

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

que as proteínas purificadas eram os peptídeos desenhados antiaftosa. O resultado do teste de *dot blot* e Elisa utilizando anticorpos bovinos antifebre aftosa foram negativos, ou seja, os peptídeos não conseguiram diferenciar quais eram os animais negativos, vacinados e os infectados.

Apoio financeiro: CNPq (edital 64/2008 CNPq/Mapa/SDA).

*Bolsista Fapemig.

**Bolsista CNPq

¹Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária, Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Av. Antônio Carlos 6627, CEP 31270-010, Belo Horizonte, MG, Brasil.

E-mail: mabryan@ufmg.br

²Laboratório Nacional Agropecuário em Minas Gerais, Pedro Leopoldo, MG, Brasil.

³Universidade Federal de Uberlândia, Instituto de Genética e Bioquímica, Uberlândia, MG, Brasil.

Ações da defesa animal do IDARON em foco de raiva dos herbívoros no município de Espigão do Oeste, Rondônia – Relato de caso

A herbivorous rabies outbreak in Espigão do Oeste, Rondônia, Brazil – case report

Fuck, J.J.¹; Silva, S.G.²; Daher, D.O.^{3*}; Bruhn, F.R.P.^{3**}; Lopes, E.^{3***}; Hirsch, C.³; Rocha, C.M.B.M.³

A raiva é uma zoonose de alta relevância na saúde pública, que acarreta enormes perdas econômicas pela alta letalidade. O objetivo deste trabalho foi relatar o caso de um foco de raiva dos herbívoros ocorrido no município de Espigão do Oeste, Rondônia. Os levantamentos foram feitos com base nas informações encontradas nos arquivos do escritório da Unidade Local de Sanidade Animal e Vegetal (Ulsav) da Agência de Defesa Sanitária Agrosilvopastoril do Estado de Rondônia (Idaron) no município de Espigão do Oeste e nos registros do sistema informatizado dessa agência (Sisidaron). Após notificação do produtor quanto à ocorrência da mortalidade de bovinos sob a suspeita de raiva dos herbívoros, procedeu-se ao deslocamento até a propriedade para investigação epidemiológica e clínica do foco. A suspeita foi confirmada por Imunofluorescência Direta (IFD). Traçou-se um raio de 4 km a partir da propriedade foco e outro de 12 km para identificação dos limites do perifoco, tendo cada região um padrão de ação específico. Em todas as propriedades na área de até 4 km de raio foram feitas notificações para vacinação assistida e seus respectivos acompanhamentos de reforços vacinais em 30 dias. As propriedades situadas no raio entre 4 e 12 km foram notificadas para vacinação e reforço, porém sem acompanhamento. Para o controle de transmissores, particularmente para morcegos hematofagos (*Desmodus rotundus*), as ações foram desencadeadas a partir da constatação de mordedura dos animais durante as notificações das propriedades ou por denúncia desse fato pelos produtores ao Idaron, identificação de abrigos e captura no foco. Foram realizadas atividades de educação sanitária, dentre as quais quatro entrevistas sobre o assunto em duas emissoras de rádio local. Por fim, tomadas as ações descritas, o foco foi extinto atendendo às expectativas legais, protegendo a saúde pública e animal, e evitando-se maiores perdas econômicas, portanto foram atendidos os reais objetivos da defesa sanitária animal.

Apoio financeiro: CNPq, Fapemig, Capes, UFLA e Mapa.

*Bolsista DTI-II/CNPq – edital 64/Mapa.

**Mestrado-Capes.

*** CNPq/PIBIC/ e ATP-A-A/CNPq – edital 64/Mapa.

¹Agência de Defesa Sanitária Agrosilvopastoril do Estado de Rondônia, Unidade Local de Sanidade Animal e Vegetal, Rua Acre, 2783, CEP 76974-000, Espigão do Oeste, RO, Brasil.

E-mail: jefff@hotmail.com

²Emater, Porto Velho, RO, Brasil.

³Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG, Brasil.

Banco de germoplasma de lentivírus caprino do Brasil

Germplasm bank of caprine lentivirus of Brazil

Pinheiro, R.R.¹; Azevedo, D.A.A.²; Feitosa, A.L.V.L.³; Dias, R.P.³; Andrioli, A.¹; Santiago, L.B.¹; Alves, F.S.F.¹; Minardi, J.C.^{4*}

Considerando as diferenças biológicas e moleculares significativas existentes entre amostras de lentivírus caprino (LVC), torna-se fundamental o estudo mais aprofundado das amostras virais já isoladas. A diversidade genética é considerada uma característica peculiar dos lentivírus e está provavelmente relacionada à diversidade do curso das lesões e epidemiologia da enfermidade. A formação de um banco de germoplasma de LVCs no Brasil poderá viabilizar o entendimento dessa diversidade, tornando-se essencial para o estabelecimento de programas de controle das lentivirose no País. O domínio das técnicas de isolamento e a caracterização, classificação, manutenção e propagação do material genético viral existente nos Estados da federação são outras vantagens obtidas com a implantação de um banco de germoplasma de LVCs no Brasil. Normas que garantam a patente de metodologias para os LVCs isolados serão mais facilmente implantadas e, por conseguinte, instituições de pesquisa brasileiras poderão regulamentar os processos de cessão e intercâmbio de cepas importantes para a economia nacional. O banco de germoplasma de LVCs objetiva desenvolver técnicas para a detecção e o controle da artrite-encefalite caprina (CAE), que acomete caprinos de todos os tipos raciais, idade e sexo, deprimindo os índices de produtividade geral da espécie, tornando o agronegócio da caprinocultura do País menos competitivo. Para o isolamento das cepas nativas de LVC, foi utilizada a técnica de cocultivo de leucócitos. A confirmação das amostras virais foi realizada através da técnica de reação em cadeia de polimerase (PCR). Foram realizadas coletas de sangue de animais do Estado do Ceará (nove fazendas da região Norte, quatro fazendas da região Central e duas fazendas da região Metropolitana de Fortaleza), Piauí (duas fazendas da região Metropolitana de Teresina e dez fazendas da região do Gurguéia), Rio Grande do Norte (uma fazenda em Mossoró), Minas Gerais (uma fazenda) e Bahia (uma fazenda em Salvador). Após a confirmação da soropositividade pelo teste de imunodifusão em gel de agarose (IDGA), realizou-se nova coleta de sangue de 26 animais fortemente soropositivos. Desses animais, 22 cepas nativas do Ceará (Sobral e Fortaleza), Rio Grande do Norte, Piauí, Bahia e Minas Gerais foram isoladas. O isolamento foi confirmado pela presença de efeito citopático e PCR. A Embrapa Caprinos e Ovinos consolidou a construção de sua biblioteca de LVCs com o depósito das referidas amostras virais, que servirão para estudos futuros de epidemiologia molecular, bem como para a produção de antígenos nativos, preparo de kits de diagnóstico da CAE com cepas nacionais e até mesmo o estudo de vacinas para essa enfermidade.

*Bolsista de Pós-doutorado.

¹Embrapa Caprinos e Ovinos, Estrada Sobral-Groaíras, km 4, CEP 62010-970,