

Fernanda Rodrigues Taveira Rocha

T636.089 63

R.672p

2000

**PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE ANTICORPOS MONOCLONAIS CONTRA
A GLICOPROTEÍNA S₁ DO VÍRUS DA BRONquite INFECCIOSA DAS GALINHAS**

Tese apresentada à Escola de Veterinária da
Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito
parcial para obtenção do grau de Mestre em Medicina
Veterinária.

Área: Medicina Veterinária Preventiva

Orientador: Prof. Nelson Rodrigo da Silva Martins

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

BIBLIOTECA UNIVERSITARIA

15/09/00

854400-10

0296-14660

R672p Rocha, Fernanda Rodrigues Taveira, 1971-

2000

Produção e caracterização de anticorpos monoclonais contra a glicoproteína S1 do vírus da bronquite infecciosa das galinhas / Fernanda Rodrigues Taveira Rocha. - Belo Horizonte: UFMG - Escola de Veterinária, 2000.

00 p.: il.

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

1. Galinha - Doenças - Teses. 2. Bronquite infecciosa em aves domésticas - Teses. 3. Anticorpos monoclonais - Teses. I. Título.

CDD - 636.508 96

Dissertação defendida e aprovada em 28 de fevereiro de 2000, pela Comissão Examinadora constituída por:



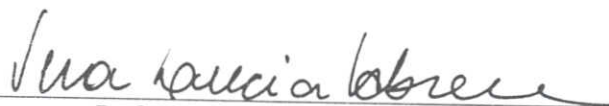
Prof. Nelson Rodrigo da Silva Martins
Orientador



Profa. Bernadete Miranda dos Santos



Prof. Nelson Carneiro Baião



Profa. Vera Lúcia Viegas de Abreu



Prof. Andrey Pereira Lage

“Há um tempo para tudo e um momento
sob o céu para fazer cada coisa:
há um tempo para nascer e outro para morrer;
um tempo para plantar
e um tempo para colher.
Um tempo para matar e outro para curar,
Um tempo para chorar e outro para rir;
Um tempo para os lamentos
E um tempo para as danças.
Um tempo para espalhar pedras
E outro para recolhê-las;
Um tempo para abraçar-se e outro para separar-se.
Um tempo para ganhar e outro para perder;
Um tempo para calar e outro para falar.
Um tempo para amar e outro para odiar;
Um tempo para a guerra
E um tempo para a paz.”
(*Eclesiastes 3, 1-8*)

Aos meus queridos pais e adoráveis irmãos,
dedico.



AGRADECIMENTOS

À Deus pela minha existência.

Aos meus pais pelo incentivo, apoio e compreensão.

Aos meus irmãos Vinícius e Thiago pela doçura, carinho e dedicação.

Ao professor Nelson Rodrigo da Silva Martins pela oportunidade, orientação e exemplo de profissional a ser seguido.

Ao professor José Sérgio Rezende pela paciência e tolerância.

Ao colega Max Augusto Jorge pelas sugestões.

Ao professor Andrey Pereira Lage pelo desprendimento e contribuições.

Aos professores da comissão examinadora pelas sugestões e valiosas contribuições.

Aos professores do Setor de Virologia pelo suporte técnico.

Aos técnicos do laboratório de Doença das Aves Claudio e Ismael pela imensa contribuição, amizade e dedicação.

Aos funcionários do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva em especial à Nádia pelo suporte, boa vontade e contribuição.

Aos professores coordenadores e funcionárias do Colegiado de Pós-Graduação pela paciência e atenção.

À minha revisora querida Dona Geralda pela disponibilidade, dedicação apoio e contribuição.

Aos colegas de curso pela saudável convivência e companheirismo.

Ao meu querido colega, irmão Cleiton Martins de Souza pelo apoio, coleguismo, dedicação e amizade.

Aos meus amigos por compreenderem a minha ausência, pelo carinho e apoio.

Aos meus saudosos professores da Escola de Veterinária da UFG pelo incentivo.

À professora Maria Auxiliadora Andrade pela inspiração e carinho.

A todos aqueles com quem convivi neste período e que me ajudaram de diferentes maneiras.

À CAPES pela concessão da bolsa de estudos.

SUMÁRIO

RESUMO	09
ABSTRACT	09
1 INTRODUÇÃO	09
1.1 Objetivos	10
2 LITERATURA CONSULTADA	10
2.1 A Bronquite Infecciosa das Galinhas (BIG)	10
2.2 O vírus da Bronquite Infecciosa das Galinhas (VBIG)	10
2.2.1 Estrutura e composição físico-química do VBIG	10
2.2.2 Replicação e patogenia	11
2.2.3 Sorotipos de VBIG	11
2.3 Prevenção e controle	12
2.4 Diagnóstico	12
2.4.1 Detecção do VBIG	12
2.4.2 Detecção de anticorpos específicos contra VBIG	13
2.4.3 Tipificação de VBIG	13
2.5 Anticorpos monoclonais (AcM)	13
2.6 ELISA	14
3 MATERIAL E MÉTODOS	14
3.1 Local	14
3.2 Animais doadores de material experimental	14
3.3 Produção dos antígenos	14
3.3.1 Purificação e concentração do antígeno viral	15
3.3.2 ELISA para avaliação do antígeno purificado de VBIG	15
3.3.3 Dosagem de proteína viral pelo método de Lowry	16
3.4 Imunização dos camundongos	16
3.5 ELISA para avaliação dos camundongos	16
3.6 Produção dos hibridomas	17
3.6.1 Preparo das células de mielomas SP ₂ 0/Ag14	17
3.6.2 Preparo das células de baço	17
3.6.3 Preparo dos macrófagos	17
3.6.4 Contagem das células	17
3.6.5 Fusão	18
3.6.6 Seleção dos híbridos após a fusão	18
3.6.7 Expansão dos híbridos	18
3.6.8 Clonagem	18
3.6.9 Congelamento das células	19
3.7 Obtenção do sobrenadante de cultura contendo anticorpos monoclonais	19
3.8 Caracterização dos anticorpos monoclonais	19
3.8.1 Caracterização quanto à especificidade <i>Immunoblotting</i>	19
3.8.1.2 Transferência para membrana de nitrocelulose pelo método "Semy Dry"	19
3.8.1.3 Coloração pelo azul de Comassie	19
3.8.1.4 <i>Immunoblotting</i>	20
3.8.2 Caracterização quanto ao isotipo	20
3.9 ELISA aplicando os AcM anti-S ₁ produzidos pelos clones 4H ₁ , 4D ₇ e 4D ₉	20
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	21
4.1 Produção do antígeno	21
4.2 Dosagem protéica	21
4.3 ELISA para avaliação do VBIG purificado em gradiente de sacarose	21
4.4 Imunização dos camundongos	21

4.5	Produção dos hibridomas	22
4.6	Caracterização dos sobrenadantes dos hibridomas quanto à especificidade	22
4.7	Caracterização dos anticorpos quanto ao isotipo	23
4.8	ELISA utilizando AcM	23
5	CONCLUSÕES	24
6	APÊNDICE	25
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	28

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Immunoblotting dos clones 4H ₁ , 4D ₇ , 4D ₉	23
Figura 2	Valores médios das absorvâncias das amostras de VBIG testadas em ELISA frente aos anticorpos monoclonais anti-S ₁ produzidos pelos clones 4H ₁ , 4D ₇ , 4D ₉	23

