

T636.089 69  
S723p  
2000

Cleiton Martins de Souza

**PRODUÇÃO DE ANTICORPOS MONOCLONAIS CONTRA OS COMPONENTES  
CONSERVADOS DO VÍRUS DA BRONquite INFECCIOSA DAS GALINHAS**

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 Rodrigo da Silva Martins

**Belo Horizonte  
UFMG – Escola de Veterinária  
2000**

S729p

Souza, Cleiton Martins de, 1974-

Produção de anticorpos monoclonais contra os componentes conservados do vírus da bronquite infecciosa das galinhas / Cleiton Martins de Souza. – Belo Horizonte: UFMG – Escola de Veterinária, 2000.

49p.: il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária

1. Galinha – Doenças – Teses. 2. Bronquite infecciosa das galinhas – Teses. 3. Anticorpos monoclonais – Teses. I. Título.

CDD – 636.508 96

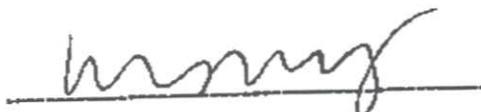
0305 - 52560

BIBLIOTECA UNIVERSITARIA

21/02/0

150101-01

Dissertação defendida e aprovada em 25 de fevereiro de 2000, pela Comissão Examinadora constituída por:

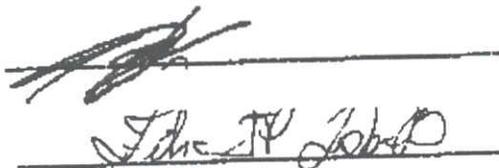


**Prof. Nelson Rodrigo da Silva Martins**  
Orientador



**Prof. Cristiano Machado Gontijo**

**Prof. Andrey Pereira Lage**



**Profa. Zélia Inês portela Lobato**

“Esforça-te e tem bom ânimo; não pases,  
nem te espantes: porque o Senhor teu Deus é contigo,  
por onde quer que andares.”

*Josué 1:9*

“ Porque, aquele que pede, recebe; e, o que busca,  
encontra: e ao que bate, se abre.”

*Mateus 6:7*

*"Jamais poderemos compreender o que o outro espera de nós, e o que esperamos do outro. Mas ainda é preferível fazer, mesmo errando, a nada fazer pelo medo de errar. Fica a certeza de que tudo foi feito buscando o melhor e a nossa única preocupação foi de fazemos deste trabalho algo inesquecível. Sabemos que o que fizemos foi apenas uma gota d'água no oceano, mas se não tivéssemos feito, essa gota faltaria"*

---

## DEDICO

*Dedico esta obra a Deus que me deu o dom da vida, aos meus pais que me ensinaram que não há vitória sem luta e Vanessa, que soube colocar o amor acima de tudo, compreendendo os diversos momentos que estive ausente*

## AGRADECIMENTOS

A Deus por oferecer tantas oportunidades.

Aos meus pais, pois quanto mais se avança na caminhada, mais se reconhece a importância dos primeiros passos.

Ao professor Nelson Rodrigo da Silva Martins o meu reconhecimento pela sua dedicação à Medicina Veterinária e pelo apoio a este trabalho.

Ao professor José Sérgio, exemplo humanitário e científico, pela sua dedicação, disponibilidade e constante incentivo aos seus alunos.

À amiga Ana Amélia Peixoto Teixeira que esteve presente em diversos momentos desta jornada.

Ao colega Max Augusto Jorge modelo de profissionalismo e dedicação à Medicina Veterinária.

Aos funcionários Cláudio e Ailton, pela amizade e convivência.

Ao professor Rubens Antônio Carneiro, pela concessão de um horário flexível de trabalho, permitindo a realização deste sonho.

Ao amigo Manoel dos Santos que com paciência, caminhou ao meu lado durante boa parte desta jornada.

A todos os funcionários do Setor de esterilização que sempre demonstraram interesse em ajudar.

Aos Drs. Vahe Berdian e Sabina Baxter, University of Pennsylvania, que gentilmente forneceram as amostras de células de mieloma utilizadas na realização deste trabalho.

À Dr.ª. Linda G. Green, Hybridoma Core Lab\_University of Florida, pelo apoio, auxílio e receptividade em diversas etapas do presente estudo.

Aos professores Cristiano Machado Gontijo, Zélia Inês Portela Lobato e Andrey Pereira Lage pelas inúmeras ajudas, correções e sugestões.

Ao Prof. Mauricio Resende, Tânia, Betinha, Lara e Josely pela contribuição durante a realização dos testes de *western blotting*.

Ao amigo Adolfo pelas inúmeras ajudas.

Aos amigos da pós graduação, em especial à Fernandinha, Josiane e Salette, pela histórica qualidade de nossa amizade, tornando esta etapa bastante significativa.

À amiga Niulza pela paciência e carinho em revisar este trabalho.

Aos funcionários e professores do departamento de Medicina Veterinária Preventiva, pelo agradável convívio, em especial à colega Nádia pela colaboração, interesse e disponibilidade constantes.

À todos os meus mestres, com quem eu tenho aprendido tanto ao longo destes anos. Muitos vêm passando da condição de professores à condição de amigos eternos. Todos de uma forma ou de outra, e cada um a seu modo têm participado da minha evolução profissional.

À Vanessa, que sendo mais que namorada, tem estado sempre comigo.

À FAPEMIG e ao CNPq, pelo apoio financeiro.

À minha Universidade – UFMG – onde graduei-me e onde tenho tentado, ao longo desses anos, honrar minha condição de Médico Veterinário.

## SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS .....	11
RESUMO .....	13
ABSTRACT .....	13
1 INTRODUÇÃO .....	14
2 REVISÃO DE LITERATURA .....	14
2.1 Bronquite infecciosa das galinhas .....	14
2.1.1 Etiologia .....	14
2.1.2 A doença .....	15
2.2 Anticorpos monoclonais.....	16
2.2.1 Linhagem de plasmacitomas Sp2/0-Ag 14 .....	16
2.3 ELISA .....	16
2.4 Western blotting.....	17
3 MATERIAL E MÉTODOS .....	17
3.1 Local de realização dos experimentos.....	17
3.2 Animais experimentais.....	17
3.3 Produção de antígenos de VBIG.....	17
3.3.1 Produção dos concentrados virais .....	17
3.3.2 Purificação dos concentrados virais .....	18
3.3.3 ELISA para avaliação dos antígenos de VBIG purificados .....	19
3.3.4 Concentração dos antígenos de VBIG.....	19
3.3.5 Determinação da concentração protéica dos antígenos de VBIG.....	19
3.4 ELISA para a detecção de anticorpos dos camundongos.....	19
3.5 Imunização dos camundongos .....	20
3.6 Produção de anticorpos monoclonais.....	20
3.6.1 Preparo dos esplenócitos .....	20
3.6.1.1 Congelamento dos esplenócitos .....	20
3.6.1.2 Preparo dos esplenócitos congelados .....	21
3.6.2 Preparo das Sp2/0_Ag14 .....	21
3.6.3 Fusão.....	21
3.6.4 Seleção de híbridos após a fusão.....	21
3.6.5 Clonagem dos híbridos.....	21
3.6.6 Congelamento de células.....	22
3.7 Caracterização dos anticorpos.....	22
3.7.1 Isotipagem .....	22
3.7.2 Especificidade.....	22
3.7.2.1 Eletroforese do VBIG purificado .....	22
3.7.2.2 Western blotting.....	22
3.8 ELISA utilizando amostras brasileiras .....	23
4 RESULTADOS.....	25
4.1 Produção de antígenos de VBIG.....	25
4.2 Imunização dos camundongos .....	25
4.3. Produção de anticorpos monoclonais.....	25
4.4 Caracterização dos AcM por <i>western blotting</i> .....	25
4.6 Caracterização isotípica.....	29
4.7 ELISA utilizando amostras brasileiras .....	29
5 DISCUSSÃO .....	31
6 CONCLUSÕES .....	33
7 APÊNDICES .....	34
7.1 SOLUÇÕES PARA PRODUÇÃO DO ANTÍGENO VIRAL .....	34
7.2 SOLUÇÕES PARA ELISA.....	35
7.3 SOLUÇÕES PARA ELETROFORESE, WESTERN BLOTTING e IMMUNOBLOTTING .....	35
7.4 SOLUÇÕES PARA CULTIVO DE CÉLULAS .....	36
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	38

### LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Caracterização das amostras do vírus da bronquite infecciosa das galinhas isoladas de casos clínicos da doença no Estado de Minas Gerais.....	24
Tabela 2.	Médias das Absorvâncias obtidas com as amostras de VBIG frente aos AcM S12B2 (Anti-S <sub>2</sub> ) e N3F10 (Anti- N) em ELISA.....	29

### LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Avaliação das especificidades dos AcM S12B2 e N3F10 frente as amostras de M41, Arkansas 99 e A5968 de VBIG em <i>western blotting</i> .....	27
Figura 2.	Valores médios de absorvância das amostras de VBIG em ELISA frente aos AcM (S12B2 e N3F10).....	29

## LISTA DE ABREVIATURAS

%C	% de cross link $\frac{\text{acrilamida (g)} + \text{bisacrilamida (g)}}{\text{acrilamida (g)}}$
%T	% total de acrilamida
99	Amostra do VBIG do sorotipo Arkansas
A5968	Amostra do VBIG do sorotipo Connecticut
AcM	Anticorpo(s) monoclonal(s)
Água MilliQ 18,2MΩcm	Água do tipo I (especificação ASTM)
Ark-99	Amostra de VBIG do sorotipo Arkansas
ATCC	<i>American Tissue Type Collection</i>
BIG	Bronquite infecciosa das galinhas
DIOE <sub>50</sub>	Dose infectante de ovo embrionado 50%
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
H52	Amostra Holland (sorotipo Massachusetts)
HAT	Meio RPMI 1640 adicionado de hipoxantina, aminopterina e timidina
HGPRTase	Hipoxantina-guanina fosforibosil transferase
HT	Meio RPMI 1640 adicionado de hipoxantina e timidina
IBV	<i>Infectious bronchitis virus</i>
Kda	Quilo Dalton
M41	Amostra de VBIG do sorotipo Massachusetts
OEG/SPF	Ovos embrionados de galinhas SPF
PCR	Reação em cadeia pela polimerase
PEG	Policetilenoglicol
PI	Ponto isoelétrico
PMSO	Fluorato de fenil metil sulfonil
PNPP	p-Nitrofenil fosfato
PVP	Polivinilpirrolidone
RPMI 1640	Meio de cultivo <i>Roswell Park Memorial Institute</i>
SDS-PAGE	<i>Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis</i> ; dodecil sulfato de sódio - eletroforese em gel de poliacrilamida
SE-17	Amostra de VBIG do sorotipo Geórgia
Sp2/0-Ag14	Plasmacitoma de linhagem
SPF	<i>Specific pathogen free</i>
VBIG	Vírus da bronquite infecciosa das galinhas

## RESUMO

Foram produzidos anticorpos monoclonais (AcM) contra as proteínas N (53KDa) e S<sub>2</sub> (82KDa) do vírus da bronquite infecciosa das galinhas (VBIG) amostra M41 (sorotipo Massachusetts). Os híbridos secretores foram originados da fusão de células da linhagem Sp2/0-Ag14 e linfócitos B de camundongos Balb/c previamente imunizados com VBIG íntegro. Um ELISA foi utilizado para a detecção dos hibridomas produtores de AcM específico contra VBIG. Trinta e seis híbridos produtores de AcM reagentes no ELISA foram gerados. Destes, foram selecionados dois AcM, da subclasse IgG1, que reagiram contra as proteínas N (N3D4) e S<sub>2</sub> (S12B2) de VBIG da amostra M41 em *western blotting*. Estes AcM foram também capazes de reconhecer antígenos das amostras Ark-99 (sorotipo Arkansas) e A5968 (sorotipo Connecticut) do VBIG no *western blotting*. No ELISA, o AcM contra a porção compatível em peso molecular com S<sub>2</sub> (S12b2) reconheceu as 11 amostras estudadas, sendo 8 amostras brasileiras (M41, SE-17, H52, 297, 283, PM-1, PM-2, PM-3, 351, 29-78 e 327), enquanto o AcM contra a proteína compatível em peso molecular com N reconheceu apenas 6 (M41, SE-17, H52, 283, 327 e 297). O AcM contra S<sub>2</sub> pode ser indicado como ferramenta de diagnóstico do VBIG, independentemente do sorotipo, que pode ser aplicado em ensaios de rotina laboratorial especialmente no diagnóstico das doenças que se confundem com a BIG nas galinhas. O AcM contra N (N3F10), ao reconhecer uma região menos conservada desta proteína, pode ser útil em estudos filogenéticos de isolados de VBIG.

