

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.

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

²Associação dos Criadores Cearenses de Camarão, Fortaleza, CE, Brasil.

³Universidade 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.^{1*}; Camargos, M.F.²; Sales, E.B.²; Oliveira, A.M.²; Franco, J.A.³; Ueira-Vieira, C.^{3**}; Goulart Filho, L.R.^{3**}; Heinemann, M.B.^{1**}

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