RESUMO

O vírus da bronquite infecciosa das galinhas (VBIG) é um *coronavirus* que apresenta diversidade de sorotipos, o que tem tornado difícil o controle da doença com a utilização de vacinas derivadas apenas do sorotipo Massachusetts. Tendo em vista a grande necessidade de se avaliar a ocorrência de estirpes regionais, o presente trabalho foi realizado com o propósito de produzir hibridomas secretores de anticorpos monoclonais (AcM) específicos contra S₁ da amostra M41 do VBIG, possibilitando sua utilização em ELISA para avaliar afinidades antigênicas entre amostras de referência de VBIG e amostras brasileiras de campo isoladas no estado de Minas Gerais. O híbrido 3E₂ foi selecionado e clonado originando os clones 4H₁, 4D₇ e 4D₉, que revelaram produção de AcM pertencentes à subclasse IgG 2'. Em *immunoblotting* os AcM foram caracterizados como específicos apenas para S₁ da amostra M41, não reagindo frente às amostras de referência A5968 (sorotipo Connecticut) e Ark-99 (sorotipo Arkansas). Os AcM foram avaliados em ELISA, frente as amostras de referência SE-17 (sorotipo Geórgia), H52 (vacina de baixa atenuação do sorotipo Massachusetts), amostra La Sota do vírus da doença de Newcastle (VDN) e os isolados de VBIG 29/78, 283/83, 297/83, 327/83, 351/84, PM1/87, PM2/87 e PM3/89 de casos de bronquite infecciosa (BIG) em Minas Gerais. No ELISA, os AcM reagiram com a amostra H52, do sorotipo homólogo, mas não com SE-17, de sorotipo heterólogo. Para as amostras brasileiras, detectou-se identidade antigênica dos AcM anti-M41 com apenas duas das amostras isoladas de lotes de frangos de corte (PM1 e PM2). Os AcM produzidos pelos clones selecionados são específicos para S₁ de M41 do VBIG. A detecção de M41 em *immunoblotting* e H52 em ELISA pode indicar para um espectro mais amplo de reatividade dos AcM, que pode torná-los úteis na detecção de amostras de todo o sorotipo Massachusetts e assim a tipificação em relacionados ou não a este sorotipo. Os AcM podem ser aplicados em imunoenaios para caracterização antigênica de VBIG, contribuindo, dessa forma, para a adoção de medidas mais adequadas ao controle da BIG nos plantéis avícolas.

Palavras-chave: Anticorpo monoclonal, hibridoma, bronquite infecciosa das galinhas, glicoproteína S, ELISA.

ABSTRACT

Isolates and strains of infectious bronchitis (IBV), a coronavirus, are classified into several distinct serotypes which may frequently not share neutralizing antigens, complicating the control of infectious bronchitis (IB) through vaccination, especially in Brazil, where live vaccines should be made of strains from the Massachusetts serotype. In view of the necessity of establishing assays for typing IBV which offer rapidity and high specificity, a project was designed to preparing an IBV type specific library of monoclonal antibodies (Mab). As part of the project Mab have been prepared specific to the Massachusetts serotype strain M41 S₁ glycoprotein, which is involved with the typing characteristics of IBV. The Mab 4H₁, 4D₇ and 4D₉ were characterized by immunoblotting against M41, A5968 and Ark-99 reference strains of IBV, of serotypes Massachusetts, Connecticut and Arkansas, respectively, being only reactive to the M41 strain. The Mab were also evaluated in an ELISA against reference strains SE-17 and H52 (mid attenuated vaccine strain), of serotypes Georgia and Massachusetts, respectively and eight field isolates, 29/78, 283/83, 297/83, 327/83, 351/84, PM1/87, PM2/87 and PM3/89 of field IB in Minas Gerais, Brazil, recognizing only the strain H52 and isolates PM1 and PM2. It is concluded that these Mab are useful to detecting the M41-related strains of serotype Massachusetts, with a spectrum which might enable typing Massachusetts serotype isolates. The discrimination of Massachusetts-related or not isolates in some regions may bring light into the best fit vaccination strains and programmes for the poultry industry.

Keywords: Monoclonal antibody, ELISA, infectious bronchitis, Spike glycoprotein.

1. INTRODUÇÃO

A avicultura brasileira ocupa posição de destaque no cenário mundial, tendo em vista o seu considerável ritmo de crescimento e alto desenvolvimento em termos de tecnologia de produção.

É uma atividade econômica que contribui para a geração de riquezas e disponibilização de proteína animal a custos mais baixos, regulando o mercado de carnes.

A atividade avícola emprega tecnologia avançada em todas as suas áreas de produção.

contudo existem alguns obstáculos que precisam ser transpostos. Essencialmente no aspecto da biossegurança, a bronquite infecciosa das galinhas (BIG) constitui um permanente desafio para a avicultura. É uma doença de grande interesse econômico, levando à diminuição na produção e qualidade interna e externa dos ovos em lotes de poedeiras. Quando atinge frangos de corte, provoca aumento da mortalidade e condenação de carcaças em abatedouros, além de causar perdas na conversão alimentar e no ganho de peso do lote.

A BIG tem sido controlada no Brasil utilizando-se vacinas com amostras Holland (H) do sorotipo Massachusetts. Esse controle tem sido insatisfatório; possivelmente devido à existência de uma ampla variedade de variantes sorológicas do vírus da bronquite infecciosa das galinhas (VBIG). Além disso, os procedimentos convencionais para a classificação laboratorial do vírus são onerosos, demorados e inconsistentes.

Tendo em vista a escassez de trabalhos relacionados ao desenvolvimento e aprimoramento de novos métodos de detecção e classificação do VBIg e a grande necessidade de se avaliar a ocorrência de desafios de estirpes regionais, que sejam distintas do sorotipo vacinal, o presente trabalho foi idealizado com o propósito de produzir hibridomas secretores de anticorpos monoclonais (AcM) específicos para a subunidade S₁ da glicoproteína "S". Considerando que a glicoproteína S₁ é sorotipo específica, estes anticorpos poderão ser utilizados em trabalhos para a classificação de amostras brasileiras relacionadas ou não ao sorotipo Massachusetts utilizado na vacinação, procedimento imprescindível na revisão e adoção de medidas mais adequadas de controle da BIG nos plantéis avícolas.

1.1 Objetivos

Gerais

Produção de AcM específicos contra componentes estruturais responsáveis pelo aspecto sorológico do vírus da bronquite infecciosa das galinhas e sua avaliação no estudo de amostras isoladas de doença a campo.

Específicos

Produzir AcM específicos contra a glicoproteína S₁ da amostra M41 do vírus da bronquite infecciosa das galinhas.

Avaliar os AcM anti-S₁ de M41 frente as amostras de referência M41 (sorotipo Massachusetts), A5968 (sorotipo Connecticut) e Ark-99 (sorotipo Arkansas) em *immunoblotting*.

Avaliar os AcM anti-S₁ de M41 contra as amostras de referência SE-17 (sorotipo Georgia) e H52 (amostra do sorotipo Massachusetts adaptado a ovo e atenuado para uso como vacina de virulência intermediária), em ELISA.

Avaliar os AcM frente a oito amostras de VBIg de campo 29/78, 283/83, 297/83, 327/83, 351/84, PM1/87, PM2/87 e PM3/89 em ELISA.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. A Bronquite Infecciosa das Galinhas (BIG)

É uma doença aguda, altamente contagiosa, de etiologia viral, que acomete somente a espécie *Gallus gallus domesticus*, em todas as idades, infectando os sistemas respiratório, urinário e reprodutor. Sua distribuição é cosmopolita, ocorrendo em qualquer região onde se desenvolva a avicultura industrial (Raj & Jones, 1997).

A BIG foi descrita pela primeira vez por Schalk e Hawn (1931), estudando aves com sintomas respiratórios e com mortalidade elevada, em Dakota do Norte, nos Estados Unidos da América. No Brasil, foi diagnosticada, primeiramente, por Hipólito (1957), que relacionou a doença com a intensa importação de aves dos Estados Unidos e a frequência de afecções respiratórias nos plantéis brasileiros.

2.2. Vírus da Bronquite Infecciosa das Galinhas (VBIG)

O VBIg é classificado na família *Coronaviridae* e gênero *Coronavirus* (Ignjatovic & Galli, 1994; Cavanagh & Naqi, 1997).

2.2.1. Estrutura e composição físico-química do VBIg

Os vírions de VBIg são pleomórficos, apesar da predominância de partículas esféricas, com aproximadamente 120 nm de diâmetro. O virion apresenta projeções em sua superfície, as quais lhe conferem o aspecto de coroa solar (*Coronavirus*) (Lai & Cavanagh, 1997). O genoma viral é constituído por ácido

ribonucléico (ARN) de fita simples e envolvido por, basicamente três proteínas estruturais: a nucleoproteína (N) associada ao nucleocapsídeo, revestindo o ARN; no envelope, a proteína da matriz (M) e as glicoproteínas das projeções superficiais ou espículas (S) compostas por duas subunidades S_1 e S_2 (Cavanagh e Naqi, 1997).

A proteína do nucleocapsídeo N, com peso molecular (PM) de 52 kDa está localizada na parte interna do virion, estando intimamente associada ao ARN viral, sendo relativamente estável. Os anticorpos dirigidos contra esta proteína são os primeiros a serem detectados após a infecção, entretanto, não estão associados com proteção (Cavanagh e Davis, 1987).