Palavras-chave: Anticorpo monoclonal, bronquite infecciosa das galinhas, nucleoproteína, glicoproteína S<sub>2</sub>.

## ABSTRACT

*Murine hybridomas producing IgG1 monoclonal antibodies (Mab) against N and S<sub>2</sub> proteins (53KDa and 82KDa, respectively) from avian infection bronchitis virus (IBV) strain M41 (serotype Massachusetts) were generated by the fusion of a myeloma cell line (Sp2/0-Ag14) with spleen cells from Balb/c mice previously immunized with whole virus IBV M41. Post-fusion screening criterion was based on ELISA and 36 positive hybrids producing Mab to IBV M41 were generated after two fusion procedures. The Mab specific to N (N3F10) and S<sub>2</sub> (S12B2) proteins of M41 were selected by western blotting. These Mabs were able to recognize the Ark-99 (serotype Arkansas) and A5968 (serotype Connecticut) IBV strains in addition to M41. By ELISA, the Mab against the S<sub>2</sub> (S12B2) glycoprotein recognized all Brazilian isolates (297, 283, PM-1, PM-2, PM-3, 351, 29-78 e 327) studied, while the Mab against the N protein recognized only six (M41, SE-17, H52, 283, 327 e 297) isolates. The Mab against S<sub>2</sub> may become a useful tool for IBV detection on the routine diagnosis of infectious bronchitis, especially for helping the differential diagnosis of clinically and pathologically confusing diseases. The Mab N3F10 was able to recognize a less conserved region of N, evidencing differences among isolates which may enable the use of N3F10 for phylogenetic studies of IBV.*

*Keywords: Monoclonal antibody, infectious bronchitis, nucleoprotein, spike glycoprotein S<sub>2</sub>.*

## 1 INTRODUÇÃO

A bronquite infecciosa das galinhas (BIG), uma doença aguda altamente contagiosa que acomete exclusivamente galinhas em todas as idades, é causada por um vírus da família *Coronaviridae*. A BIG está difundida por todo o mundo e sua importância varia entre os países, sendo que em alguns pode constituir um entrave importante para a avicultura. A existência de vários sorotipos do vírus de BIG (VBIG) torna a doença ainda mais complexa face à falta de imunidade cruzada entre alguns deles (Cavanagh e Naqi, 1997).

A doença possui grande importância econômica, tanto para frangos de corte quanto para poedeiras. Para os primeiros, a doença provoca alta mortalidade, baixo ganho de peso e aumento da conversão alimentar. Quanto associada com *Escherichia coli* a BIG resulta em aerossaculite e condenação de carcaças ao abate. Em poedeiras, causa queda na produção e na qualidade dos ovos. As perdas na eficiência de produção geralmente são maiores do que aquelas por mortalidade. A elevada transmissibilidade natural associada à ocorrência de múltiplos sorotipos tem complicado e aumentado o custo de prevenção da doença por imunização (Cavanagh e Naqi, 1997).

Métodos de diagnósticos precisos, sensíveis e específicos, são essenciais, para adequada prevenção da doença. A detecção do VBIG pode ser obtida por passagens seriadas, da amostra a ser testada, em ovos embrionados de galinha SPF (OEG/SPF) (Villegas, 1985; Ignjatovic et al., 1996); teste de vírus neutralização em cultivos de anéis de traquéia e ovos embrionados (Cook, 1984; Cavanagh et al., 1997); inibição da hemaglutinação tratando previamente o vírus com fosfolipase C; imunofluorescência (Dhinakar et al., 1996); ELISA e, mais recentemente, reação em cadeia pela polimerase (PCR) (Cavanagh et al., 1997).

A utilização de anticorpos monoclonais (AcM), tanto para o diagnóstico como para a determinação do sorotipo da amostra, tem sido proposta e diversas publicações têm demonstrado sua eficiência, especialmente em ensaios imunoenzimáticos como ELISA (Cavanagh et al., 1997). O desenvolvimento de

metodologia de diagnóstico utilizando AcM torna-se imprescindível, face à atual demanda por diagnóstico inequívoco.

Tendo em vista o exposto, o presente trabalho objetivou estudar o VBIG com produção e caracterização de anticorpos monoclonais contra as proteínas N e S<sub>2</sub> (regiões conservadas) do VBIG e sua utilização em ELISA.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Bronquite infecciosa das galinhas

#### 2.1.1 Etiologia

A BIG é causada pelo vírus da bronquite infecciosa das galinhas (VBIG), integrante da família *Coronaviridae*. O seu primeiro cultivo em OEG/SPF foi realizado por Beaudette e Hudson (1937), sendo VBIG o primeiro coronavírus descrito e o primeiro também a ter o genoma completamente sequenciado (Collisson, 1992).

Amostras de VBIG são classificadas em diversos sorotipos, que por sua vez, possuem tropismo e patogenicidade diferente para vários órgãos da galinha. Isso provoca variações das amostras quanto às suas habilidades de causar sinais clínicos (Dhinakar e Jones 1997). O genoma de VBIG é constituído por uma única fita de RNA com orientação positiva, ou seja, possui a capacidade de tradução do genoma diretamente em proteína. Fragmentos subgenômicos de RNA atuam como RNA mensageiro e operam como genes que codificam a enzima polimerase e três proteínas estruturais: a proteína do nucleocapsídeo (N), a proteína de membrana (M) e a proteína de superfície (S), sendo o peso molecular destas proteínas, respectivamente, 50KDa, 23 a 35KDa e 180KDa. A proteína S do VBIG é constituída de duas subunidades denominadas de S<sub>1</sub> e S<sub>2</sub>, cujos pesos moleculares são 90 KDa e 84KDa, respectivamente (Cavanagh e Naqi, 1997).

As proteínas S e M são ambas glicosiladas sendo toda a porção S<sub>1</sub>, parte de S<sub>2</sub> e cerca de 10% de M exposta na superfície do vírion. A heterogeneidade do peso molecular detectável na proteína M deve-se ao diferente grau de glicosilação. A proteína N está associada ao RNA viral para formar o nucleocapsídeo

helicoidal, sendo esta proteína apenas fosforilada (Koch et al., 1986; Mockett, 1985).

Variações na sequência de bases do genoma podem refletir em variações de aminoácidos na proteína traduzida. O determinante antigênico que induz à produção de anticorpos vírus neutralizantes e, que determina o sorotipo da amostra, está associado à subunidade S<sub>1</sub>. Essa porção é codificada pela região gênica que mais varia entre as amostras de VBIG. Como consequência da instabilidade no gene responsável pela sequência de aminoácidos de S<sub>1</sub>, há grande diversidade de sorotipos entre as amostras de VBIG. Regiões das proteínas S<sub>2</sub>, N e M correspondem às porções mais conservadas entre as amostras de VBIG (Cavanagh, 1983; Cavanagh 1986a, b; Holmes, 1990; Collisson et al., 1992; Jackwood et al., 1992; Karaca, 1992; Kwon et al., 1993).

Os coronavírus têm forte especificidade quanto às espécies e tecidos hospedeiros (Wege et al., 1982) e, segundo Dhinakar (1997), o tropismo por tecido e a persistência da infecção podem estar relacionadas também com a idade da ave.

As glicoproteínas virais assumem importante papel no ciclo vital do vírus. Para o desenvolvimento da infecção, as glicoproteínas interagem com receptores de membrana da célula do hospedeiro, a fim de introduzir o genoma no citoplasma celular (Cavanagh e Naqi, 1997)

O RNA do coronavírus é recoberto pela nucleoproteína (N) e envelopado por uma membrana lipídica dupla, que contém glicoproteínas incorporadas. Este envelope é adquirido pelo vírion ao brotar da região limite entre o retículo endoplasmático rugoso (RER) e complexo de Golgi (CG), organelas que contêm a glicoproteína M embebida na membrana. Nestas, a presença de M permite integração com N na montagem do vírion (Holmes, 1990; Collisson et al., 1992)

A proteína S, essencial para a infectividade, é incorporada ao vírion já envelopado no CG (Holmes et al., 1990), sofre modificações durante o transporte dos vírions pelo CG, adquirindo capacidade de fusão à célula alvo. Cópias da nucleoproteína formam o nucleocapsídeo revestindo o RNA. As proteínas

estruturais M e S são glicosiladas no CG. A proteína N é fosforilada em sítios de serina mas não é glicosilada, não sendo entendido o papel de sua fosforilação (Holmes, 1990; Collisson et al., 1992; Koch et al., 1990).

### 2.1.2 A doença

Segundo Cavanagh e Naqi (1997), a BIG é uma doença aguda e altamente contagiosa que acomete as galinhas. Foi descrita, pela primeira vez por Schalk e Hawn em 1931 nos Estados Unidos, como uma nova doença respiratória que ocorria em pintinhos, sendo denominada de bronquite infecciosa. Van Roekel et al., (1951) e Broadfoot e Smith (1954) descreveram, pela primeira vez, os efeitos de BIG na produção e qualidade de ovos. Em 1962, foi descrita a síndrome nefrite-nefrose por Cumming na Austrália e, no mesmo período, Winterfield descreveu a mesma síndrome nos Estados Unidos (Dhinakar e Jones, 1997; Winterfield, 1962).

A doença pode ocorrer sob três formas clínicas principais, independentes ou associadas. O quadro respiratório caracteriza-se por coriza, espirros, estertores traqueais e elevada mortalidade nos pintinhos nas primeiras semanas de vida (Cavanagh e Naqi, 1997). Outra forma clínica afeta o sistema reprodutor de poedeiras, causando diminuição da taxa de postura, de eclodibilidade e da qualidade interna (clara aquosa) e externa (casca mole, ausente ou rugosa) dos ovos. Apesar da taxa de mortalidade ser baixa, as lesões podem ser permanentes (Cavanagh e Naqi, 1997, <sup>52</sup> et al., 1985). A síndrome nefrite-nefrose, acomete frangos de corte e aves adultas, sendo caracterizada por insuficiência renal. O órgão apresenta-se aumentado de volume com acúmulo de uratos nos túbulos renais. As consequências para frangos de corte são menor ganho de peso, pior conversão alimentar e aumento da mortalidade (Cavanagh e Naqi, 1997).

Recentemente, foi isolada uma amostra variante do VBIG, denominada de 793/B, oriunda de um plantel de frangos de corte, cujas aves apresentavam miopatias bilaterais, atingindo ambos os músculos peitorais (profundo e superficial) (Dhinakar e Jones 1997).

A BIG está amplamente disseminada em todas as regiões do mundo, inclusive no Brasil (Hipólito, 1957; Di Fabio, 1993; Cavanagh e Naqi, 1997; Dhinakar e Jones 1997).

## 2.2 Anticorpos monoclonais

A tecnologia de produção de hibridomas secretores de anticorpos monoclonais foi desenvolvida por Köhler e Milstein (1975). Desde então tem crescido a pesquisa relacionada à produção e utilização de anticorpos monoclonais (Campbell, 1991).

Com o objetivo de obter plasmócitos que sintetizam anticorpos de especificidade pré-definida, células tumorais da linhagem hematopoéticas podem ser fundidas com linfócitos comprometidos com a especificidade desejada. As células resultantes deste processo teriam a capacidade contínua de crescimento, aliada à capacidade de produção específica de anticorpos. Essencialmente, o refinamento da técnica envolveu a seleção das estirpes mutantes da linhagem tumoral de plasmócitos, as quais não secretam anticorpos assim como são deficientes em rotas metabólicas, para permitir a seleção apenas de híbridos desejáveis na cultura celular (Köhler e Milstein, 1975; Antczak, 1982; Campbell, 1986).

Diversas aplicações dos AcM têm sido descritas na literatura. Uma das mais úteis para a sistemática em microbiologia é a detecção de determinantes antigênicos diferentes entre estirpes de microrganismos e a utilização destas diferenças para diagnóstico específico da amostra, assim como da posição filogenética em comparação com outras amostras.

Para o estudo de VBIG, diversos AcM têm sido desenvolvidos tanto para o estudo sorológico de amostras isoladas em surtos da doença, como para a detecção de antígeno de VBIG *in situ*, utilizando, por exemplo, métodos de imunofluorescência e imunoperoxidase (Cavanagh e Naqi, 1997).

### 2.2.1 Linhagem de plasmacitomas Sp2/0-Ag 14

Linhagens de mielomas foram selecionadas inicialmente para serem deficientes na enzima hipoxantina guanina fosforibosil transferase

(HGPRTase), posteriormente melhoradas, apresentando características desejáveis para cada finalidade. A deficiência na enzima HGPRTase permite a seleção dos hibridomas após a fusão, pois somente os mielomas que se fundiram com esplenócitos serão capazes de crescer no meio contendo hipoxantina, aminopterina e timidina. Basicamente, a aminopterina bloqueia a via de salvação de síntese de DNA das células e, somente aquelas células que possuem a *via de novo* (que utiliza a enzima HGPRTase) serão capazes de sobreviverem, desde que o meio seja suplementado com hipoxantina e timidina. Como os plasmacitomas são deficientes nessa enzima, eles só sobreviverão na presença da aminopterina se o processo de fusão for realizado com sucesso. Assim, o linfócito fornecerá para a célula híbrida o caráter genético para a síntese da enzima necessária para a sobrevivência neste meio (Harlow e Lane, 1988; Paul, 1975).

