc tcg ct-3') e PPP4 (5'-gcg agt ccg aga aga ata cg-3') que amplificam um produto de 235 pb do gene B2L, da cepa NZ2 do vírus EC. As condições de ciclagem consistiram em incubação inicial a 94° C por três minutos, seguida de 30 ciclos: desnaturação a 94° C por 30 segundos, anelamento a 65° C por 30 segundos, extensão a 72° C por um minuto, 72° C por dez minutos e uma etapa final a 4° C. Foram processadas oito amostras de caprinos e 25 de ovinos, originários dos Estados da Paraíba, Pernambuco, Sergipe e Bahia. De todas as amostras, foi amplificado um fragmento do tamanho esperado. Para confirmação do diagnóstico, doze produtos de amplificação da PCR foram sequenciados. A análise das seqüências através do método de *neighbor-joining*, usando os parâmetros do modelo Tamura 3 de substituição de nucleotídeos com mil replicatas, mostrou que entre o grupo de seqüências analisadas há 99% de similaridade e 67%, quando comparado com outras amostras brasileiras e asiáticas. A significativa divergência com outras amostras indica que é necessária a avaliação de um maior número de amostras de diferentes regiões do País para validar a PCR como teste de diagnóstico. Espera-se que a PCR definitivamente validada possa ser usada para diferenciação de EC da febre aftosa, sobretudo como suporte às ações do Programa Nacional de Prevenção e Erradicação da Febre Aftosa, no qual os caprinos e ovinos são considerados animais sentinelas.

CNPq, Mapa e Facepe.

<sup>1</sup>Universidade Federal Rural de Pernambuco  
Departamento de Medicina Veterinária, Dom Manuel Medeiros, s/n°  
CEP 52171-900, Recife, PE, Brasil.  
E-mail: scastro@dmv.ufrpe.br

<sup>2</sup>Fundação Oswaldo Cruz, Recife, PE, Brasil.

<sup>3</sup>Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, Brasil.

<sup>4</sup>Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Lanagro  
Recife, PE, Brasil.

### Natural co-infection with infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (ihhmv) and infectious myonecrosis virus (imnv) in *litopenaeus vannamei* in northeast Brazil\*

*Coinfecção natural com o vírus da necrose hipodérmica e hematopoiética infecciosa (VNHVI) e o vírus da mionecrose infecciosa (VMI) em Litopenaeus vannamei no Nordeste do Brasil*

Vieira, P.R.N.<sup>1</sup>; Teixeira, M.A.<sup>1</sup>; Cruz, J.E.F.<sup>1</sup>; Branco, I.R.C.<sup>2</sup>; Costa, F.H.F.<sup>3</sup>; Rádís-Baptista, G.<sup>1</sup>

Cultivation of whiteleg shrimp (*Litopenaeus vannamei*) constitutes a growing aquaculture industry in Northeast Brazil. Similar to other animals that are intensively farmed, shrimp experience disease outbreaks, which are a constant threat and cause eventually significant economical losses. Infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHHNV) and infectious myonecrosis virus (IMNV) are prevalent epizootic viral agents in Brazil. In a routine monitoring program for the diagnosis of IHHNV and IMNV, using molecular techniques like conventional PCR, reverse transcription coupled with PCR (RT-PCR) and absolute quantitative real time PCR (qPCR), we found that most positive samples of shrimp were simultaneously co-infected with both viruses. This survey is the first to show the occurrence of a natural co-infection that is caused by IHHNV and IMNV in penaeid shrimp attacked by viral disease that were cultivated in Northeast Brazil. Taken together, RT-PCR can be readily employed in the routine diagnostic screening program for shrimp viruses in the aquaculture industry. Moreover, in combination with qPCR, diagnosis of the viral load and co-infection can be absolutely assessed and the data used to assist differential management plans for epizootic control.

\*Research supported by the Brazilian National Council for Scientific and Technological Development (CNPq), Ministry of Science and Technology (National Program for Animal Health; grant #578460/08-4).

†All supported by fellowships for Technological and Industrial Development (DTI-3) from CNPq.

<sup>1</sup>Universidade Federal do Ceará, Instituto de Ciências do Mar  
Av. da Abolição 3207, CEP 60165-081, Fortaleza, CE, Brasil.  
E-mail: gandhi.radis@ufc.br

<sup>2</sup>Associação dos Criadores Cearenses de Camarão, Fortaleza, CE, Brasil.