A glicoproteína M é heterogeneamente glicosilada, o que resulta em glicoproteínas com PM de 26, 28, 30 e 34 kDa. Essa glicoproteína M está incluída na bicamada de lipídio do envelope viral e é parcialmente exposta sobre a superfície do virion (Boursnell *et al.* 1984). As proteínas M e N contêm determinantes antigênicos mais conservados, os quais constituem antígenos grupo-específicos.

A glicoproteína S é o componente mais externo do virion, responsável pela interação do vírus com receptores da célula hospedeira e pela fusão do envelope viral à membrana celular. Esta glicoproteína é clivada em dois glicopeptídeos, S_1 e S_2 , com PMs de 90 e 84 kDa, respectivamente (Cavanagh, 1983). O glicopeptídeo S_2 desempenha uma função de suporte para S_1 por apresentar uma estrutura mais rígida, além de ser o mais conservado dos dois. O glicopolipeptídeo S_1 possui determinantes antigênicos que induzem a formação de anticorpos neutralizantes e inibidores da hemaglutinação, sendo sorotipo específico e essencial, portanto, para a classificação de amostras de VBIG (Cavanagh, 1984).

2.2.2. Replicação e patogenia

De acordo com Cavanagh & Naqi (1997), embora o principal sítio de replicação do VBIG sejam as células epiteliais ciliadas da mucosa do sistema respiratório, este vírus também pode comprometer as células dos sistemas urinário e reprodutor de aves de todas as idades.

A mortalidade provocada pela BIG é baixa em galinhas acima de 6 semanas de idade e maior em aves jovens. O local de eleição do VBIG é a traquéia, seguida dos pulmões, sacos aéreos e oviduto. O vírus também pode estar presente em

menor quantidade nos rins, pâncreas, baço, fígado, coração, cloaca e proventrículo. As infecções respiratórias podem ser complicadas pela presença de *Mycoplasma gallisepticum*, *M. synoviae* (Hopkins & Yoder, Jr, 1986) e *Escherichia coli* (Cook, 1986), resultando, em frangos de corte, na redução do ganho de peso, condenação de carcaças e mortalidade devido ao desenvolvimento de aerossaculite, pericardite e perihepatite e peritonite. Lesões nas células do oviduto acarretam redução da produção e comprometimento da qualidade interna e externa dos ovos (Cook & Huggins, 1986). Alguns sorotipos determinam lesões renais com vários graus de comprometimento, são os denominados sorotipos nefropatogênicos, os quais estão relacionados com nefrite e nefrose aviária (Winterfield & Hitchner, 1962; Kinde *et al.* 1991). El-Houadfi (1986) isolou uma variante enterotrópica que foi capaz de causar lesões em algumas partes do intestino, além disso, lesões na traquéia, rins e oviduto de galinhas infectadas.

2.2.3. Sorotipos de VBIG

Jungherr *et al.* (1956) propuseram o sorotipo Connecticut como o primeiro VBIG diferente do sorotipo Massachusetts isolado anteriormente, e verificaram que não havia proteção cruzada entre os sorotipos sugerindo a pluralidade de amostras de VBIG.

Foram isoladas três amostras de sorotipos variantes de VBIG na Grã-Bretanha, provenientes de lotes vacinados, que não demonstraram relações antigênicas com os sorotipos vacinais (Gough *et al.*, 1996).

Alguns pesquisadores afirmam que, a BIG ainda constitui problema, inclusive em plantéis vacinados corretamente sugerindo a presença de sorotipos diferentes daquele utilizado na fabricação da vacina (Salle *et al.* 1988).

Estudos epidemiológicos continuam sendo necessários para se conhecer mais sobre as características antigênicas das amostras de VBIG que acometem os plantéis avícolas em todo o mundo.

No Brasil, o VBIG ainda constitui um problema responsável pela ocorrência de grande perdas econômicas nas atividades avícolas (Souza, 1999).

Di Fábio (1993) isolou, no estado de São Paulo entre 1987 e 1991, amostras de VBIG em plantéis vacinados. O autor relatou que, houve pouca relação sorológica entre as amostras

isoladas e o sorotipo Massachusetts.

Aproximadamente no mesmo período, Wentz (1992) isolou de algumas regiões brasileiras com intensa atividade avícola, quatorze amostras de VBIg, que foram submetidas a testes revelando algumas diferenças antigênicas entre elas e as amostras vacinais.

Wentz (1992); e Di Fábio (1993) evidenciaram a importância da adoção de métodos rápidos e sensíveis de detecção e classificação de estirpes virais para que se consiga traçar um programa eficiente de controle dessa enfermidade.

2.3. Prevenção e controle

O VBIg é altamente infeccioso, espalha-se rapidamente e pode persistir na galinha por várias semanas, muito embora um bom manejo aliado à normas gerais de biossegurança desempenhem um importante papel. O controle da doença não é possível sem o uso de vacinas (Cook, 1997). Esse controle através de imunizações nem sempre é satisfatório, pois de acordo com Schimidt (1988), as estirpes virais isoladas apresentam consideráveis diferenças antigênicas. Cook (1997) relata que, vacinas vivas atenuadas de VBIg, baseadas em linhagens "variantes" estão sendo licenciadas para uso. Isso ocorre onde foi conclusivamente demonstrado que sérios problemas são causados por esses tipos de vírus. As vacinas vivas atenuadas de linhagens "variantes", somente devem ser usadas em áreas onde esse tipo de vírus produz grandes perdas econômicas, sendo altamente desaconselhável utilizá-las em regiões "livres" desse desafio, pois há risco de introduzir um novo sorotipo, bem como ocorrência de recombinação genética.

2.4. Diagnóstico

Atualmente os procedimentos convencionais para diagnosticar o VBIg são representados pelo isolamento do vírus em ovos embrionados SPF ("Specific Pathogen Free"), seguido de identificação por meio da reação de soroneutralização (SN), que é considerada padrão para tipificação de VBIg.

A inoculação em ovos embrionados é um procedimento oneroso, podendo se tornar demorado se houver a necessidade de várias passagens em embriões até a adaptação do vírus. Ademais, o resultado é comumente obtido de forma subjetiva, embora possa ser analisado com a pesagem dos embriões. A possibilidade de variabilidade genética do vírus após a adaptação ao embrião em comparação com a

amostra original, pode comprometer os resultados de estudos subsequentes de amostras isoladas (Gough *et al.*, 1988).

O VBIg pode ser isolado em cultivos de anéis de traquéias sem a necessidade de adaptação e resultar em alterações adaptativas na amostra (Cook *et al.*, 1976).

Outros métodos utilizados para o diagnóstico da BIG, através da detecção direta do antígeno, incluem a microscopia eletrônica, a cultura de anéis de traquéia e as reações de imunofluorescência, imunodifusão em gel de ágar, imunoperoxidase e ensaios imunoenzimáticos (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay - ELISA).

2.4.1. Detecção do VBIg

A identificação morfológica do VBIg em tecidos suspeitos de infecção por meio de microscopia eletrônica é um procedimento rápido, porém é dependente de técnicos especializados para a sua execução, bem como de equipamentos e reagentes caros, o que limita a sua utilização na rotina de diagnóstico do VBIg (Endo-Munoz & Faragher, 1989).

A observação da ciliostase em culturas de anéis traqueais infectados, constitui-se em um método bastante sensível para a detecção do VBIg de amostras teciduais suspeitas de infecção (Darbyshire *et al.*, 1975). Contudo, o cultivo de anéis de traquéia é bastante laborioso e o critério para análise dos resultados é subjetivo, necessitando do emprego de outras técnicas para a confirmação do diagnóstico. Ainda uma outra desvantagem desse método é que outros vírus respiratórios, como por exemplo o vírus da doença de Newcastle e da laringotraqueíte infecciosa, podem causar a ciliostase e, conseqüentemente, a redução da especificidade deste teste (Bhattacharjee, Naylor & Jones, 1994).

A imunofluorescência é um método rápido e simples para o diagnóstico do VBIg em tecidos ou em células infectadas, porém apresenta uma sensibilidade relativamente baixa (Owen, *et al.*, 1991) e está sujeita ao aparecimento de reações inespecíficas (Yagy & Ohta, 1990). Além disso, a técnica exige equipamento especial e não é muito apropriada para processar um grande número de amostras.