As células da linhagem Sp2/0\_Ag14, que foram utilizadas no presente trabalho, representam a quarta geração de mielomas de camundongos Balb/c, não secretoras e consagradas como boas formadoras de híbridas estáveis (Catty, 1986; Harlow e Lane, 1988, Shulman et al., 1978). Estas são mantidas rotineiramente em meio RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute), suplementado com L-glutamina, soro fetal bovino (SFB) na concentração final de 10%, penicilina 100 U/mL, estreptomomicina 100µg/mL, fungizona 10mg/l e tioguanina 20µM (Campbell 1986). RPMI 1640 possui baixas concentrações de cálcio e magnésio, cofatores de agregação celular e fixação, sendo portanto adequado para o cultivo celular em suspensão (Darling e Morgan, 1994).

## 2.3 ELISA

A primeira utilização do ELISA para detecção de anticorpos foi descrita por Engvall e Perlman em 1972, como um teste sensível e de baixo custo.

Os ensaios imunoenzimáticos baseiam-se na conversão de substrato colorimétrico por uma enzima conjugada a anticorpos de especificidade definida. Ou seja, a fixação de anticorpos ao seu respectivo antígeno é revelada pela enzima conjugada que agindo sobre o seu substrato, o torna colorido.

No caso do ELISA indireto, este envolve três estágios: no primeiro estágio, há reação entre o antígeno e o anticorpo específico (anticorpo primário). O segundo consiste na detecção desta reação pelo uso de imunoglobulina anti-imunoglobulina (anticorpo secundário) da espécie do anticorpo primário, utilizada no primeiro estágio, conjugada com uma enzima e, no último estágio, a adição do substrato específico da enzima (conjugado) utilizada no segundo estágio. A intensidade da reação é diretamente proporcional à quantidade de conjugado especificamente retido na microplaca, a qual pode ser quantitativamente medida em um espectrofotômetro (Harlow e Lane, 1988).

A técnica tem sido amplamente adaptada e usada para o diagnóstico de infecções de importância médica e veterinária, com disponibilidade de reagentes altamente purificados (Gonçalves, 1996; Voller et al., 1976).

#### 2.4 Western blotting

*Western blotting* refere-se ao processo de eletroforese de um antígeno protéico em gel de poliacrilamida após solubilização por detergente (*sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*, SDS-PAGE) seguido pela sua transferência para uma base sólida como nitrocelulose ou outros suportes porosos. Seu nome originou-se do uso do termo *Southern blotting* (em homenagem a E. J. Southern) para análises de fragmentos de DNA utilizando sonda de RNA. O subsequente desenvolvimento do método de análise de RNA utilizando sonda de DNA, foi denominado de *Northern blotting*. O nome, portanto, originou-se de uma brincadeira em referência às duas técnicas que antecederam (Campbell, 1991).

*Western blotting* foi originalmente desenvolvido por Towbin et al. (1979), que utilizaram soro. Essa técnica está amplamente comprovada como uma ferramenta excepcional na tecnologia de hibridomas (Campbell, 1991), que permite a investigação da especificidade dos AcM aos componentes em análise.

A presença do material transferido do gel da eletroforese para o suporte sólido (e.g.

nitrocelulose) pode ser revelada em ensaios imunológicos, com a detecção específica dos componentes antigênicos por reação com anticorpo, este detectado por anticorpo secundário anti-espécie, marcado, por exemplo, em ensaios imunoenzimáticos, por enzima, que, por sua vez atua sobre o substrato específico, resultando na coloração das bandas especificamente reconhecidas pelo anticorpo primário.

Os dois tipos básicos de equipamentos para transferência (*blotagem*) são os denominados "úmido" e semi-seco (*semi-dry*). O sistema *semi-dry* é o mais rápido e possibilita a transferência de diversos géis simultaneamente e, além disso, possui um custo mais reduzido quando comparado com o método úmido. O método *semi-dry* foi descrito pela primeira vez por Kyhse-Andersen em 1984 (Campbell 1991, Trans-blot 1995).

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Local de realização dos experimentos

O projeto foi desenvolvido no Setor de Doenças das Aves do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva da Escola de Veterinária da UFMG.

#### 3.2 Animais experimentais

Foram utilizadas fêmeas de camundongos Balb/c, com idade entre 4 a 6 semanas, adquiridas do Centro de Bioterismo do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da UFMG e *Gallus gallus domesticus* reprodutores SPF para a produção de ovos embrionados. Embriões SPF de 9 a 11 dias de incubação (Petersime, Brasil) foram utilizados para os cultivos de vírus.

#### 3.3 Produção de antígenos de VBI

A produção do antígeno constituiu-se de três etapas que foram: a produção do concentrado viral, a purificação em gradiente de sacarose e a determinação, por ELISA, das frações onde se encontrava o vírus purificado.

##### 3.3.1 Produção dos concentrados virais

Para a realização desta etapa, foram utilizadas as amostras M41, A5968 e Ark-99 dos sorotipos Massachusetts (Mass), Connecticut (Conn) e Arkansas (Ark), respectivamente, disponíveis no Setor de Doenças das Aves e adquiridas da *American Type Culture Collection* (ATCC). A produção dos antígenos foi realizada conforme Cavanagh (1984) e Villegas (1985).

Para cada partida de vírus, ovos férteis de galinhas SPF, entre 9 e 11 dias de incubação, foram inoculados com 100 doses infecciosas para embrião de galinha 50% (DIOEG<sub>50</sub>), via cavidade cório-alantóide. O vírus estoque foi diluído para a concentração final de 10 DIOE<sub>50</sub>/0,1mL em PBS estéril contendo penicilina G potássica 12.500UI/mL, sulfato de estreptomicina 12,5mg/mL e sulfato de gentamicina 250µg/mL (apêndice 7.1.6). Após a inoculação os ovos foram incubados por 72 horas a 37°C e umidade de 80% em incubadora industrial (Petersime, Brasil). Os embriões vivos após este período foram resfriados por 12 horas a 4°C.

Cada procedimento de inoculação de embriões com cada amostra de VBIG foi intercalada por um período mínimo de sete dias, com completa desinfecção de materiais e ambiente. As inoculações e coletas foram efetuadas em cabine de fluxo laminar vertical (Trox FLV420, Brasil) equipada com filtro HEPA e lâmpada ultravioleta, que foi ligada 15 minutos antecedentes às inoculações. Todo material descartado foi imediatamente transferido para um balde com tampa contendo formol a 10%.

Dez embriões vivos inoculados foram deixados em incubação para verificação, 7 dias após a inoculação, de nanismo e enrolamento de embrião, bem como a presença de uratos acumulados nos mesonefros, sendo estas características de replicação de VBIG (Cavanagh, 1997). Durante o mesmo período, dez embriões não inoculados foram mantidos para comparações como controles negativos.

O líquido alantóide (LA) foi colhido em *pool*, sendo adicionado inibidor de protease (fenil metil sulfonil fluorato- PMSF) (apêndice 7.1.2) na concentração de 1mg/litro de líquido alantóide e clarificado por centrifugação a 10.000xg por 40 minutos a 4°C (Solvall RC-2B, EUA). O LA sobrenadante clarificado obtido foi

novamente tratado com PMSF como descrito. Para a concentração, o LA, solução saturada tamponada de sulfato de amônia (apêndice 7.1.1), foi adicionada por gotejamento lento, em banho de gelo, até atingir a concentração final de 36%. O material insolubilizado foi recuperado por centrifugação a 10.000xg/40min/4°C (Solvall RC-2B, EUA). O sedimento obtido foi ressuscitado em PBS (apêndice 7.1.3) estéril num volume 100 vezes menor que o volume original de LA. Este concentrado foi dialisado duas vezes consecutivas em PBS (1dialisado/1000 PBS) contendo azida sódica 2g/litro, num período de 48 horas a 4°C. As membranas de diálise com capacidade de reter proteínas com peso molecular superior a 12 KDa (Thomas, EUA) foram previamente lavadas em detergente neutro (Extran, Merck), fervidas em água destilada e enxaguadas em água deionizada. O material dialisado foi denominado de concentrado viral. Este concentrado viral foi submetido ao teste de hemaglutinação, a fim de assegurar a não contaminação com o vírus da doença de Newcastle (*Paramyxoviridae*, subfamília: *Paramyxovirinae*, gênero: *Rubulavirus*).

### 3.3.2 Purificação dos concentrados virais

Foram colocados cuidadosamente 2 mL de cada solução de sacarose de concentrações 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50% e 55% (apêndice 7.1.5) em tubos de 20 mL, obedecendo a ordem de concentração crescente no sentido da superfície para o fundo do tubo, a fim de formar um gradiente contínuo de concentração (Griffith, 1983). Após repouso de 24 horas a 4°C, 1mL do concentrado viral foi adicionado lentamente sobre o gradiente. Em seguida, os tubos foram centrifugados 40.000xg (Sorvall Ultra Pro 80, rotor AH629, EUA) por 16 horas a 4°C (Cavanagh, 1983).

Frações de aproximadamente 150µL foram coletadas manualmente, perfurando o fundo do tubo e a pesquisa da presença do vírus nas alíquotas das frações de sacarose foi realizada utilizando o ELISA como descrito no item 3.3.3.

### **3.3.3 ELISA para avaliação dos antígenos de VBIG purificados**

Um ELISA indireto das frações de gradiente de sacarose, teve como objetivo a detecção do VBIG purificado. O teste foi baseado na descrição de Engvall e Perlman (1972) e modificado por Hudson e Hay (1989). O protocolo consistiu da sensibilização de microplacas de 96 minicavidades (Corning, EUA) a 4°C/12 horas com alíquotas das frações oriundas da purificação de VBIG, diluídas a 1:16 em tampão carbonato/bicarbonato pH 9,6 (apêndice 7.2.6), em repetições para permitir a reação por 30 minutos a 37°C com soro de camundongos imunizados com VBIG e anticorpo monoclonal (A13) anti S<sub>1</sub> (gentilmente cedido pelo Institute for Animal Health, Compton, Inglaterra), duplicatas de cada. Anticorpo policlonal ou monoclonal especificamente aderido foi detectado por reação com conjugado fosfatase alcalina anti-IgG de camundongo (SIGMA, EUA; apêndice 7.2.2) a 37°C/30 min reação com substrato p-nitrofenil fosfato (pNPP - SIGMA, EUA) (apêndice 7.2.3) a 37°C por 30 minutos e, finalmente, paralisação da reação com NaOH a 3N. A leitura foi realizada em leitor Microwell Reader Modelo 550 (BioRad, EUA) utilizando filtro 405nm. Todos os volumes utilizados foram de 50µL por minicavidade e entre cada procedimento utilizou-se PBS com 0,05% Tween 20 (PBS-T) (apêndice 7.2.1) em três lavagens. Todas as alíquotas da purificação de VBIG com reação significativa no ELISA (absorvância superior a 1,000) foram colhidas em pool para a avaliação da concentração protéica como descrito no item 3.3.5.

O AcM A13 foi utilizado para detectar a presença de antígenos de VBIG na primeira partida de vírus produzida, após essa detecção, a amostra viral foi utilizada para a inoculação dos camundongos. Na segunda partida de vírus produzida, utilizou o soro de camundongos para detecção de antígenos virais seguida pela confirmação com o AcM A13 e, finalmente, após esta etapa foi utilizado apenas o soro do camundongo para a detecção do antígeno viral nas subsequentes partidas.

### **3.3.4 Concentração dos antígenos de VBIG**

Para a concentração do antígeno de VBIG, adicionou-se 30 mL da fração de sacarose com reação no ELISA (item 3.3.3) em membrana de diálise com capacidade de reter partículas com peso molecular superior a 12 KDa (Thomas, EUA), previamente tratada como descrito no item 3.3.1, e foi acondicionada em solução de polivinilpirrolidone (PVP) mantendo-a em geladeira até que o volume final do antígeno fosse reduzido para 1mL.

### **3.3.5 Determinação da concentração protéica dos antígenos de VBIG**

A determinação da concentração protéica da amostra foi realizada pelo método de Lowry, baseado no protocolo descrito por Hudson e Hay (1989).