<sup>3</sup>Universidade Federal do Ceará, Departamento de Engenharia de Pesca,  
Fortaleza, CE, Brasil.

### Differential diagnosis of active hypodermal and hematopoietic necrosis virus based on gene choice and reverse transcription coupled with PCR\*

*Diagnóstico diferencial do vírus da necrose hipodérmica e hematopoiética na forma ativa com base na escolha do gene e transcrição reversa por meio de PCR*

Teixeira, M.A.<sup>1</sup>; Cruz, J.E.F.<sup>1</sup>; Vieira, P.R.N.<sup>1</sup>; Branco, I.R.C.<sup>2</sup>; Costa, F.H.F.<sup>3</sup>; Rádís-Baptista, G.<sup>1</sup>

The Pacific whiteleg shrimp *Litopenaeus vannamei* (Penaeidae) is one of the most important cultivated species in world aquaculture. In Brazil, the Northeastern states are home to the main shrimp producers. As shrimp aquaculture has expanded and intensified, diseases have progressively become one of the most serious threats to this industry. Infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHHNV) is an enzootic viral agent in Brazilian shrimp farms. These viruses are usually diagnosed by histological methods. However, to detect sub-clinical or acute IHHNV infection, more refined methods based on molecular techniques have been utilized. We found that by using "universal" primers and a single-step PCR diagnostic test, it was difficult to distinguish between non-infective forms of the virus and active IHHNV. Detection of IHHNV was more accurate when we used two alternative molecular strategies, namely 1) single-step PCR amplification based on gene choice and 2) reverse transcription coupled with PCR. This communication presents the results of

our strategy that can be adaptable for routine diagnostic programs in shrimp culture for detecting the presence of active IHNV virus.

\*Research supported by the Brazilian National Council for Scientific and Technological Development (CNPq), Ministry of Science and Technology (National Program for Animal Health; grant #578460/08-4).

‡All supported by fellowships for Technological and Industrial Development (DTI-3) from CNPq.

<sup>1</sup>Universidade Federal do Ceará, Instituto de Ciências do Mar  
Av. da Abolição 3207, CEP 60165-081, Fortaleza, CE, Brasil.  
E-mail: gandhi.radis@ufc.br

<sup>2</sup>Associação dos Criadores Cearenses de Camarão, Fortaleza, CE, Brasil.

<sup>3</sup>Universidade Federal do Ceará, Departamento de Engenharia de Pesca, Fortaleza, CE, Brasil.

### Cloning and expression of recombinant nucleoprotein (NP) and haemagglutinin-neuraminidase (HN) glycoprotein of Newcastle disease virus for using in the detection of specific antibodies by indirect ELISA

*Clonagem e expressão da nucleoproteína (NP) e da glicoproteína hemaglutinina-neuraminidase (HN) do vírus da doença de Newcastle (VDN) para aplicação na detecção de anticorpos específicos pelo método indireto de ELISA*

Silva, K.R.; Gonçalves, M.C.M.; Montassier, M.F.S.; Fernandes, C.C.; Oliveira, E.S.; Montassier, H.J.

Newcastle disease (ND) is one of the most important disease for the poultry industry worldwide. Newcastle disease virus (NDV) is the causative agent and usually induces severe lesions in respiratory and digestive tracts, requiring increasingly rapid and effective techniques for the laboratory diagnosis. NDV virions are made of three envelope and three core structural proteins, from which the major antigens were identified; as the haemagglutinin-Neuraminidase (HN) envelope glycoprotein and nucleocapsid (NP) protein. The HN glycoprotein is involved in virus attachment to the host cell receptors and contains relevant virus-neutralizing and haemagglutinating-inhibitor epitopes. The nucleocapsid protein (NP) of NDV has highly conserved amino acid sequences, and a high immunogenicity. Several methods have been investigated for the laboratory diagnosis of NDV infection, including serological tests, such as haemagglutination inhibition (HI) assays and conventional ELISA methods which depend on laborious and time-consuming procedures of virus propagation in SPF embryonated chicken eggs, and the purification of virus particles to be adsorbed to the microplate solid phase. This study aimed to clone the full open reading frame of NP gene, and the 5'-part and 3'-part of HN gene of NDV in a heterologous system (*Escherichia coli*), using pETSUMO vector in order to express the NP protein, or the amino and carboxy-terminal parts of HN glycoprotein for using in NDV immunodiagnosis. The NP and the amino and carboxy-terminal fragments of HN glycoprotein were expressed as fusion recombinant proteins containing SUMO peptide and poly-histidine tags. These proteins after purification in nickel-agarose resin, and biochemical and immunochemically characterization by SDS-PAGE and Western-blotting, demonstrated the ability to be recognized by polyclonal antibodies from SPF chickens infected with LaSota strain of NDV. The NP and amino and carboxy-terminal fragments of HN glycoprotein were used to develop indirect ELISA methods for using in chicken antibody detection. The assays were evaluated with a panel