Segundo Jonsson e Engstrom (1986), o teste de imunoperoxidase mostrou-se com alto potencial para fazer o diagnóstico direto do VBIg em tecidos infectados. Nesse sentido, Naqi (1990)

demonstrou que, a prova de imunoperoxidase indireta com anticorpos monoclonais teve um desempenho excelente na detecção do VBIg em tecidos de aves infectadas. Tal técnica, segundo esses mesmos autores, oferece uma alternativa ou mesmo complementa os métodos convencionais, pois detecta o VBIg em tecidos, em fases recentes da infecção, o que implica em uma redução no tempo de diagnóstico. No entanto, o seu procedimento pode ser considerado relativamente laborioso e os resultados obtidos de maneira subjetiva.

Novas técnicas de diagnóstico estão sendo desenvolvidas, como a reação em cadeia pela polimerase (Jackwood *et al.*, 1992) e utilização de anticorpos monoclonais em testes de imunodiagnóstico (Naqi *et al.* 1993). Essas provas serão úteis para a detecção do VBIg no diagnóstico, podendo ser adaptadas para a diferenciação de amostras do vírus constituindo uma grande ferramenta para os laboratórios de diagnóstico (Cook, 1999).

2.4.2. Detecção de anticorpos específicos contra VBIg

A prova de imunodifusão em gel de ágar, apesar de ser rápida e de baixo custo, apresenta pouca sensibilidade, havendo a necessidade de se concentrar o antígeno para que as linhas de precipitação possam ser observadas (Chubb e Cumming, 1971; Lohr, 1981).

Outras provas podem ser desenvolvidas para a detecção de anticorpos contra VBIg, entre elas incluem-se a imunofluorescência indireta, a imunoperoxidase indireta, a soroneutralização, a inibição da hemaglutinação e o ELISA.

A técnica de ELISA por sua alta sensibilidade, tem sido utilizada também para monitoramento de plantéis vacinados (Cook, 1999).

2.4.3. Tipificação de VBIg

A tipificação de estirpes virais pode ser feita pelos testes de soroneutralização em ovos embrionados, cultivos de anéis de traquéia e cultivos de células em monocamada, utilizando-se amostras de referência. Diferenças e semelhanças antigênicas também podem ser determinadas através do teste de inibição da hemaglutinação (IH), sendo entretanto, necessários cuidados especiais para interpretação dos resultados, devido à alta ocorrência de reações cruzadas quando se utiliza este teste. A reação em cadeia pela polimerase e o ELISA utilizando anticorpos monoclonais, são comprovadamente eficientes e e mais precisos

para este procedimento (Cook *et al.*, 1987; Naqi *et al.*, 1993; Cook, 1997).

Cook (1997) relata que, anticorpos monoclonais específicos contra a subunidade S₁ da glicoproteína S representam excelentes ferramentas de alta especificidade para detectar diferenças na região responsável pela tipificação de VBIg, contribuindo, dessa forma, para o desenvolvimento de estudos de classificação sorotípica do vírus.

Anticorpos monoclonais específicos aos sorotipos de VBIg utilizados em ELISA podem associar a alta sensibilidade do teste à alta especificidade destes reagentes, possibilitando ensaios capazes de detectar e tipificar amostras do vírus.

2.5. Anticorpos monoclonais

O soro dos animais contém uma ampla variedade de anticorpos que são específicos para uma diversidade de antígenos. A utilização dessa população de anticorpos cria uma multiplicidade de problemas quando utilizados em técnicas imunológicas. A preparação de anticorpos homólogos com especificidade definida foi uma extraordinária vitória da pesquisa imunológica (Harlow & Lane, 1988).

Köller & Milstein (1975), desenvolveram uma técnica que permite a perpetuação de clones de células secretoras de anticorpos. A técnica consiste na fusão de células capazes de secretar anticorpos originárias de um animal previamente imunizado, com células de mielomas (um tipo de célula B tumoral) com capacidade de crescimento contínuo. Esta célula híbrida ou hibridoma pode ser mantida "*in vitro*" e possui a capacidade de secretar anticorpos de especificidade pré-definida. Os anticorpos que são produzidos por estas células são conhecidos como anticorpos monoclonais. Cada anticorpo monoclonal é específico contra um único determinante antigênico do imunógeno ou antígeno.

Após a imunização, é realizada a coleta do baço dos camundongos que apresentarem títulos ótimos de anticorpos. O baço é então utilizado na fusão com células de mieloma.

Atualmente, está disponível uma variedade de células de mieloma, sendo a linhagem SP₂O/Ag14 a mais utilizada devido à sua facilidade de fusão com polietileno glicol (PEG), constituindo processo mais viável do que os demais fusógenos utilizados para tal procedimento, além de serem consagradas boas

produtoras de híbridos estáveis.

Todas as células são capazes de sintetizar DNA pelas vias *de novo* e *de salvação*. Desse modo, as células SP₂0/Ag14, são deficientes na enzima hipoxantina guanina fosforibosil transferase (HGPRTase) são incapazes de síntese de DNA a partir de aminoácidos e moléculas menores (via *de novo*). Por outro lado, a presença de aminopterina no meio de cultivo (HAT) resulta na seleção das células capazes de sintetizar DNA pela via *de salvação* eliminando as SP 0/Ag 14 não fusionadas com linfócitos. Assim, as células híbridas (mielomas com linfócitos) possuem capacidade de síntese de DNA herdada dos linfócitos e a capacidade de crescimento contínuo herdada dos mielomas. De acordo com Harlow & Lane (1988) esse é o princípio aplicado para a geração de hibridomas produtores de anticorpos monoclonais.

As células produtoras de anticorpos monoclonais são selecionadas através de imunensaio e posteriormente clonadas e propagadas em meios de cultura ou mesmo em camundongos BALB/c, onde crescem produzindo ascite ou tumor sólido (Blann, 1979; Yoshida *et al.*, 1980).

O processo de clonagem tem o propósito de obter apenas uma célula secretora de um único tipo de anticorpo, para que a linhagem da mesma possa ser estabelecida. Após a clonagem e expansão, as células podem, finalmente, ser estocadas em nitrogênio líquido, por um período indeterminado constituindo fontes secretoras de anticorpos monoclonais desejados (Harlow & Lane, 1988; Liddell & Cryer, 1991).

2.6. ELISA

O ensaio a ser utilizado para a seleção dos híbridos deve ser consideravelmente sensível e de fácil execução, pois a quantidade de anticorpos presentes no sobrenadante da cultura é reduzida (Liddell & Cryer, 1991).

O ELISA constitui uma boa opção por ser um ensaio que possui alta sensibilidade e baixo custo. Este ensaio foi descrito pela primeira vez por Engvall & Perlman (1972) e, desde então, é amplamente utilizado em rotinas de laboratórios de diagnóstico.

Diferentes autores descreveram a superioridade do ELISA como técnica capaz de quantificar anticorpos contra o VBIG em relação a outros testes sorológicos com IH e precipitação em gel de ágar (AGP), realçando sua alta sensibilidade e aplicabilidade (Marquardt *et al.*, 1981; Mockett & Darbyshire, 1981; Monreal *et al.*, 1985; Soula & Monreau, 1981).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Local

Os trabalhos foram realizados nos laboratórios de pesquisa do Setor de Doenças das Aves e de eletroforese do Setor de Virologia do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais.

3.2. Animais doadores de material experimental

Foram utilizadas fêmeas de camundongos da linhagem BALB/c, com idade de 4 a 6 semanas e peso aproximado de 25 gramas, adquiridas do Biotério do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG.

3.3. Produção dos antígenos

A produção dos antígenos foi realizada conforme método descrito por Cavanagh (1984), com modificações.

Foram utilizados ovos embrionados de aves SPF oriundas do criatório do Setor de Doença das Aves, com 9 a 11 dias de incubação, para a produção de cada partida de antígeno de VBIG. As amostras do vírus utilizadas foram: Massachusetts (M-41), Connecticut (Conn) e Arkansas (Ark-99), cujas sementes virais foram obtidas do American Type Culture Collection (ATCC).

Um intervalo mínimo de uma semana foi obedecido, para a inoculação de cada amostra diferente de VBIG, seguindo padrões gerais de biossegurança no laboratório.

Os ovos foram inoculados com 0,2mL da semente viral diluída em tampão fosfato PBS (apêndice 1) pH 7,2, autoclavado e adicionado de penicilina G potássica 12.500 UI, sulfato de estreptomicina 12,5mg/mL e sulfato de gentamicina 250µg/mL, contendo 100 doses infecciosas para embrião de galinha 50% (DIEG₅₀), via cavidade cório-alantóide e destinados à incubação à temperatura de 37,5°C e umidade de 80% (Incubadora Petersime, Santa Catarina, Brasil), durante 72 horas, com ovoscopia a cada 24 horas.