Foram utilizados quatro tubos de ensaio onde se adicionou, a cada tubo, 1mL da solução 1 (apêndice 7.1.10). A esta solução foram adicionados, ao tubo 1 e 2 (duplicata) 100µL da amostra (Diluída a 10<sup>-1</sup> em água MilliQ 18,2 MΩcm), no tubo 3, 100 µL do padrão de albumina sérica bovina (apêndice 7.1.11) diluído 10<sup>-1</sup> em água MilliQ 18,2 MΩcm e no tubo 4, 100µL de água MilliQ 18,2 MΩcm (branco da reação), homogeneizados e incubados por 10 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, 100 µL de reagente Folin e Fenol de Ciocalteus, diluído a 1:3 em água MilliQ 18,2 MΩcm, foi adicionado em cada tubo, homogeneizados e incubados por mais 10 minutos à temperatura ambiente. Foram transferidos 100 µL da solução final de cada tubo de ensaio para uma microplaca de ELISA, realizando a leitura em leitor de ELISA Microwell Reader Modelo 550 (BioRad, EUA) com filtro de 655 nm, zerando o aparelho com o branco da reação.

### **3.4 ELISA para a detecção de anticorpos dos camundongos**

O ELISA foi padronizado segundo descrito por Campbell, 1986.

Para a padronização do antígeno, alíquotas do pool de VBIG purificado foram diluídas como segue em tampão carbonato/bicarbonato pH 9,6:

1:10, 1:20, 1:30, 1:40, 1:50, 1:60, 1:80, 1:90, e 1:100 e utilizadas para sensibilizar as microplacas de 96 minicavidades (Corning, EUA). Os soros dos camundongos previamente imunizados foram diluídos em PBS-T a 1:200, 1:400, 1:800, 1:1600, 1:3200, 1:6400, 1:12800 e 1:25600. Após a realização do teste, como descrito no item 3.3.3, escolheu-se a maior diluição viral capaz de produzir reação colorimétrica superior ao ponto de corte (1.000) com a maior diluição do soro. Esta diluição viral foi a utilizada para os testes de ELISA subsequentes.

Para a determinação do ponto de corte do ELISA utilizado nas análises dos hibridomas, foram realizados 96 testes com sobrenadantes do meio utilizado no crescimento das Sp2/0-Ag-14, calculando a média das absorvâncias e adicionando 1,96x dos desvios padrões ( $p < 0,05$ ). Nos ELISA utilizados para titulação dos soros de camundongos, foram realizados 48 testes com soro de camundongos não inoculados, calculando a média das absorvâncias e adicionando 1,96 vezes o desvio padrão ( $p < 0,05$ ). Em todos os testes sempre foram utilizados 50 $\mu$ L dos reagentes por minicavidade.

A menor concentração de Antígeno purificado de VBIg capaz de detectar, eficientemente, a presença de AcM foi de 30 $\mu$ g/mL.

### 3.5 Imunização dos camundongos

A imunização dos camundongos foi realizada utilizando antígeno da amostra M41, produzido como descrito nos itens 3.3.1 e 3.3.2. Aplicou-se, via intra-peritoneal, 0,5 mL de antígeno, contendo de 50-80 $\mu$ g de proteínas por dose, com intervalos de 15 dias entre as inoculações, em três aplicações consecutivas. Sete dias após a última aplicação, avaliou-se o título de anticorpos dos camundongos, através da diluição seriada do soro em base 2 e determinação do título pelo ELISA (semelhante ao item 3.6.4, diferindo quanto ao anticorpo primário (soro dos camundongos) ao invés dos sobrenadantes. Estando o título acima de 10.000 aplicou-se um reforço três a quatro dias antes da fusão. Para a primeira imunização, o antígeno foi emulsionado com adjuvante completo de Freund, em partes iguais e, em todas demais aplicações, foi utilizado o adjuvante incompleto

de Freund na mesma proporção. Os camundongos imunizados que não foram utilizados para a fusão foram sacrificados e tiveram seus esplenócitos congelados como descrito no item 3.6.1.1 para posterior fusão.

### 3.6 Produção de anticorpos monoclonais

O estabelecimento de cultivos de híbridos produtores de anticorpos monoclonais foi desenvolvido conforme descrito por Hudson e Hay (1988), Marusich (1988) e Campbell (1986). Para cultivos de células em condições de esterilidade e mínimo risco de contaminação dos mesmos, foram utilizadas máscaras, gorros e aventais cirúrgicos autoclavados. Para a remoção e fragmentação do baço, para liberação dos esplenócitos, foi utilizado material cirúrgico estéril. Todo o trabalho que exigiu condições de esterilidade foi realizado em fluxo laminar (Trox FLV420, Brasil).

#### 3.6.1 Preparo dos esplenócitos

O camundongo foi selecionado e executada a eutanásia em câmara mortuária, lavado externamente com amônia quaternária 1:1000 e iodo povidine. O baço foi removido em fluxo laminar (Trox FLV420, Brasil) com instrumental cirúrgico e lavado em meio RPMI 1640 sem soro (Sigma, EUA) (item 7.4.1) por duas vezes, sendo os linfócitos liberados com auxílio de tesoura e pinça. A suspensão de células foi lavada três vezes, com RPMI 1640, por centrifugação a 250xg (Fânen Excelsa, Brasil) durante 15 minutos à temperatura ambiente. Após a última lavagem, as células foram ressuspendidas em 1mL de RPMI e uma alíquota foi coletada e diluída 100x em azul de tripan 0,3%, a fim de determinar a viabilidade celular em câmara de Neubauer.

#### 3.6.1.1 Congelamento dos esplenócitos

Os camundongos que apresentavam títulos adequados para serem doadores de esplenócitos (títulos superior a 10.000) foram sacrificados e seus esplenócitos foram preparados como descrito no item 3.6.1 e congelados como descrito no item 3.6.6. A ampola foi identificada com a quantidade de esplenócitos, de acordo com a contagem (item 3.6.1) e o antígeno utilizado para a imunização dos camundongos.

### 3.6.1.2 Preparo dos esplenócitos congelados

Para a utilização dos esplenócitos congelados, estes foram descongelados em banho-maria a 37°C, transferidos para o tubo de fundo cônico de 15 mL, lavados duas vezes com meio RPMI 1640 (item 7.4.1) e centrifugados a 250xg (Fanen, Brasil) por 7 minutos à temperatura ambiente. Neste momento, o processo de fusão foi seguido como descrito no item 3.6.3.

### 3.6.2 Preparo das Sp2/0\_Ag14

As células de mielomas foram descongeladas 4 dias antes da fusão, em banho-maria a 37°C e cultivadas em meio RPMI 1640 (apêndice 7.4.1) adicionado com 10% de soro fetal bovino (Gibco/BRL, EUA) a 37°C em estufa contendo 5% de CO<sub>2</sub> sendo repicados 24 horas antes da fusão, a fim de estimular a mitose celular. No dia da fusão, após a centrifugação a 250xg por 10 minutos à temperatura ambiente, o conteúdo celular de Sp2/0\_Ag14 de duas garrafas de cultivo de 75cm<sup>2</sup> foi concentrado em 1mL de meio RPMI 1640 (item 7.4.1). Determinou-se a viabilidade celular em câmara de Neubauer, diluindo 10 vezes uma alíquota do meio contendo as células em azul de tripan 0,3% (apêndice 7.4.5).

### 3.6.3 Fusão

Para a realização da fusão foi utilizada a proporção de 1 célula Sp2/0\_Ag14 para 10 esplenócitos. As células foram transferidas para um tubo de fundo cônico de 15mL e centrifugadas a 500xg por 7 minutos à temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspendidas em 0,8mL de polietilenoglicol 1500 50% peso/volume (Sigma, EUA), previamente aquecido a 37°C, por um período de 1 minuto. Em seguida foram adicionados 5mL de meio RPMI 1640 livre de soro (apêndice 7.4.1) por um período de 1 minuto e, finalmente, foram adicionados 10mL do mesmo meio por um período de 5 minutos. O tubo foi centrifugado a 200xg por 10 minutos temperatura ambiente, o sobrenadante foi descartado e as células transferidas para um tubo de fundo cônico de 50mL e ressuspendidas em 35 mL de meio HAT contendo 10% de soro fetal bovino (apêndice 7.4.3). As células foram distribuídas em sete

placas de cultivo celular de 96 minicavidades e incubadas em estufa com atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C. A posição A1 das placas mantida com cultivo de células Sp2/0\_Ag14, a fim de servir como controle de morte celular por ação da aminopterina do meio HAT e meio sobrenadante como branco no ELISA no processo de seleção.

### 3.6.4 Seleção de híbridos após a fusão

A seleção dos híbridos secretores de AcM anti-VBIG/M41 foi realizada por teste dos meios de cultivo sobrenadantes em ELISA (item 3.4). Decorridas duas semanas da fusão, 50 µL do sobrenadante de cada minicavidade foi transferido para a microplaca de ELISA de 96 minicavidades (Corning, EUA) previamente sensibilizada com VBIG, conforme a padronização descrita em 3.4, obedecendo a mesma disposição do cultivo. Deixou-se o sobrenadante reagir por uma hora a 37°C. Adicionou-se imunoglobulina de cabra anti-imunoglobulina de camundongo conjugada com enzima fosfatase alcalina (apêndice 7.2.2), deixando reagir por uma hora a 37°C. Em seguida, foi adicionado o substrato pNPP (item 7.2.3) ficando em incubação por 40 minutos. A reação foi interrompida com NaOH a 3N (apêndice 7.2.5). A determinação dos resultados foi realizada com leitor de ELISA (BioRad, EUA) equipado com filtro de 405 nm e o volume de todos os reagentes utilizado durante o teste foi sempre de 50µL. Para a remoção do excesso de reagente, após cada reação, foram realizados três ciclos de lavagem utilizando 300µL de PBS-T (apêndice 7.2.1) por minicavidade.

### 3.6.5 Clonagem dos híbridos

Os híbridos positivos no ELISA (item 3.6.4) foram caracterizados quanto à sua especificidade por meio do *western blotting* (item 3.7.2). A partir desta análise, foram selecionados os híbridos para a clonagem. As células foram contadas em câmara de Neubauer, diluindo uma alíquota do meio contendo as células a 1:10 em azul de tripan 0,3%. Foram realizadas duas clonagens por diluição limitante. A primeira contendo uma célula/100µL e a reclone contendo 0,5 célula/100µL. Estas foram distribuídas em

quatro microplacas de cultivo celular de 96 minicavidades no processo de clonagem e em duas microplacas no processo de reclone. Decorridos três a quatro dias de crescimento celular, os clones foram selecionados por microscopia óptica e aquelas minicavidades contendo apenas uma colônia celular foi testada por ELISA (item 3.6.4) após 14 dias de cultivo e, em seguida, no *western blotting* (item 3.7.2). Os clones selecionados foram expandidos e congelados (item 3.6.6). Para a expansão, todas as minicavidades foram revestidas previamente com cultivo em monocamada de macrófagos peritoniais de camundongos Balb/c não inoculados, cultivados 24 horas antes.

### 3.6.6 Congelamento de células

O congelamento das células foi realizado conforme descrito por Campbell (1986), com modificações. Este processo foi executado para a conservação de Sp2\_Ag14, hibridomas e esplenócitos. As células a serem congeladas, após centrifugação a 200xg (Fanen, Brasil) por 10 minutos, foram ressuscitadas em 1 mL de meio para congelamento (item 7.4.4) e transferidas para tubos de criogenia (Corning, EUA), devidamente identificados com o nome da célula e a contagem, quando necessário. Estes foram mantidos imersos em frasco contendo álcool comercial 96°GL a -70°C, por um período mínimo de 12 horas e máximo de três dias. Após o período a -70°C, os criotubos foram transferidos para o botijão de nitrogênio líquido, onde foram mantidos por tempo indeterminado.

## 3.7 Caracterização dos anticorpos

Para a caracterização dos AcM, foram utilizados testes para determinar o isotipo ou classe da imunoglobulina e a sua especificidade.

### 3.7.1 Isotipagem

Para a determinação da classe e da subclasse dos AcM foi utilizado o "Mouse monoclonal sub-isotyping kit - K5151" (American Qualex, EUA), seguidas as recomendações do fabricante. Este consiste em um ensaio imunoenzimático com anticorpos secundários específicos contra cada classe e subclasse de imunoglobulina de camundongo.

### 3.7.2 Especificidade

A especificidade dos AcM foi determinada pelo método de *western blotting* em membrana de nitrocelulose de 0,2µm. Dentre a população de hibridomas secretores de AcM, foram selecionados dois que reconheceram as proteínas compatíveis em peso molecular com as proteínas N ou S<sub>2</sub> do VBIG/M41. Estes foram selecionados para posterior teste de reconhecimento das amostras heterólogas A5968 (sorotipo Connecticut) e Ark-99 (sorotipo Arkansas). Os demais foram congelados com descritos no item 3.6.6.

#### 3.7.2.1 Eletroforese do VBIG purificado

A eletroforese foi baseada nos métodos descritos por Laemmli 1970 e Promega, 1996.