of 120 chicken serum samples. The results showed comparable agreement, specificity and sensitivity. The recombinant NP-ELISA, amino-HN-ELISA and carboxy-HN-ELISA were capable to differentiate NDV positive from negative chicken sera and by comparing these ELISA methods with haemagglutination-inhibition test, high and significant correlations were detected, as well as high sensitivity and specificity were obtained, indicating that NP-ELISA, amino-HN-ELISA and carboxy-HN-ELISA assays can be used for screening the presence of antibodies in NDV infected birds. In conclusion, the recombinant NP, amino and carboxy-terminal fragments of HN glycoprotein shared relevant epitopes with homologous and native viral proteins and have a great potential to be advantageously used in immunodiagnosis of NDV infection.

\*Research supported by the Brazilian National Council for Scientific and Technological Development (CNPq), Ministry of Science and Technology (National Program for Animal Health; grant #578460/08-4).

‡All supported by fellowships for Technological and Industrial Development (DTI-3) from CNPq.

Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Departamento de Patologia Veterinária, Laboratório de Imunologia e Virologia  
Rod. Prof. Paulo D. Castellane, s/no, CEP 14884-900, Jaboticabal, SP, Brasil.

E-mail: heliojm@fcav.unesp.br

### Desenvolvimento de peptídeos sintéticos para o diagnóstico da febre aftosa

*Development of synthetic peptides for the diagnosis of foot and mouth disease*

Ribeiro, E.L.<sup>1\*</sup>; Camargos, M.F.<sup>2</sup>; Sales, E.B.<sup>2</sup>; Oliveira, A.M.<sup>2</sup>; Franco, J.A.<sup>3</sup>; Ueira-Vieira, C.<sup>3\*\*</sup>; Goulart Filho, L.R.<sup>3\*\*</sup>; Heinemann, M.B.<sup>1\*\*</sup>

A febre aftosa é caracterizada por afetar diretamente o desenvolvimento econômico da indústria animal, com graves consequências sociais. Os testes atuais para diagnóstico e vigilância epidemiológica da febre aftosa são realizados com o polipeptídeo 3ABC recombinante, que, apesar de serem de boa eficiência, apresentam limitações, como o emprego apenas para avaliação de rebanhos e não para o diagnóstico individual. A EITB, a despeito de ser uma prova de alta sensibilidade e especificidade, requer um treinamento extensivo, a interpretação é subjetiva e o protocolo da prova não é totalmente padronizado. A utilização de peptídeos sintéticos pode trazer a vantagem da EITB, alta especificidade, com a vantagem do ELISA, alta sensibilidade, rapidez, padronização e automação dos testes. A presente proposta tem como objetivo o desenvolvimento de peptídeos sintéticos para o diagnóstico para a febre aftosa. A partir de modelos descritos na literatura, foram desenhados três peptídeos sintéticos. Após o desenho, os peptídeos foram otimizados para expressão em *Pichia pastoris* (vetor pPIC9) a fim de eternizá-los. Após a expressão, os peptídeos foram purificados em HPLC e concentrados por meio de ultrafiltração tangencial com cartucho de retenção de 10 kDa. As proteínas purificadas foram testadas em *dot blot* com conjugado anti-histidina, devido ao fato do peptídeo ter como marcador uma cauda de poli-histidina. Em seguida, foram testadas em *dot blot* e Elisa com soros bovinos não vacinados, vacinados e infectados com o vírus da febre aftosa. Como resultados, obtivemos êxito em clonar e expressá-los em *P. pastoris* com um rendimento em torno de 100 µg/mL. O *dot blot* com anti-histidina foi positivo nos três peptídeos, indicando