Após 72 horas, realizou-se a última ovoscopia e os embriões vivos foram refrigerados à temperatura de 4°C a 5°C, por 12 horas. Durante o processo de incubação, foram selecionados 10 ovos, que permaneceram em incubação até 19 dias de idade, com a finalidade de se avaliar a presença de lesões causadas pelo VBIG nos embriões. Em uma amostra do

líquido alantóide (LA) de cada embrião submetido ao teste para verificar lesões produzidas pelo VBIG, como controle de qualidade, realizou-se o teste de hemaglutinação (HA), objetivando a detecção do vírus da doença de Newcastle (VDN) (*Rubulavirus* da subfamília Paramyxovirinae), potencial contaminante de laboratório.

O LA foi colhido em conjunto, adicionando-se um composto inibidor de protease, fluoreto de fenilmetilsufonil (PMSF) na concentração de 1 mg de PMSF/L de LA. Durante todo o procedimento de coleta, o mesmo foi mantido em banho de gelo.

Após a coleta, o LA foi clarificado por centrifugação a 10.000xg (Sorvall RC-2B, com rotor GSA, DuPont, EUA), durante 40 minutos e temperatura de 4°C.

Para a concentração, o LA foi misturado à solução saturada de sulfato de amônia - SSSA (apêndice 2), contendo PMSF (apêndice 3), para se obter concentração final de 36% de sulfato de amônia, lentamente, a 4°C sob agitação magnética.

O material foi centrifugado como descrito anteriormente, para precipitar o vírus insolubilizado.

O precipitado viral foi ressuspenso em PBS 1x (apêndice 1) autoclavado, contendo 125 UI/mL de penicilina G potássica, 125mg de sulfato de estreptomicina e 250µg de sulfato de gentamicina, em volume 100 vezes menor que o original sendo, em seguida, submetido ao processo de diálise, por duas vezes, em PBS contendo azida sódica (2g/L), por um período de 48 horas.

A membrana de diálise, com porosidade para reter moléculas maiores que 12 kDa (Thomas, EUA) foi previamente lavada com água corrente e detergente (Extran, Merck, EUA), fervida em água destilada e enxaguada com água MilliQ 18,2MΩcm.

3.3.1. Purificação e concentração do antígeno viral

O concentrado viral, obtido por precipitação com sulfato de amônia, foi purificado em gradiente de sacarose.

O gradiente de sacarose foi constituído por soluções de sacarose (apêndice 5) em concentrações distintas, variando de 25% a 55 %.

Para compor o gradiente foi necessário adicionar, a partir do fundo do tubo, 2mL de cada solução de sacarose, iniciando-se pela de menor concentração e finalizando-se sempre com a de maior concentração.

Após formado o gradiente, os tubos foram estocados à temperatura de 4°C a 5°C, por um período mínimo de 12 horas, para formação de interface entre as diferentes concentrações de sacarose.

Em seguida, adicionou-se lentamente 1 mL do concentrado viral, anteriormente dialisado, na camada superior do gradiente de sacarose e centrifugou-se a 4°C por 40.000xg (Sorvall Ultra Pro 80, com rotor AH 629, DuPont, EUA), durante 16 horas.

Após a centrifugação, o fundo do tubo foi perfurado e foram coletadas alíquotas de, aproximadamente 500µL do conteúdo total em cada tubo de ensaio seqüencialmente numerado.

As alíquotas que continham o vírus foram determinadas por ELISA, descrito no item 3.3.2.

Para a concentração do antígeno viral, as alíquotas que produziram reações positivas no ELISA foram transferidas em pool para as membranas de diálise e imersas em polivinilpirrolidone (PVP) à temperatura de 4°C a 5°C até se obter um volume final de 1mL.

3.3.2. ELISA para avaliação do antígeno purificado de VBIG

A padronização do ensaio seguiu metodologia descrita por (Campbell, 1984).

O sistema de detecção utilizado foi o de titulação em bloco com o objetivo de detectar em qual fração do gradiente de sacarose o vírus estava presente.

Foram realizadas diluições seriadas com o antígeno, iniciando-se com a diluição de 1:10 até 1:1000 em tampão carbonato-bicarbonato pH 9,6 e diluições dos soros de camundongos sabidamente positivos e negativos para VBIG, iniciando-se pela diluição de 1:200 até 1: 25600 em PBS pH 7,4 com Tween 20 (Sigma, EUA) a 0,05% (PBST 0,05% apêndice 6).

Com a realização do teste, determinou-se a menor concentração de antígeno capaz de reagir com a maior diluição do soro, produzindo a maior reação colorimétrica. Esta diluição viral foi a escolhida para ser utilizada nos demais ELISA realizados durante todo o experimento.

Todos os volumes dos reagentes utilizados nos testes foram de 50µL. Entre cada etapa, as placas foram lavadas três vezes com PBST (apêndice 6).

Para a sensibilização das microplacas de ELISA (Corning, EUA), utilizou-se 3µL da amostra contida em cada tubo de ensaio, diluída em 50µL de tampão carbonato bicarbonato pH 9,6 (apêndice 7), para cada pocinho das mesmas.

As microplacas foram estocadas à temperatura de 4°C a 5°C por um período de 12 horas. Para remover antígeno não aderido, foram realizadas três lavagens com PBST 0,05% (apêndice 6) e o processo de secagem foi feito batendo-se a placa, vigorosamente, em camadas de papel-toalha sobre a bancada.

Em seguida, adicionou-se em cada pocinho da placa o soro de camundongo BALB/c imunizado (soro sabidamente positivo), soro sabidamente negativo e anticorpo monoclonal A13 anti S₁ (gentilmente cedido pelo Institute for Animal Health, Compton, Inglaterra), deixando reagir à 37°C, durante 30 minutos. As microplacas sofreram novas lavagens e secagens, como descrito anteriormente.

Adicionou-se o conjugado IgG de cabra - anti-IgG de camundongo e fosfatase alcalina (apêndice 12) na diluição de 1:30.000, seguindo recomendações do fabricante, deixando reagir à 37°C por 30 minutos.

Novamente foram realizados os processos de lavagens e secagem. E, finalmente, adicionou-se às placas o substrato p-nitrofenilfosfato - pNPP, (Sigma, EUA) (apêndice 13) diluído em dietanolamina com MgCl₂ (1mg/mL) (apêndice 14), conforme instruções do fabricante, deixando reagir até o aparecimento da cor. Após o aparecimento da cor a reação foi bloqueada com NaOH a 3N (apêndice 15).

A leitura foi realizada em leitor de ELISA (Microwell Reader modelo 550 BioRad, EUA) equipado com filtro de 405nm.

As amostras que apresentaram absorvância maior que o ponto de corte, foram agrupadas em um mesmo tubo de estocagem para posterior utilização.

3.3.3 Dosagem de proteína viral pelo método de Lowry

A dosagem de proteína viral foi realizada conforme o protocolo descrito por Hudson &

Hay (1989).

Preparou-se a solução 1 (apêndice 11) em frasco devidamente identificado e diluiu-se o reagente Folin a 1:3 em outro frasco.

Foram identificados quatro tubos de ensaio que destinaram-se, respectivamente para o branco da reação (tubo 1), para o reagente padrão (tubo 2) e para a amostra a ser testada (tubo 3 e tubo 4).

No tubo 1 foram adicionados 100µL de água MilliQ 18,2MΩcm; no tubo 2, 10µL do reagente padrão (albumina sérica bovina 1mg/mL) diluída em 90µL de água MilliQ 18,2MΩcm e nos tubos 3 e 4, 10 µL da amostra a ser testada diluída em 90µL de água MilliQ 18,2MΩcm. Os tubos foram homogeneizados. Em seguida, adicionou-se 1mL da solução 1 (apêndice 11) em cada tubo. A reação foi submetida à incubação em temperatura ambiente, por um período de 10 minutos. Em todos os tubos adicionaram-se 100µL do reagente folin (1:3). Homogeneizou-se, deixando novamente reagir, como descrito anteriormente. Para a leitura, 100µL de cada tubo (1, 2, 3 e 4) foram transferidos para a microplaca de ELISA, devidamente identificada e foi realizada com filtro de 655nm em leitor de ELISA (Microwell Reader Modelo 550 BioRad, EUA).

3.4. Imunização dos camundongos

Foram imunizados camundongos da linhagem BALB/c, com cinco doses de VBIG amostra M41, concentrado por sulfato de amônia (item 3.3) e purificado por gradiente de sacarose (item 3.3.1), variando entre 50µg a 80µg de proteína para cada aplicação. As quatro primeiras aplicações foram realizadas pela via intraperitoneal, em intervalos de 15 dias e uma última aplicação três a quatro dias antes da coleta do baço.