O VBIG purificado foi preparado para a eletroforese misturando-o ao tampão da amostra (apêndice 7.3.5) na proporção de 1:2. Na mistura adicionou-se 5% de 2-mercaptoetanol, aquecendo-a em água fervente por 7 minutos. Os géis de poliacrilamida foram montados em placas de vidro (90x60mm) e separados por espaçadores de 0,75mm de espessura. Os géis de corrida e aplicação foram utilizados na concentração total de poliacrilamida (T%) de 10% e 4,0% respectivamente. A concentração de *crosslink* (%C) foi de 2,67% para ambos. As soluções utilizadas para a realização da eletroforese, transferência e *western blotting* estão descritas no apêndice 7.3. A eletroforese foi realizada em 60V constantes durante a corrida no gel de aplicação e 100V constantes para a corrida no gel de separação (fonte BioRad), sendo ambos em temperatura ambiente. Foram adicionados 600µg de proteína do VBIG em canaleta única num volume final de 400µL. A determinação da proteína foi realizada pelo método de Lowry, baseado no protocolo de Hudson e Hay (1989) e descrita no item 3.3.5.

#### 3.7.2.2 Western blotting

O *western blotting* foi realizado com o objetivo de determinar a especificidade dos AcM quanto a porção viral. O teste constituiu de duas etapas,

a primeira foi a eletroforese para separação das proteínas virais e a eletrotransferência para a membrana de nitrocelulose, e a segunda etapa, foi a detecção, pelos anticorpos monoclonais, dos componentes virais compatível em peso molecular com as proteínas virais.

A eletrotransferência das proteínas virais dos géis de poliacrilamida para as membranas de nitrocelulose foi realizada pelo método "semi-dry", segundo metodologia descrita por Kyhse-Anderson (1984), Bjerrum e Schafer-Nielsen (1986), seguindo o manual de instruções *Trans-Blot® Semi-dry electrophoretic transfer cell* (1995).

Ao término da eletroforese, os géis foram imersos em tampão de transferência por 30 minutos antes do início da transferência, assim como as membranas de nitrocelulose e os papéis de filtro.

Para a realização da transferência das proteínas presentes no gel para a membrana de nitrocelulose, montou-se um "sanduíche" sobre o anodo de platina na seguinte ordem: uma folha de papel de filtro, a membrana de nitrocelulose, o gel de corrida e outro papel de filtro.

A transferência foi realizada no aparelho *Transblot* (BioRad, EUA) em 25 volts constantes por um período de 25 minutos, à temperatura ambiente.

Ao término do processo, foi realizada a coloração do gel pelo azul de *Coomassie* (apêndice 7.3.16), para comprovar a completa transferência das proteínas virais. Brevemente o protocolo consistiu de fixar os géis, em solução fixadora (apêndice 7.3.15) por 1 hora; transferindo-os para a solução corante (apêndice 7.3.16) por 30 minutos e, finalmente, substituição da solução corante por solução descorante (apêndice 7.3.17). Em seguida, as membranas foram lavadas, deixando-as imersas em TBS-T (item 7.3.14) por 5 minutos em agitação constante, sendo esta última operação repetida por mais duas vezes. Então, as membranas foram embaladas em filme PVC e congeladas, em freezer a -20°C para posterior utilização.

As membranas de nitrocelulose com material de transferência e estocadas a -20 °C foram descongeladas por imersão em TBS-T (apêndice 7.3.14) à temperatura ambiente por 5 minutos em agitação constante, repetindo-se esta operação de lavagem por mais duas vezes. Em seguida a membrana foi bloqueada em tampão de bloqueio (apêndice 7.3.13) por 90 minutos, à temperatura ambiente, com agitação constante. A membrana foi acondicionada no sistema BioRad Mini-Protean®II Multi Screen (BioRad, EUA), incubando os sobrenadantes dos híbridos por 3 horas à temperatura ambiente. Após este período, foi adicionada imunoglobulina de cabra anti-imunoglobulina de camundongo conjugada à fosfatase alcalina (SIGMA A-3562) diluída a 1:10.000 em TBS-T (apêndice 7.3.14), deixando reagir por 60 minutos à temperatura ambiente. Finalmente, foi adicionado substrato estabilizado para fosfatase alcalina Western Blue® (Promega, EUA) deixando reagir até o aparecimento de banda visível no controle positivo (aproximadamente uma hora). Para cada etapa, foram utilizados 200µL de reagente por canaleta e entre cada uma foi realizada a lavagem da membrana com 10mL do TBS-T (item 7.3.14) por canaleta.

Como controle positivo foi utilizado soro do camundongo imunizado contra VBI<sub>G</sub>M41 e como controle negativo, utilizou-se meio sobrenadante oriundo do crescimento de Sp2/0 Ag-14.

### 3.8 ELISA utilizando amostras brasileiras

Após estabelecidos os híbridos e determinada a especificidade dos AcM para as proteínas N e S<sub>2</sub> por meio de *western blotting*, foi realizado um teste de ELISA dos AcM frente a amostras brasileiras e de referência.

As amostras brasileiras empregadas foram as 297, 283, PM1, PM2, PM3, 351, 29-78 e 327, isoladas de frangos de corte de Minas Gerais pelo Setor de doenças de aves da Escola de Veterinária (Tab. 1). As amostras de referência foram SE-17 (sorotipo Geórgia), Holland 52 (H52) (sorotipo Massachusetts) e M41. Todas as amostras foram cultivadas em OEG/SPF com 8 a 11 dias de incubação como descrito em 3.3.1, exceto para a concentração dos líquidos

3.3.1. exceto para a concentração dos líquidos alantóides das amostras locais, não sendo utilizada a precipitação com sulfato de amônia, mas, após colhidos em pool, foram concentrados em membrana de diálise com capacidade de reter partículas com peso molecular superior a 12 KDa (Thomas, EUA) imersas em PVP como descrito no item 3.3.4. Todas as amostras de referência foram obtidas da ATCC exceto a amostra H52 (sorotipo Mass) adquirida comercialmente como amostra vacinal. A dosagem de proteína foi realizada como descrito em 3.3.5 e realizada a diluição conforme o requerido pelo teste (Souza, 1999).

A realização do teste foi baseada no trabalho de Souza (1999) que consistiu na sensibilização de microplacas de ELISA de 96 minicavidades (Corning, EUA) com o antígeno de VBIg de cada amostra descrita acima diluído em tampão carbonato-bicarbonato pH 9,6 (apêndice 7.2.6), na concentração de 200µg de proteína/mL. As microplacas foram mantidas em câmara úmida por 24 horas a 4°C. Decorrido este período,

foram adicionados os AcM, em duplicata, deixando-os reagir por 1 hora a 37°C. Em seguida, foi adicionada imunoglobulina de cabra anti-imunoglobulina de camundongo conjugada à fosfatase alcalina (apêndice 7.2.2) e permitiu-se a reação por 30 minutos a 37°C. Na sequência, adicionou-se substrato pNPP (apêndice 7.2.3) deixando-o reagir por 40 minutos a 37°C, cuja reação foi paralisada com NaOH 3N. Como controle negativo, utilizou-se o vírus da Doença de Newcastle e, para a determinação do ponto de corte, foi determinada a média da absorvância dos controles negativos e adicionado 1,96 vezes o desvio padrão ( $p < 0,05$ ). Para a determinação das absorvâncias das amostras, foi calculada a média das absorvâncias das duplicatas. O volume utilizado para todas as etapas foi de 100µL e entre cada etapa realizou-se quatro lavagens com PBST (apêndice 7.2.1) num volume de 300µL/minicavidade. A leitura foi realizada em leitor de ELISA (BioRad, EUA) com filtro de 405nm

**Tabela 1-** Amostras do vírus da bronquite infecciosa das galinhas isoladas de casos clínicos da doença no em frangos de corte no Estado de Minas Gerais

Nº de identificação da amostra	Nº de passagens em OEG/SPF	Ano de isolamento	Principais sinais clínicos no surto
297	2	1983	Respiratório
283	2	1983	Síndrome nefrite nefrose
PM1	3	1987	Respiratório
PM2	2	1987	Respiratório
PM3	2	1989	Respiratório
351	3	1984	Síndrome nefrite nefrose
29-78	6	1978	Respiratório
327	2	1983	Síndrome nefrite nefrose

FONTE: SOUZA, 1999

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Produção de antígenos de VBIG

A produção média de líquido alantóide foi de 6,0 a 6,5mL por embrião inoculado para as amostras de VBIG. À necropsia dos embriões foi observado nanismo e enrolamento, bem como presença de uratos nos mesonefros, para assegurar que tais lesões não foram causadas por contaminação pelo vírus da doença de Newcastle, foi realizado o teste de hemaglutinação para cada partida do vírus. O teste de hemaglutinação, não evidenciou efeito hemaglutinante em nenhuma das amostras, resultado compatível com o VBIG.

Após a purificação do antígeno de VBIG obteve-se uma concentração de 250µg a 470µg de proteína por mL. Após a concentração em PVP, as amostras apresentaram concentração protéica variando de 5 a 10mg/mL.

### 4.2 Imunização dos camundongos

O esquema de imunização resultou em excelente resposta humoral específica contra o VBIG nos camundongos inoculados, detectada por ELISA. Todos apresentaram títulos igual ou superior a 25.000, não havendo nenhum caso de óbito causado por choque anafilático.

### 4.3 Produção de anticorpos monoclonais

Foram realizadas três fusões, duas utilizando esplenócitos frescos e uma utilizando esplenócitos congelados. Decorridos 14 dias após cada fusão, detectou-se, através do ELISA, a presença de anticorpos anti-VBIG/M41 nos meios sobrenadantes de 36 minicavidades oriundas da fusão com esplenócitos frescos, correspondendo a 2,6% do total de minicavidades. Da fusão realizada com esplenócitos congelados resultaram 17 híbridos viáveis, correspondentes a 2,5% do total.

Para a primeira fusão, utilizou-se cultivo de macrófagos peritoneais de camundongos concomitantemente aos híbridos, não sendo observada diferença na velocidade de multiplicação celular, morfologia dos híbridos e nem na produção de anticorpos, quando

comparada com as demais fusões que não foram utilizadas este artifício.

### 4.4 Caracterização dos AcM por *western blotting*

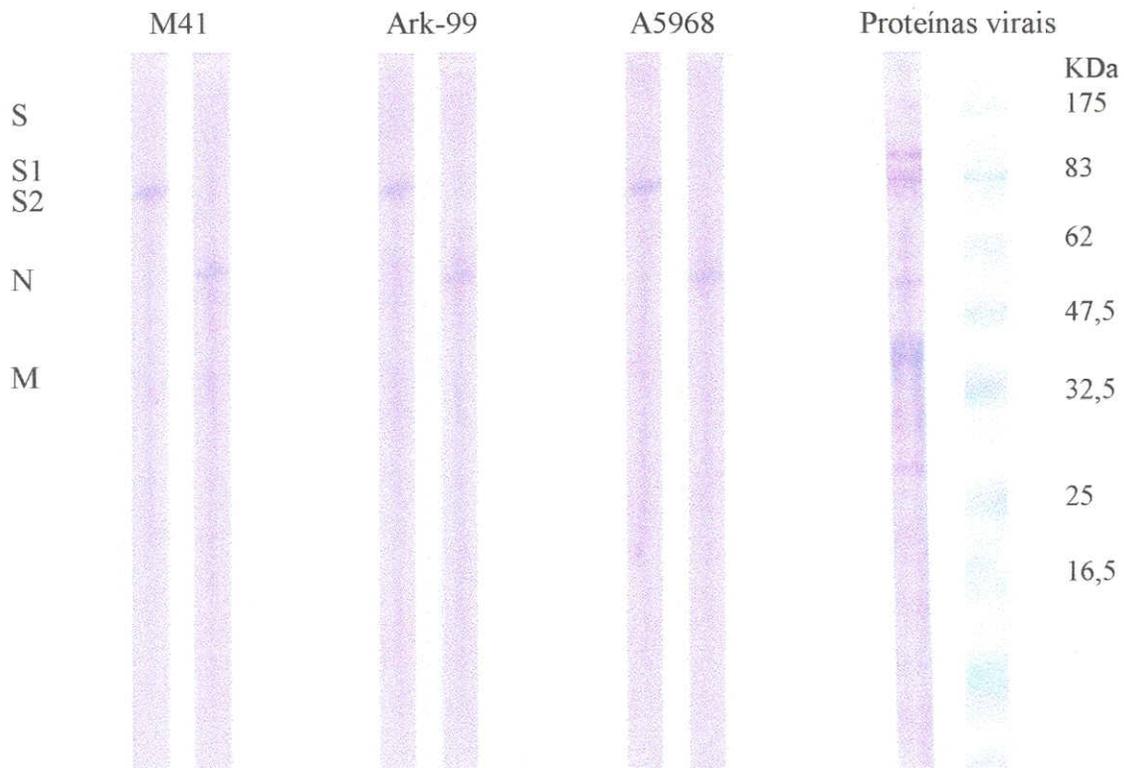
Os híbridos selecionados por ELISA, foram avaliados por *western blotting*, a fim de se determinar a especificidade dos mesmos.