Para a primeira dose, o antígeno foi emulsionado com adjuvante completo de Freund (Sigma, EUA), sendo as demais realizadas com adjuvante incompleto (Sigma, EUA).

Para a avaliação da resposta imune, os soros dos camundongos foram testados por ELISA (item 3.5).

3.5. ELISA para avaliação dos camundongos

O ELISA foi executado segundo Engvall & Perlman (1972); Mockett & Darbyshire (1981);

Mocket *et al.* (1986), com modificações.

Todos os volumes utilizados para reagentes e foram de 50µL.

A lavagem foi realizada entre cada reação, por três vezes, utilizando-se 300µL de PBST 0,05% (apêndice 6).

O teste foi executado como descrito em 3.3.2.

As microplacas foram sensibilizadas com o antígeno diluído em tampão carbonato bicarbonato (apêndice 7), estocadas à 4°C por um período de 12 horas. Adicionou-se, posteriormente, o soro do camundongo (ou sobrenadante de cultivo de hibridomas) a ser testado deixando a reação em repouso à 37°C por 30 minutos. O conjugado Ig G de cabra - anti-Ig G de camundongo e fosfatase alcalina (SIGMA, EUA) (apêndice 12) foi adicionado deixando em repouso por 30 minutos e, em seguida, após a lavagem, adicionou-se o substrato p-nitrofenilfosfato-pNPP (SIGMA, EUA) (apêndice 13), aguardando o aparecimento da cor, que foi avaliada em leitor de ELISA com filtro de 405nm (Microwell Reader Modelo 550 BioRad, EUA).

Os camundongos que apresentaram títulos mais altos contra VBig amostra M-41 foram submetidos à quinta e última aplicação do antígeno 3 a 4 dias antes da coleta do baço daqueles, para a fusão.

Os camundongos que não foram utilizados para a fusão, foram posteriormente sacrificados e seus baços colhidos, preparados como no item 3.6.2. e os esplenócitos congelados para fusões posteriores

3.6. Produção dos hibridomas

A produção dos hibridomas foi realizada de acordo com Köller & Milstein (1975); Harlow & Lane (1988) e Hudson & Hay (1989), com algumas modificações conforme protocolo obtido da Universidade da Flórida (1999).

3.6.1. Preparo das células de mielomas SP₂0/Ag14

Foram utilizadas células de mielomas SP₂0/Ag14, não secretoras de imunoglobulinas (gentilmente cedidas pelo laboratório da Universidade da Flórida).

As células foram descongeladas em meio Roswell Park Memorial Institute - RPMI 1640 (Sigma, EUA) (apêndice 16) com 10% de soro fetal bovino (Gibco-BRL, EUA), repicadas a cada 24 horas (Cabine de Fluxo Laminar Trox

FLV, Brasil) e mantidas em estufa para cultivo celular (Napco, série 5.000, EUA), com atmosfera de 5% de CO₂, até a obtenção de número suficiente de células para a realização do processo de fusão.

3.6.2. Preparo das células de baço

O camundongo, selecionado para a fusão, foi sacrificado em câmara fechada contendo éter, lavado com iodo povidine e amônia quaternária a 1:10.000.

O baço foi removido, em condições assépticas (Cabine de Fluxo Laminar Trox FLV, Brasil), e transferido para uma placa de Petri estéril contendo 5mL de meio RPMI 1640 (apêndice 16) sem soro fetal bovino. Após a lavagem, o órgão foi transferido para outra placa de Petri contendo meio RPMI sem soro fetal bovino, onde procedeu-se a fragmentação de sua arquitetura, para liberar os esplenócitos. O conteúdo da placa foi transferido para um tubo plástico estéril de fundo cônico (Sigma, EUA), centrifugado a 500xg por 5 minutos em temperatura ambiente, por três vezes.

Os camundongos que também apresentaram títulos desejáveis e não foram utilizados para a fusão, tiveram seus baços colhidos e seus esplenócitos foram adequadamente preparados como descrito no item 3.6.2. e congelados como no item 3.6.9.

3.6.3. Preparo dos macrófagos

O camundongo foi sacrificado em câmara fechada contendo éter e levado, após sua e assepsia e desinfecção, para o laboratório.

A lavagem da cavidade intraperitoneal foi realizada em condições assépticas, com meio RPMI sem soro fetal bovino, o conteúdo resultante desta lavagem foi colhido com pipeta de Pasteur estéril e transferido para garrafas de cultivo de células, destinadas à incubação por um período de 24 horas e avaliadas antes de sua utilização.

3.6.4. Contagem das células

As células SP₂0/Ag14 e os esplenócitos foram contados utilizando-se câmara de Neubauer.

O procedimento de coloração recomendado (Hudson & Hay, 1989) foi realizado coletando-se uma alíquota do meio contendo células de baço e diluindo-se em azul de Tripán a 0,3% para a concentração final de 10⁻². Para as células de mieloma, diluiu-se uma alíquota do meio contendo as células em utilizando-se o mesmo reagente na proporção de 10⁻¹.

De acordo com o recomendado em processos de fusão (Harlow & Lane, 1988 e Hudson & Hay, 1989), foram utilizadas 1×10^8 células de baço para 1×10^7 células de mielomas.

3.6.5 Fusão

A fusão foi realizada de acordo com o protocolo descrito por Harlow & Lane (1988) e Hudson & Hay (1989), com algumas modificações conforme recomendado pela Universidade da Flórida (1999).

Foram misturadas 1×10^8 células de baço com 1×10^7 células de mielomas em um tubo plástico estéril de fundo cônico (Falcon, Sigma, EUA) de 15mL. Após a homogeneização, as células foram centrifugadas a 500xg (Centrifuga Fanen Excelsa, Brasil) por 7 minutos em temperaturas ambiente. Descartou-se o sobrenadante e adicionou-se 0,8mL de polietilenoglicol – PEG (Sigma, EUA) (apêndice 18), previamente aquecido a 37°C, durante 1 minuto. Logo em seguida, adicionou-se 5mL de meio RPMI 1640 (apêndice 16) livre de soro fetal bovino, durante 1 minuto e completou-se com 10 mL do mesmo meio, durante 5 minutos. Realizou-se centrifugação a 500xg por 10 minutos. Descartou-se o sobrenadante e as células foram ressuspensas em meio HAT contendo 10 % de soro fetal bovino (Sigma, EUA) (apêndice 19), transferidas para o tubo plástico de fundo cônico (tipo Falcon) estéril de 50mL completando-se com 35mL de meio HAT contendo 10 % de soro fetal bovino e, finalmente, transferiu-se 50µL do conteúdo do tubo para cada pocinho da microplaca de cultivo celular de 96 pocinhos. Para a posição A₁ da placa foram transferidas células SP2/0-Ag14 com o objetivo de se realizar um controle da eficácia do meio HAT (apêndice 19).

Sete microplacas foram incubadas, após a fusão, em estufa para cultivo celular com atmosfera de 5% de CO₂ (Napco, EUA).

Foram realizadas avaliações ao microscópio invertido (Olympus modelo IX50, Japão) com objetivas de 10 e 20 vezes e monitoramentos diários das células, necessitando-se trocar o meio, quando o mesmo se apresentava de coloração amarelada (ácido).

O meio HAT (apêndice 19) foi utilizado para manutenção das células após a fusão, até que todas as células do pocinho A₁ estivessem mortas. A partir deste ponto, foi substituído pelo

meio HT (apêndice 20).

3.6.6 Seleção dos híbridos após a fusão

A presença de anticorpos contra o VBIg nos sobrenadantes dos híbridos foi detectada por ELISA, como descrito no item 3.5.2.

As placas foram sensibilizadas com o antígeno diluído em tampão carbonato bicarbonato (apêndice 7), estocadas à 4°C por um período de 12 horas, lavadas em PBST 0,05% (apêndice 6) e adicionadas de 50µL dos sobrenadantes dos híbridos, deixando a reação em repouso à 37°C por 60 minutos.

O conjugado Ig G de cabra anti-IgG de galinha e fosfatase alcalina (SIGMA, EUA) (apêndice 12), foi adicionado e, finalmente o substrato p-nitrofenilfosfato p-NPP (SIGMA, EUA) (apêndice 13), aguardando o aparecimento da cor para avaliação em leitor de ELISA (Microwell Reader modelo 550 BioRad, EUA) com filtro de 405nm.