Do total de híbridos iniciais, foi selecionada uma população de células (1B9), oriundas de uma mesma minicavidade, produtoras de AcM capazes de reconhecerem componentes estruturais compatível em peso molecular com a proteína N e a glicoproteína S<sub>2</sub> do VBIG\_M41. Os demais foram congelados de acordo com o descrito em 3.6.6.

O híbrido selecionado para clonagem (1B9), originou diversos clones, dos quais foram selecionados os clones 1B93D1 E 1B93E10 respectivamente por reconhecerem proteínas compatíveis em peso molecular com as proteínas N e S<sub>2</sub> do VBIG. Estes clones foram re-clonados originando os clones 1B9, 3D1, 12B2, 1B9. Os clones 3D1 e 3F10 foram denominados S12B2 e N3F10, com base na especificidade a N ou S, respectivamente e, testados contra as amostras Ark-99 (Ark\_99) e A5968 (Conn) no mesmo teste, obtendo-se o mesmo resultado (Fig. 1). Todas os demais hibridomas foram congelados.

Como controle do teste, utilizou-se o AcM A13 que formou a banda esperada de 90Kda com a amostra M41 e não com as demais. O sobrenadante de cultivo de Sp2/0-Ag14 não reagiu ao teste de *western blotting* (resultados não mostrados).

Figura 1. Avaliação das especificidades dos AcM S12B2 e N3F10 frente as amostras de VBIG M41, Arkansas 99 e A5968 em *western blotting*



Legenda:

Amostra de vírus submetida à eletroforese e transferência para a membrana de nitrocelulose:

M41: Amostra do sorotipo Massachusetts

Ark-99: Amostra do sorotipo Arkansas

A5968: Amostra do sorotipo Connecticut

AcM:

1: S12B2

2: N3F10

3: Soro do camundongo imunizado

4: Padrão de peso molecular

#### 4.6 Caracterização isotípica

Os AcM N3F10 e S12B2 foram avaliados caracterizados de acordo com o isotipo, sendo ambos pertencentes à subclasse IgG1.

#### 4.7 ELISA utilizando amostras brasileiras

O ponto de corte determinado foi de 0,060, sendo consideradas homólogas ao M41 todas as

amostras que apresentaram médias de absorvância superior a este valor.

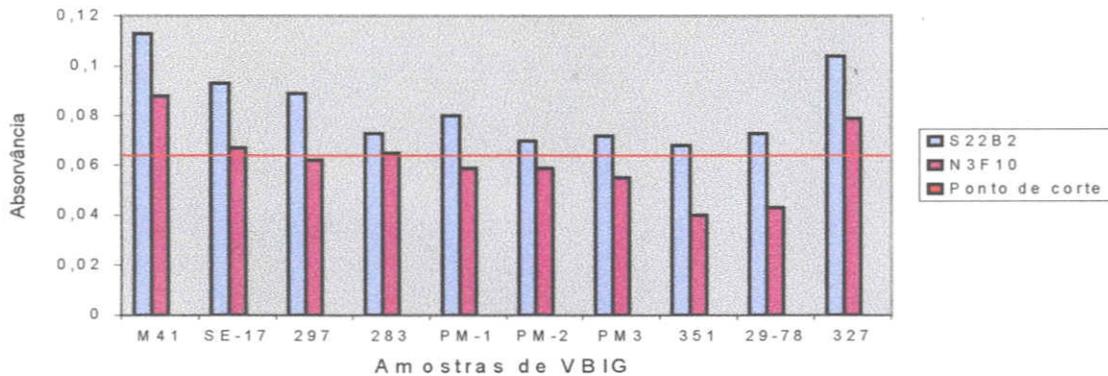
Os resultados das amostras de VBIG utilizadas são apresentados na tabela 2 e ilustrados na figura 2 (exceto a amostra H52).

**Tabela 2** – Médias das absorvâncias obtidas com as amostras de VBIG frente aos AcM S12B2 (anti-S<sub>2</sub>) e N3F10 (anti-N) em ELISA

VBIG \ AcM	M41	SE-17	H52	283	PM-1	PM-2	PM3	351	29-78	327	297
S12B2	0,113	0,093	1,024	0,073	0,08	0,07	0,072	0,068	0,073	0,104	0,089
N3F10	0,088	0,067	0,952	0,065	0,059	0,059	0,055	0,04	0,043	0,079	0,062

Densidade ótica a 492nm

Figura 2 - Valores médios de absorvância das amostras de VBIG em ELISA frente aos AcM S12B2 e N3F10



## 5 DISCUSSÃO

Em laboratórios que trabalham com ambos os vírus VBIG e o VDN devem padronizar um sistema de controle de qualidade para assegurar a não contaminação cruzada entre as amostras durante o processo de produção viral, uma vez que, as lesões macroscópicas podem ser confundidas. No laboratório do Setor de Doenças das Aves, é utilizado como controle preliminar de qualidade dos cultivos de VBIG o teste de hemaglutinação, pois o VDN possui atividade hemaglutinante, enquanto o VBIG não possui tal característica (Cavanagh et al., 1997).

Diversas vias para a imunização dos camundongos têm sido propostas, sendo que, no presente trabalho, a via intraperitoneal foi adequada para as inoculações, inclusive para o reforço final pré-fusão. Embora alguns autores tenham como recomendação a via intravenosa para este procedimento final (Hudson et al., 1989), o trabalho mostrou que utilizando somente a via intraperitoneal há uma adequada resposta imune.

O fato de terem sido encontrados resultados semelhantes quanto foram utilizados esplenócitos congelados e frescos, estes indicam para a possibilidade de uso de um "banco de esplenócitos" ativados para futuras fusões. Como vantagens do sistema estão a preservação de esplenócitos no pico de resposta, a não necessidade de manter camundongos por mais tempo no laboratório, a disponibilidade por tempo indeterminado de reserva de esplenócitos facilmente acessível quando necessário e de padrão de resposta conhecido. Marusich (1988) desenvolveu um estudo utilizando esplenócitos frescos e congelados para fusão e conseguiu uma pequena melhora na quantidade de híbridos produzidos com esplenócitos congelados. Segundo o autor, este fato é atribuído à maior instabilidade da membrana plasmática das células no pós descongelamento, o que facilita o processo de fusão. Resultados semelhantes encontrados no presente trabalho, também foram encontrados no *Interdisciplinary Center for Biotechnology Research - Hybridoma Core Laboratory* (Universidade da Flórida), que em sua produção rotineira de AcM, conseguiu uma eficiência similar à fusão com esplenócitos

frescos e congelados (Dr. Linda Green, comunicação pessoal)

A não necessidade de macrófagos durante o processo de cultivo dos híbridos, resulta num dado importante, uma vez que atualmente ainda há diversas controvérsias entre os autores sobre a real necessidade de se utilizar cultivos prévios de macrófagos alimentadores para o auxílio no crescimento dos híbridomas. Porém, no processo de clonagem, os clones cultivados em presença de macrófagos apresentaram uma multiplicação perceptivelmente superior, quando comparados aos clones em cultivo sem macrófagos (resultado não mostrado). Por este motivo, decidiu-se a utilização dos mesmos durante o processo de clonagem.

Atualmente, entretanto, há no mercado diversos meios aditivos para esta finalidade, eliminando completamente a necessidade dos macrófagos em quaisquer das fases de produção. Desta forma, elimina-se totalmente o potencial risco de contaminação para o cultivo dos híbridomas ao utilizar-se macrófagos (Linda Green, comunicação pessoal)

A escolha de se trabalhar com as proteínas estruturais N e S<sub>2</sub> baseia-se na descrição de Ignjatovic et al. (1995), que realizaram um ensaio com o objetivo de avaliar a cinética da resposta humoral aos diversos componentes do VBIG. Eles concluíram que as aves apresentavam títulos maiores e mais precoces contra as proteínas N e S<sub>2</sub> quando comparadas com a proteína M, que foi tardia e com título menor. Além disso, aqueles componentes apresentaram, também, altos índices de reações cruzadas entre diversas amostras de VBIG. Embora os autores tenham trabalhado com espécie diferente (*Gallus gallus domesticus*) da utilizada neste trabalho (*Mus musculus*), é razoável concluirmos que as proteínas imunodominantes do VBIG em uma dada espécie devam ser imunodominantes em outra. Esta hipótese pode ser corroborada pela predominância de híbridos produzidos direcionados contra componentes protéicos compatíveis em peso molecular com as proteínas S e N (resultado não demonstrado). Após a seleção de dois híbridos com estas especificidades, os cultivos de aspecto mais saudável foram congelados para testes posteriores.

Segundo Cavanagh (1984) e Sneed (1989) a utilização de soro hiperimune contra a proteína N foi capaz de promover reação cruzada entre diversas amostras de VBIG em *western blotting*, confirmando que a proteína possui determinantes antigênicos conservados entre as amostras.

O resultado encontrado no *western blotting* é compatível com o trabalho de Collisson (1992), que determinou ser a proteína N composta de 409 aminoácidos, tendo um homologia de 94.4 a 98.3% entre as amostras Massachusetts 41, Arkansas, H52, Beaudette, Gray e KB8523, sendo mais fortemente conservada no meio que nas extremidades. Todas as estirpes possuem uma região fortemente conservada entre os resíduos de aminoácidos 165 e 192.

A proteína S<sub>2</sub> é constituída de 625 resíduos de aminoácidos, sendo altamente glicosilada. O terminal amina está ligado a oligossacarídeos ricos em manose e, embora poucas amostras de VBIG tenham a proteína S completamente seqüenciada, estudos têm mostrado que a porção S<sub>2</sub> é altamente conservada entre as amostras (Collisson, 1992).

Os resultados preliminares dos estudos em S2 do Prof. José Sérgio de Resende por RT-PCR (Resende et al., 1998) e análise dos fragmentos amplificados com enzimas de restrição (J.S. Resende, Comunicação Pessoal) indicam para a homologia genética das amostras estudadas.

Diversos autores têm descrito estudos utilizando anticorpos monoclonais, nos quais a glicoproteína S<sub>2</sub> contém determinantes que induzem reação cruzada de anticorpos entre diversas amostras de VBIG (Ignjatovic et al., 1996; Collisson, 1992; Koch et al., 1990; Kusters et al., 1989; Lenstra et al., 1989).

A escolha pela concentração protéica das amostras de 200µg/mL no ELISA foi baseada em Souza (1999) que encontrou a maior diferença estatisticamente significativa de absorvância entre o controle negativo (amostra de VDN) e o controle positivo (amostra M41). A concentração dos antígenos maior para as amostras de campo que para as amostras utilizadas no ELISA para análises dos híbridos (M41, A5968 e Ark-99) é explicada pelo fato de que no ELISA para avaliação dos

híbridos foram utilizados antígenos purificados, enquanto que no ELISA de avaliação das amostras brasileiras foram utilizadas antígenos brutos. Portanto grande parte da concentração protéica detectada nos antígenos das amostras brasileiras era de origem embrionária e seus anexos e não do vírus (Souza, 1999).

A amostra H52 apresentou o maior valor de absorvância do teste, inclusive superior ao da amostra homóloga ao AcM (M41). Provavelmente o título viral da amostra era superior aos das amostras testadas. Logo, em uma mesma concentração protéica, o antígeno da amostra H52 (não purificado) poderia conter maior quantidade de partículas virais e conseqüentemente maior concentração de determinantes antigênicos disponíveis para os AcM ligarem. Como fundamentação para H52 conter maior número de partículas virais, haveria o fato de que a amostra H52 é mais adaptada ao ovo que as demais amostras, sendo assim, este vírus teria a capacidade de ser multiplicado mais rapidamente neste sistema que as demais amostras.

O AcM S12B2 (anti-S<sub>2</sub>) foi capaz de reconhecer todas as amostras incluídas nestes estudos, demonstrando que se trata de um AcM dirigido para uma região altamente conservada entre as diversas amostras. Como já discutido anteriormente, a porção S<sub>2</sub> possui regiões altamente conservadas, o que possibilita esta ocorrência. Considerando as características deste AcM, este é uma ferramenta potencial no estudo do VBIG *in situ* e no diagnóstico da infecção.

Como o AcM (S12B2) foi capaz de detectar VBIG, independente do sorotipo ao qual pertencia a amostra, é razoável entendermos que seria possível a detecção de VBIG de quaisquer sorotipos em outros imunossaios. Sua aplicação teria grande valor em estudos epidemiológicos de surtos da doença, na detecção de VBIG *in situ*, por exemplo. Entretanto, estas hipóteses, demandam estudos complementares para sua validação.