A partir das informações do ELISA, os híbridos foram selecionados para o processo de clonagem.

3.6.7 Expansão dos híbridos

Após a seleção dos híbridos produtores de anticorpos contra o VBIg, por ELISA, os mesmos foram submetidos ao teste de *immunoblotting* para a sua caracterização quanto à especificidade e, posteriormente expandidos com a finalidade de se obter número suficiente de células para a clonagem. O meio HAT (apêndice 19) foi substituído gradativamente pelo meio HT (apêndice 20) e este pelo RPMI (apêndice 16) contendo 10% de soro fetal bovino à medida em que os híbridos iam sendo transferidos para placas de cultivo celular de 24 e de 6 divisões.

3.6.8 Clonagem

A clonagem foi realizada pelo método de diluição limitante de acordo com metodologia descrita por Harlow & Lane (1988) e Hudson & Hay (1989).

O método consiste em contagem das células para a semeadura de 5 a 10 células por mL. As células foram distribuídas, na diluição de 1 células/ pocinho, em 48 pocinhos das microplacas de cultivo de 96 divisões, que continham macrófagos previamente cultivados

por 24 horas.

Os clones foram avaliados a cada 24 horas e quando apresentavam-se estabelecidos, foram testados por ELISA e *immunoblotting* para posterior expansão e congelamento.

3.6.9. Congelamento das células

As células foram congeladas seguindo metodologia descrita por Campbell *et al.* (1984) com algumas modificações. Foram centrifugadas a 500xg durante 5 minutos, ressuspensas em 1mL de meio para congelamento (apêndice 21) e transferidas para criotubos, devidamente identificados. Os criotubos foram acondicionados em frascos contendo álcool comercial e destinados ao armazenamento à -70°C por um período de 12 horas de onde foram transferidas para a estocagem em nitrogênio líquido.

3.7 Obtenção do sobrenadante de cultura contendo anticorpos monoclonais

Após a centrifugação, os sobrenadantes das culturas, contendo anticorpos monoclonais produzidos *in vitro* foram colhidos em condições assépticas e armazenados em garrafas para cultivo celular, adicionados de azida sódica e, finalmente, estocados à 4°C para realização dos testes de caracterização quanto ao isotipo (classe de anticorpo) e à especificidade (sítio de reconhecimento em VBIg).

3.8. Caracterização dos anticorpos monoclonais

Foram realizadas as caracterizações quanto ao isotipo pelo Kit de ELISA (American Qualex, EUA) como descrito no item 3.8.2 e quanto à especificidade pelo método de *immunoblotting* realizado de acordo com o item 3.8.1.4.

3.8.1. Caracterização quanto à especificidade – Immunoblotting

3.8.1.1. Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE)

A eletroforese foi realizada segundo Laemmli (1979), Cavanagh (1983) e Promega (1996) com algumas modificações.

Os géis foram montados entre placas de suporte de vidro (90 x 60mm) separadas por espaçadores de 0,75mm de espessura. Os géis de poliacrilamida de separação e de aplicação

foram utilizados nas concentrações de 10% (apêndice 32) e 4% (apêndice 31), respectivamente.

Antígenos purificados (item 3.3) das amostras M41, A5968 e Ark-99 foram utilizados. A cada antígeno, contendo 500µg proteína/mL, foram adicionados 425 µL do tampão da amostra 2x (apêndice 26) e 50µL de 2-mercaptoetanol. Em seguida, a amostra foi submetida à fervura por 5 minutos. Logo após, foi transferido para o gel de aplicação, já polimerizado entre as placas de suporte.

Foram utilizados em todas as eletroforeses, padrões marcadores de peso molecular (175, 83, 62, 47.5, 32.5, 25 e 16.5 kDa), preparados de acordo com recomendações do fabricante.

A corrida eletroforética foi realizada a 60V no gel de aplicação e a 100V no gel de separação.

Logo após a corrida realizou-se a transferência pelo método "Semi Dry" (item 3.8.1.2).

3.8.1.2. Transferência para a membrana de nitrocelulose pelo método "Semi Dry"

Após a eletroforese, o gel foi cuidadosamente retirado das placas, e acondicionado em vasilha plástica contendo tampão de transferência (apêndice 33), onde permaneceu, por um período de 15 minutos, até a montagem do aparelho para transferência (Semi Dry BioRad de 110V BioRad, EUA).

Em seguida, foram utilizadas 2 folhas de papel filtro e 1 membrana de nitrocelulose de 0,45µm para cada gel.

A transferência foi realizada a 25V por 25 minutos.

Após a transferência, as membranas foram lavadas com tampão de lavagem (apêndice 34), envolvidas em filme de PVC e congeladas a -20°C, para posterior revelação. Ao final do processo, o gel foi corado pelo azul de Coomassie com a finalidade de avaliar a eficácia da transferência.

3.8.1.3. Coloração pelo azul de Coomassie

Após a eletroforese o gel foi transferido para uma solução fixadora (apêndice 36), onde permaneceu por 15 minutos. Em seguida, o mesmo foi colocado em um recipiente contendo solução corante (apêndice 37) composta de

0,1% de azul brilhante (brillant blue ® 250) , onde permaneceu por 30 minutos. Depois, foi feita a descoloração, utilizando-se uma solução decolorante (apêndice 38) contendo ácido acético, até a obtenção da diferenciação das bandas.

3.8.1.4. Immunoblotting

A membrana de nitrocelulose com transferência foi descongelada em tampão de lavagem (apêndice 34). Foram realizadas 3 lavagens com tampão de lavagem TBST (apêndice 34), com duração de 5 minutos cada uma, em temperatura ambiente. Bloqueou-se em tampão de bloqueio TBS (apêndice 35), por 90 minutos em temperatura ambiente, sob agitação constante e em seguida, foi acondicionada em aparelho para fixação de membrana (Mini Protean ® II Multi Screen BioRad, EUA). O sistema subdivide a membrana de nitrocelulose em 20 canaletas independentes.

Foram adicionados 200 µl de sobrenadante de cada híbrido a ser testado em cada canaleta do aparelho, incubando-se à temperatura ambiente por 3 horas. Uma canaleta foi destinada para a colocação do soro policlonal de camundongo BALB/c, pré-testado em ELISA para VBIg M-41, na diluição de 1:10 e outra para o sobrenadante de SP₂0-Ag14, a fim de servirem como controle positivo e negativo, respectivamente.

Após a incubação, as canaletas foram lavadas com tampão de lavagem TBST e foram adicionados 200µL de conjugado IgG de cabra molécula inteira de anti-IgG de camundongo com fosfatase alcalina (SIGMA, EUA) na diluição de 1:10.000 em PBS com 1% de BSA, recomendada pelo fabricante, sendo incubadas por 60 minutos à temperatura ambiente e sob agitação constante.

Após a lavagem, foram adicionados 200µL de substrato revelador para *western blotting* (*Western Blue® Stabilized Substrate for Alkaline Phosphatase*, Promega, EUA).

3.8.2. Caracterização quanto ao isotipo

A isotipagem foi determinada utilizando-se o Kit "Mouse monoclonal sub-isotyping K5151" (American Qualex, EUA) de acordo com as recomendações do fabricante. Entre duas etapas foram feitas três lavagens com PBST.

O teste imunoenzimático constituiu-se de

sensibilização das microplacas de ELISA com anticorpos de ovelhas anti-imunoglobulinas de camundongos, incubando-se a 4 a 5°C durante 18 a 24 horas; bloqueio com tampão de bloqueio e incubação em temperatura ambiente por 60 minutos; adição do sobrenadante dos hibridomas incubando-se por 60 minutos, adição de imunoglobulina de coelho contra cada isotipo de imunoglobulina da camundongo incubando-se por 60 minutos à temperatura ambiente; adição de conjugado incubando-se como descrito anteriormente; adição do substrato incubando-se em leitor de ELISA (Microwell Reader Modelo 550, BioRad, EUA) com filtro de 655nm.

3.9. ELISA aplicando os AcM anti-S₁ produzidos pelos clones 4H₁, 4D₇ e 4D₉

Os clones 4H₁, 4D₇ e 4D₉ são oriundos da clonagem do hibridoma 3E₂, cujo sobrenadante reagiu, no *immunoblotting* com o glicopetídeo S₁ do virion de VBIg.