O AcM N3F10 foi capaz de reconhecer três amostras brasileiras (297, 283 e 327); das oito amostras testadas e todas as amostras de referência, sendo possivelmente, um AcM direcionado contra uma porção de baixa

conservação da seqüência de aminoácidos de N entre as amostras de VBIg. A detecção de variações antigênicas entre as amostras pode representar aplicação útil de N3F10 em estudos fenotípicos de amostras de VBIg. Sendo assim, sua utilização não é indicada como ferramenta de diagnóstico sem antes verificar a sua capacidade de reconhecer a amostra desejada.

Os resultados obtidos nos presentes ensaios são compatíveis com os encontrados por Ignjatovic et al. (1991) que, realizando análises com AcM contra a proteína N, entre diversas amostras de VBIg, não detectaram reação cruzada com todas as amostras. Koch et al. (1986), entretanto, realizaram ensaios com AcM contra a mesma proteína e concluíram que se tratava de uma região altamente conservada entre as diversas amostras de VBIg. Esta diferença de resultados pode ser explicada pelo fato de que os AcM produzidos por Koch et al. (1986) foram direcionados para um determinante antigênico conservado entre as amostras, enquanto os determinantes antigênicos dos AcM produzidos por Ignjatovic et al. (1991), assim como os nossos, são direcionados contra determinantes antigênicos menos conservados. Ainda, as amostras estudadas por Koch et al. (1986) podem ser antigenicamente mais similares, como ocorreu com as amostras M41, SE-17, H52, 327 e 297 no presente estudo.

Tendo como base as considerações das literaturas acima expostas, podem ser propostos os seguintes estudos empregando o AcM (S12B2): imunohistoquímica, para diagnóstico *in situ* da infecção por VBIg, estudo de amostras em surtos de doença quanto ao tropismo tecidual e persistência viral e avaliação da situação atual do VBIg no campo, comparando a ocorrência de episódios clínicos atuais com a doença em anos anteriores. O AcM N3F10 pode possibilitar a avaliação mais detalhada dos isolados detectados com S12B2, demonstrando diferenças ou semelhanças entre estes e, assim, estudo epidemiológico da ocorrência de diferentes fenótipos de VBIg quanto às características da proteína N.

## 6 CONCLUSÕES

Foram desenvolvidos os hibridomas S12B2 e N3F10, secretores de AcM específicos contra proteínas compatíveis em peso molecular com as proteínas virais de VBIg S<sub>2</sub> e N, respectivamente.

Os AcM S12B2 e N3F10 foram capazes de detectar antígenos nas amostras dos sorotipos Massachusetts (M41), Arkansas (Ark-99) e Connecticut (A5968) em *western blotting*.

O AcM S12B2 comportou-se como uma ferramenta adequada para a detecção de antígeno de VBIg em ensaios imunoenzimáticos, por reconhecer todas as amostras brasileiras e de referência de VBIg avaliadas (M41, Ark-99, A5968, H52, 283, 327, 297, PM-1, PM-2, PM-3, 351 e 29-78).

As amostras M41, SE-17, H52, 283, 327 e 297 foram detectadas pelo AcM N3F10, sendo a reatividade dirigida para a proteína compatível em peso molecular com a proteína N do VBIg, indicativa de homologia da região de N reconhecida entre as amostras.

As amostras de campo PM-1, PM-2, PM-3, 351 e 29-78 não foram detectadas pelo AcM N3F10, podendo apresentar diferenças antigênicas na proteína N.

## 7 APÊNDICES

### 7.1 SOLUÇÕES PARA PRODUÇÃO DO ANTÍGENO VIRAL

7.1.1 Solução saturada de sulfato de amônia  
 Sulfato de amônia pa 500g  
 Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O (Fosfato de sódio bibásico dodecahidratado) 15,14g  
 Água destilada 500mL

7.1.2 PMSF (Fluoreto de Fenil Metil Sulfonil) 0,2M  
 PMSO 3,5g  
 Etanol 3,5mL

7.1.3 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

7.1.4 Tampão NET  
 IM Tris\_HCl pH 7,2 1mL  
 NaCl (Cloreto de sódio) 5M 2mL  
 EDTA (etileno diamino tetra-acetato) 0,5M 0,2mL  
 Água MilliQ 18,2MΩcm qsp 100mL

7.1.4.1 NaCl (Cloreto de sódio) 5M  
 NaCl (Cloreto de sódio) 29,2g  
 Água MilliQ 18,2MΩcm qsp 100mL

7.1.4.2 EDTA (etileno diamino tetra-acetato) 0,5M  
 EDTA (etileno diamino tetra-acetato)·2H<sub>2</sub>O 18,6g  
 Água MilliQ 18,2MΩcm qsp 100mL  
 Adicionar aproximadamente 50mL de água ao EDTA;  
 ajustar o pH para 8,0 com auxílio de NaOH, para que o EDTA possa dissolver

7.1.4.3 Tampão IM Tris\_HCl, pH 7,2  
 Tris\_Base (tris(hidrometil) amino metano PM 121,1g pka=8,1 a 25°C) LIVRE DE PROTEASE 1,3g  
 Tris\_HCl (PM: 157,6g; pka=8,1 a 25°C) LIVRE DE PROTEASE 14,0g  
 Água MilliQ 18,2MΩcm qsp 100mL

7.1.5 Soluções de sacarose (Griffith, 1983)  
 Solução estoque  
 Sacarose 171g  
 Tampão NET 90mL  
 Aquecer o tampão a 37°C em Banho Maria, a fim de facilitar a dissolução da sacarose

Concentração desejada	Volume da solução (mL) 66%	Volume de Tampão NET mL	Índice de refração
25%	3,20	10	1,3689
30%	3,95	10	1,3758
35%	4,75	10	1,3829
40%	5,55	10	1,3902
45%	6,35	10	1,3978
50%	7,15	10	1,4036
55%	8,00	10	1,417

7.1.6 Solução estoque de antibiótico (100x100x2) 8x  
 Penicilina G potássica 1.000.000 UI 1 frasco  
 Sulfato de estreptomicina 1g 1 frasco  
 Sulfato de gentamicina 10mg 2 ampolas  
 Água MilliQ 18,2MΩcm autoclavada qsp 10mL  
 Estocar em freezer -20°C

7.1.7 Tartarato de sódio e potássio  
 Tartarato de sódio e potássio 2g  
 Água MilliQ 18MΩ 50mL

7.1.8 Sulfato de cobre 2%  
 Sulfato de cobre 1g  
 Água MilliQ 18MΩ 50mL

7.1.9 NaCO<sub>3</sub> (Carbonato de sódio) 3% em NaOH 0,1N  
 Solução de NaOH 3N (item 7.2.5) 3,4mL  
 NaCO<sub>3</sub> (Carbonato de sódio) 3g  
 Água MilliQ 18,2MΩcm<sub>qsp</sub> 100mL

7.1.10 Solução 1  
 Solução de tartarato de sódio e potássio (item 7.1.7) 0,1mL  
 Solução de sulfato de cobre a 2% (item 7.1.8) 0,1mL  
 Solução de NaCO<sub>3</sub> em NaOH 0,1N (item 7.1.9) 4,8mL

7.1.11 Padrão de albumina  
 Albumina sérica bovina 10mg  
 Água MilliQ 18,2MΩcm 10mL

## 7.2 SOLUÇÕES PARA ELISA

7.2.1 PBS Tween 20 (PBST)  
 PBS 10X 200mL  
 Tween 20 1mL  
 Água MilliQ 18,2MΩcm<sub>qsp</sub> 2000mL

7.2.2 Conjugado  
 Diluir em PBST segundo recomendação do fabricante

7.2.3 Substrato  
 Tampão Dietanolamina pH 9,8 (item 7.2.4) 20mL  
 Pastilha 20mg de pNPP 1 unidade

7.2.4 Tampão Dietanolamina  
 Dietanolamina 97mL  
 NaN<sub>3</sub> (Azida sódica) 0,2g  
 MgCl<sub>2</sub> 100mg  
 Água MilliQ 18,2MΩcm<sub>qsp</sub> 1.000mL  
 Adicionar HCl fumegante para ajustar o pH para 9,8.  
 Armazenar em geladeira protegido da luz.

7.2.5 Solução NaOH 3N  
 NaOH (Hidróxido de sódio) 30g  
 Água MilliQ 18,2MΩcm<sub>qsp</sub> 250mL

7.2.6 Tampão Carbonato/bicarbonato pH 9,6  
 SOLUÇÃO ESTOQUE A  
 NaCO<sub>3</sub> (Carbonato de sódio anidro) 21,2g  
 Água MilliQ 18,2MΩcm<sub>qsp</sub> 1000mL  
 Armazenar em geladeira

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

TAMPÃO CARBONATO/BICARBONATO pH 9,6  
 Solução estoque A 16mL  
 Solução estoque B 34mL  
 Armazenar em geladeira

## 7.3 SOLUÇÕES PARA ELETROFORESE, WESTERN BLOTTING e IMMUNOBLOTTING

7.3.1 Tampão de corrida 5x  
 Tris\_Base (tris(hidrometil) amino metano PM 121,1g) LIVRE DE PROTEASE 15,0g  
 Glicina LIVRE DE PROTEASE 72,0g  
 SDS (Dodecil sulfato de sódio) LIVRE DE PROTEASE 5,0g  
 Água MilliQ 18,2MΩcm<sub>qsp</sub> 1,0L

7.3.2 Tampão 0,5M Tris\_HCl, pH 6,8  
 Tris\_Base (tris(hidrometil) amino metano PM 121,1g pka=8,1 a 25°C) LIVRE DE PROTEASE 0,3g  
 Tris\_HCl (PM: 157,6g; pka=8,1 a 25°C) LIVRE DE PROTEASE 7,5g  
 Água MilliQ 18,2MΩcm<sub>qsp</sub> 100mL

7.3.3 Tampão 1,5M Tris\_HCl, pH 8,8  
 Tris\_Base (tris(hidrometil) amino metano PM 121,1g; pka=8,1 a 25°C) LIVRE DE PROTEASE 15,2g  
 Tris\_HCl (PM: 157,6g; pka=8,1 a 25°C) LIVRE DE PROTEASE 4,0g  
 Água MilliQ 18,2MΩcm<sub>qsp</sub> 100mL

7.3.4 SDS 10%  
 SDS (Dodecil sulfato de sódio) 5 g  
 Água MilliQ 18MΩ 5 mL

7.3.5 Tampão de amostra 2x  
 Azul de bromofenol 1% (Dissolvido em etanol resfriado) 100μL  
 0,5M Tris\_HCl pH 6,8 5mL  
 Água MilliQ 18,2MΩ.cm 3mL  
 SDS (Dodecil sulfato de sódio) 10% (APÊNDICE 7.3.4) 2,0mL  
 ⇒ Armazenar em temperatura ambiente

7.3.6 APS - Persulfato de amônio a 10%  
 Persulfato de amônio 100 mg  
 Água MilliQ 18.2MΩcm<sub>qsp</sub> 1,0 mL  
 ⇒ Estocar a 5°C. descartar

7.3.7 Tampão do gel de corrida 4x  
 1,5M Tris\_HCl, pH 8,8 (item 100mL  
 7.3.3)  
 SDS (Dodecil sulfato de sódio)  
LIVRE DE PROTEASE 0,4g

7.3.8 Tampão do gel de aplicação 4x  
 0,5M Tris\_HCl, pH 6,8 (item 100mL  
 7.3.2)  
 SDS (Dodecil sulfato de sódio)  
LIVRE DE PROTEASE 0,4g

7.3.9 Solução estoque de acrilamida T%40 e C%2,67

Acrilamida 40,0 g  
 Bis acrilamida 1,1 g  
 Água MilliQ 18.2MΩcm<sub>qsp</sub> 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 filtro de 0,22µm.

7.3.10 Preparo do Gel de aplicação T% 4,0  
 Água MilliQ 18.2MΩcm 6,4mL  
 Solução estoque de acrilamida 1,0mL  
 40%  
 Tampão do gel de aplicação 4x 2,5mL  
 APS (Persulfato de amônia) 10% 100µL  
 TEMED (N, N, N', N'-tetrametil etilenodiamino) 10µL

7.3.11 Preparo do Gel de corrida T%10  
 Água MilliQ 18.2MΩcm 4,9mL  
 Solução estoque de acrilamida 2,5mL  
 40%  
 Tampão do gel de corrida 4x 2,5mL  
 APS (Persulfato de amônia) 10% 100µL  
 TEMED (N, N, N', N'-tetrametil etilenodiamino) 10µL

7.3.12 Tampão de transferência  
 Tris\_Base (tris(hidrometil) amino metano PM 121,1g) LIVRE DE PROTEASE 5,82g  
 Glicina LIVRE DE PROTEASE 2,93g  
 SDS (Dodecil sulfato de sódio) 3,75mL

10%  
 Metanol 200mL  
 Água MilliQ 18.2MΩcm<sub>qsp</sub> 1000mL

7.3.13 Tampão de bloqueio  
 Albumina sérica bovina 5g  
 Tris\_base tris(hidrometil) amino metano PM 121,1g) LIVRE DE PROTEASE 0,6g  
 NaCl (Cloreto de sódio) 0,9g  
 Água MilliQ 18.2MΩcm<sub>qsp</sub> 100mL

7.3.14 TBS-T 10x  
 Tris\_base tris(hidrometil) amino metano PM 121,1g) LIVRE DE PROTEASE 60,55g  
 NaCl (Cloreto de sódio) 87,66g  
 Tween 20 0,5mL  
 Água MilliQ 18.2MΩcm<sub>qsp</sub> 1000mL

7.3.15 Solução fixadora  
 Metanol 100mL  
 Ácido acético 50mL  
 Água MilliQ 18.2MΩcm<sub>qsp</sub> 1000mL

7.3.16 Solução corante para proteínas (Coomassie)  
 Brillhante Blue R-250 1g  
 Água MilliQ 18.2MΩcm<sub>qsp</sub> 1000mL

7.3.17 Solução descorante  
 Ácido acético 70mL  
 Água MilliQ 18.2MΩcm<sub>qsp</sub> 1000mL

## 7.4 SOLUÇÕES PARA CULTIVO DE CÉLULAS

7.4.1 Meio RPMI 1640  
 Meio RPMI 16040 SIGMA (R - 5302) 1 frasco  
 NaHCO<sub>3</sub> (Bicarbonato de sódio) 2g  
 Solução de antibiótico para cultivo celular SIGMA 100 X (A - 4668) 10 mL  
 Água MilliQ 18.2MΩcm 890mL  
 Ajustar pH para 6,8 a 7,0 com HCl 1N e filtrar em membrana de 0,22µm. Após a filtragem adicionar o antibiótico e o soro fetal bovino. Distribuir em alíquotas de 250mL e armazenar em geladeira. O período de validade é de 45 dias.

#### 7.4.2 Meio HT

Meio HT SIGMA 50 X (H - 0137) 1 frasco

Soro fetal bovino 50mL

Meio RPMI 1640 (apêndice 7.4.1) 450 mL

Filtrar em membrana de 0,22 $\mu$ m

#### 7.4.3 Meio HAT

Meio HAT SIGMA 50 X (H - 0262) 1 frasco

Soro fetal bovino 50mL

Meio RPMI 1640 (apêndice 7.4.1) 450 mL

Filtrar em membrana de 0,22 $\mu$ m

#### 7.4.4 Meio de congelamento

DMSO (Dimetil sulfoxido) 1mL

Soro fetal bovino 9mL

Armazenar aliquotado em freezer

#### 7.4.5 Azul de tripan 0,3%

Azul de tripan 0,3g

Água MilliQ 18,2M $\Omega$ cm 100mL

## 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANTCZAK, D.F., Monoclonal antibodies: technology and potencial use. **J. Am. Med. Assoc.**, v.181, 1982, p.1005-1011.
- BEAUDETTE, F.R., HUDSON, C.B. Cultivation of the virus of infectious bronchitis. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, v.43, n.1, 1937, p.51-60.
- BJERRUM, O. J., SCHAFFER-NIELSEN, C. **Analytical Electrophoresis**. In: DUNN, M. J (Ed); Berlim: Verlag Chemie, Weinheim, 1986, 315p.
- CAMPBELL, A.M. **Laboratory techniques in biochemistry and molecular biology: Monoclonal antibody and immunosensor technology**, New York: Elsevier Science Publishers B.V; 1991, 427p.
- CAMPBELL, A.M. **Laboratory techniques in biochemistry and molecular biology: Monoclonal antibody technology the production and characterization of rodent and human hybridomas**, New York: Elsevier Science Publishers B.V; v. 13, 1986, 265p.
- CATTY, D. **Antibodies a practical approach**: vol 1, Oxford: IRL PRESS, 1986, p.81-107.
- CAVANAGH, D., NAQI, S.A. Infectious Bronchitis, p.511-526. In: **Diseases of Poultry**, CALNEK, B. W. et al. Ed., 10<sup>o</sup> ed., Ames: Iowa State University Press, 1997, 1080p.
- CAVANAGH, D., DAVIS, P.J., Coronavirus IBV: removal of spike glycopeptide S1 by urea abolishes infectivity but not attachment to cells. **J. Gen. Virol.**, v.67, 1986, p.1443-1448.
- CAVANAGH, D., DAVIS, P.J., DARBYSHIRE, J.H. et al. Coronavirus IBV: virus retaining spike glycopeptide S2 but not S1 is unable to induce virus neutralizing or hemagglutination inhibiting antibody or induce chicken tracheal protection. **J. Gen. Virol.**, v.67, 1986, p.1435-1442.
- CAVANAGH, D., DARBYSHIRE, J.H., DAVIS, P. et al., Induction of humoral neutralising and haemagglutination-inhibiting antibody by the spike protein of avian infectious bronchitis virus. **Avian Pathol.** v. 13, 1984, p.573-583.
- CAVANAGH, D. Coronavirus IBV: Further evidence that the surface projections are associated with two glycopolypeptides. **J. Gen. Virol.** v.64, 1983, p.1787-1791.
- COLLISSON, E. W., PARR, R.L., LI, W. et al. An overview of the molecular characteristics of avian infectious bronchitis virus. **Poultry Science Reviews**, v.4, 1992, 41-55.
- COOK, J.K.A. The classification of new serotypes of infectious bronchitis virus isolated from poultry flocks in Britain between 1981 and 1983. **Avian Pathol.**, v.13, n.3, 1984, p.733-741.
- DARLIN, D.C., MORGAN, S.J **Animal cells culture and media essential data**, John Wiley & Sons (Ed.), 1994, 150p.
- DAWSON, M. Production and maintenance of hybridoma. In: BUTLER, M. et al. (Ed.) **Cell cult. Lab Fax**, cap.4. , 1992 p.59-84.
- DHINAKAR, G., JONES, R.C. Infectious bronchitis virus: immunopathogenesis of infection in the chicken. **Avian Pathol.** 26, 1997, 677-706.
- DI FABIO, J. Bronquite infecciosa das galinhas: aspectos clinicos e controle da BIG no Brasil In: CONFERÊNCIA APINCO 1993 DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLAS, São Paulo: **Anais...** Facta (Ed.), 1993, p.1-8.

- ENGVALL, E., PERLMANN, P. Enzyme linked immunosorbent assay ELISA. III Quantification of specific antibodies by enzyme labelled anti-immunoglobulin in antigen coated tubes. *J. Immunol.*, v.109, 1972, p.129-135.
- GONÇALVES, P. M. *Babesiose bovina: padronização do teste de ELISA para detecção de anticorpos IgM anti-Babesia bovis e B. bigemina em animais submetidos ao processo de premunicação*. Belo Horizonte: UFMG - Escola de Veterinária, 1996, 87p., Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária)
- GRIFFITH, O. M. **Techniques of preparative zonal, and continuous flow ultracentrifugation**. Palo Alto (CA): Beckman Instruments Inc., 1983, 49p.
- HARLOW, E.D.; LANE, D.; **Antibodies a laboratory manual**, New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1988, 726p.
- HOLMES, K.V. Coronavirus and their replication. In: FIELDS, B. N. KNIPE, D.M. (Ed.), **Virology**, Second Edition, New York: Raven Press, 1990, 841-856.
- HUDSON, L., HAY, F. C.; **Practical Immunol.**, 3 ed., Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1989, 517p.
- IGNJATOVIC, J., ASHTON, F. Detection and differentiation of avian infectious bronchitis viruses using monoclonal antibody-based ELISA, *Avian Pathol.* v.25, 1996, p. 721-736.
- IGNJATOVIC, J., GALLI, L. Immune responses to structural proteins of avian infectious bronchitis virus. *Avian Pathol.* v.24, 1995, p.313-332.
- IGNJATOVIC, J., McWATERS, P. G. Monoclonal antibodies to three structural proteins of avian infectious bronchitis virus: characterization of epitopes and antigenic differentiation of Australian strains. *J. of Gen. Virol.*, v.72, 1991, p.2915-2922.
- JACKWOOD, M. W., KWON, H. M., HILT, D.A. Infectious bronchitis virus detection in allantoic fluid using the polymerase chain reaction and a DNA probe. *Avian Dis.*, v.36, 1992, 403-409.
- KARACA, K., NAQI, S., GELB, J. Jr., Production and characterization of monoclonal antibodies to three infectious bronchitis virus serotypes. *Avian Dis.*, v. 36, 1992, p.903-915.
- KOCH, G., HARTOG, L., KANT, A. et al. Antigenic domains on the peplomer protein of avian infectious bronchitis virus: correlation with biological functions. *J. of Gen. Virol.*, v.71, 1990, p.1929-1935.
- KOCH, G., HARTOG, L. et al, Antigenic differentiation of avian bronchitis virus variant strains employing monoclonal antibodies. *Isr. J. Vet. Med.*, v. 42, n.2, 1986, 89-97.
- KOHLER, G., MILSTEIN, C. Continuous culture of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*, v.256, 1975, p.495-497.
- KUSTERS, J. G., JAGER, E. J., LENSTRA J.A. et al., Analysis of an immunodominant region of infectious bronchitis virus. *J. of Immunol.*, v.143, 1989, p.2692-2698.
- KWON, H. M., JACKWOOD, M. W., GELB, J. Jr. Differentiation of infectious bronchitis serotypes using polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism analysis. *Avian Dis.*, v.37, 1993, 194-202.
- LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, v.227, 1970, p.680-686.
- LENSTRA, J. A., KUSTERS, J. G., KOCH, G. et al. Antigenicity of the peplomer protein of infectious bronchitis virus using the haemagglutination-inhibition test. *Avian Dis.*, v.28, 1984, p.435-443.

- LIDDEL, J., CRYER, A. **A practical guide to monoclonal antibodies** London: John Wiley & Sons, 1991, 188p.
- MARUSICH, M. F. Efficient hybridoma production using previously frozen splenocytes. **J. Immunol. Meth.**, v.144, 1988, 155-159.
- MOCKETT, A. P. A. Envelope proteins of avian infectious bronchitis virus: purification and biological properties. **J. Virol. Meth.**, v.12, 1985, 271-278.
- MUNEER, A. M., NEWMAN, J.A., HALVORSON, D. A. et al. Effects of avian infectious bronchitis virus (Arkansas strain) on vaccinated laying chickens. **Avian Dis.**, v.31, 1987, p.820.
- PAUL, J. **Cell and Tissue Culture**. London: Ed. Longman Group Limited, 1975, 483p.
- PROMEGA **Protocols and Applications Guide**. (cat#p1610), Ed. Promega Corporation, 3<sup>o</sup>ed., 1996, 279-304.
- SHULMAN, M., WILDE, C.D., KÖHLER, G. A better cell line for making hybridoma secreting antibodies. **Nature**, v.276, 1978, p. 269-270.
- SNEED, L. W., BUTCHER, G. D., PARR, R. et al. Comparisons of the structural proteins of avian infectious bronchitis virus as determined by western blot analysis. **Viral Immunology**, v.2, 1989, 221-227.
- SOUZA, M. B. **Afinidades antigênicas de amostras de campo do vírus da bronquite infecciosa das galinhas com a amostra Massachusetts M41**. Belo Horizonte: UFMG – Escola de Veterinária, 1999, 75p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária).
- STRYER, L. **Bioquímica**. Stanford University. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 4<sup>o</sup>ed., 1996, 1000p.
- TOWBIN, H., STAEBLIN, T., GORDON, G. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheet: Procedure and some applications. **Proc. Natl. Acad. Sci.** v.76, 1979, p.4330-4335.
- TRANS-BLOT® SEMI-DRY ELECTROPHORETIC TRANSFER CELL INSTRUCTION MANUAL, Hercules (CA): BIO-RAD cat#170-3940, 1995.
- VILLEGAS, P. **Laboratory manual of avian diseases**, Athens: University of Georgia, 1985, 56p.
- VOLLER, A., BARTLETT, A., BIDWELL, D.E. Enzyme immunoassays for parasitic diseases. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v.70, 1976, p.98-106.
- WEGE, H., SIDDELL, S. ter, MEULEN, V. The biology and pathogenesis of coronaviruses. **Curr. Topics Microbiol. Immunol.**, 1982, p.165-200.
- WINTERFIELD, R. W., HITCHNER, S. B. Etiology of infectious nephritis-nephrosis syndrome of chickens. **Am. J. Vet. Res.** v.23, 1962, p.1273-1279.