Os AcM produzidos por 4H₁, 4D₇ e 4D₉ foram avaliados no ELISA frente às amostras brasileiras, com a finalidade de se detectar afinidades antigênicas entre isolados de VBIg de campo e amostras de referência M41, SE17 (sorotipo Geórgia) e H52 (sorotipo Massachusetts- amostra vacinal). Foram utilizadas oito amostras de VBIg de campo, 297, 283, PM1, PM2, PM3, 351, 29-78 e 327, listadas na Tabela 1. Estas foram isoladas pelo professor José Sérgio Rezende, do Setor de Doença das Aves da UFMG, oriundas de lotes de frangos de corte com histórico de doença respiratória e síndrome nefrite-nefrose. As alíquotas dos antígenos foram previamente padronizadas em sua composição protéica (Souza, 1999), contendo 200µg/mL.

Tabela 1: Caracterização das amostras do vírus da bronquite infecciosa das galinhas isoladas de casos clínicos da doença no Estado de Minas Gerais.

Número de identificação das amostras	Passagens em OEG/SPF	Ano de isolamento	Principais sinais clínicos
297	2	1983	R
283	2	1983	SNN
PM1	3	1987	R
PM2	2	1987	R
PM3	2	1989	R
351	3	1984	SNN
29-78	6	1978	R
327	2	1983	SNN

FONTE: SOUZA, 1999

Notas: R- sinais respiratórios; SNN- Síndrome nefrite-nefrose.

As amostras M41 e SE17 foram obtidas do

ATCC e a amostra vacinal H52 foi adquirida, em forma de vacina, do laboratório responsável pela distribuição da vacina.

Os antígenos foram preparados como descrito anteriormente, no item 3.3.

O ELISA foi desenvolvido seguindo protocolo realizado por Souza (1999).

O volume utilizado para cada reagente foi de 100µL e, entre cada etapa, foram realizadas 4 lavagens com PBST (apêndice 6).

Para a sensibilização das microplacas (Corning, EUA), o antígeno foi diluído em tampão carbonato-bicarbonato (apêndice 7), na concentração de 200µg de proteína/mL.

Os AcM foram adicionados às microplacas e incubados à 37°C, durante 60 minutos. Adicionou-se o conjugado IgG de cabra anti-IgG de galinha e fosfatase alcalina (apêndice 13), deixando em incubação à 37°C por 30 minutos. Finalmente, adicionou-se o substrato p-NPP (apêndice 14) deixando reagir à 37°C durante 40 minutos, quando foi bloqueada com NaOH 3N.

A leitura foi realizada com filtro 405nm em leitor de ELISA (*Microwell Reader* modelo 550 BioRad, EUA).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Produção do antígeno

Dos 500 ovos embrionados utilizados para a produção de cada partida de antígeno de VBIG, obteve-se um volume total de 3.250mL de líquido alantóide (LA) para as amostras M41 e Conn e 3.000mL para a amostra Ark99, cujas médias de produção de LA por embrião podem ser verificadas na Tabela 2.

Tabela 2: Média de produção de LA por embrião de galinha para cada amostra de VBIG.

Amostra de VBIG	Quantidade de OEG* inoculada	Volume total de LA produzido	Produção média de LA /OEG
M41 ¹	500	3.250	6,5 mL
ARK 99 ²	500	3.250	6,5mL
A5968 ³	500	3.000	6,0mL

Notas: 1 Amostra M41, sorotipo Massachusetts; 2 Amostra Ark-99, sorotipo Arkansas; 3 Amostra A5968, sorotipo Connecticut; * OEG ovos embrionados de galinha; **LA Líquido alantóide.

Os resultados obtidos nessa etapa são

compatíveis com a literatura consultada (Cavanagh, 1983 e 1984).

O teste de HA realizado com as amostras de LA para controle de qualidade não evidenciou efeito hemaglutinante, descartando-se, dessa forma, a possibilidade de contaminação com o vírus da doença de Newcastle.

4.2. Dosagem protéica

A concentração de proteína avaliada pelo método de Lowry, de cada amostra de VBIG foi calculada a partir da absorvância encontrada no reagente (albumina sérica bovina a 1mg/mL). O valor da absorvância é diretamente proporcional à concentração protéica da amostra padrão de concentração conhecida. Os valores obtidos podem ser observados na Tabela 3.

Tabela 3: Concentração protéica de amostras de VBIG

Amostra	Concentração mg/mL*
M41	6,63
ARK99	11,2
A5968	5,42

*O método de Lowry com padrão de soroalbumina bovina a 1mg/mL; leitura a 655nm (*Microwell Reader*, modelo 550 BioRad, EUA).

O volume e a concentração de proteína antigênica obtidos foram suficientes para serem utilizados durante todo o experimento.

4.3. ELISA para avaliação do VBIG purificado em gradiente de sacarose

Observou-se que a concentração ótima foi a diluição de 1:20 contendo 1,25µg de proteína por pocinho, resultando em valores ótimos de absorvância para uma boa discriminação dos soros positivos e negativos, bem como para que houvesse economia de antígeno.

Esses resultados obtidos assemelham-se aos de Koch *et al.* (1986) que relataram a utilização de 0,5 a 1,0µg de proteína por pocinho para a sensibilização de microplacas de ELISA para VBIG.

4.4. Imunização dos camundongos

As cinco fêmeas de camundongo da linhagem BALB/c imunizadas apresentaram títulos de anticorpos superiores a 25.600. Apresentaram, portanto uma excelente resposta humoral específica contra o VBIG, avaliada por ELISA, resultante da adoção de um eficiente programa de imunização.

4.5. Produção dos hibridomas

Foram realizadas 3 fusões durante o experimento. Duas utilizando esplenócitos frescos diretamente coletados de camundongos e uma utilizando esplenócitos que passaram por um processo de congelamento prévio. Os primeiros hibridomas estabeleceram-se em torno do décimo quinto dia após a fusão, quando foram testados por ELISA para avaliar a presença de anticorpos específicos contra a amostra M41 de VBIG.

Nas microplacas de cultivo, cujas fusões foram realizadas com esplenócitos frescos, detectaram-se 36 cultivos individualizados contendo células híbridas positivas. Na fusão com esplenócitos congelados 17 cultivos foram detectados. Os resultados corresponderam a 2,6% do total de cultivos para as duas primeiras fusões e 2,5% para a última fusão, indicando e sugerindo a possibilidade de se compor um banco de células de baço congeladas capazes de produzir hibridomas viáveis sendo, portanto, desnecessária a manutenção dos camundongos por um longo período e garantindo, assim, a disponibilidade de esplenócitos quando necessários. Os resultados obtidos nessa fusão assemelham-se aos relatados por Marusich (1988), que produziu hibridomas viáveis utilizando esplenócitos previamente congelados.

Os principais hibridomas resultantes da fusão utilizando-se esplenócitos frescos foram selecionados e denominados de acordo com sua posição na placa de cultivo e aqueles resultantes da fusão com esplenócitos congelados, após a avaliação por ELISA, para verificar a presença de anticorpos específicos contra M41 de VBIG, receberam a denominação BC seguida de numeração seqüencial, para diferenciar cada cultivo individualizado e foram congelados e estocados em nitrogênio líquido para trabalhos futuros.

4.6. Caracterização dos sobrenadantes dos hibridomas quanto à especificidade

Após a seleção por ELISA, um *immunoblotting* foi realizado com o sobrenadante dos hibridomas a fim de caracterizá-los quanto à sua especificidade em relação os componentes antigênicos da amostra M41 de VBIG.

Na tabela 4 podem ser verificados os resultados do *immunoblotting* dos hibridomas.

Tabela 4. Resultados da caracterização por *western blotting* dos anticorpos quanto à reatividade aos componentes protéicos estruturais da amostra M41 de VBIG.

Sobrenadantes dos Hibridomas	Pesos Moleculares Kda das proteínas	Reatividade
1C ₉	180 - 170	S
3E ₃ *	180 - 170	S
2E ₃	180 - 170	S
1E ₃	180 - 170	S
4E ₃	180 - 170	S
3E ₂	90	S ₁
3E ₃	84	S ₂
2D ₄	84	S ₂
1C ₁₀	84	S ₂
3B ₁₀	84	S ₂
1C ₄	54	N
2C ₇	30	M
1B ₉	84 e 54	Multiclonal
1C ₈	Multiclonal	Multiclonal
1B ₈	Multiclonal	Multiclonal
3B ₁₀	Multiclonal	Multiclonal
3F ₅	Multiclonal	Multiclonal
3C ₅	Multiclonal	Multiclonal
3D ₃	Multiclonal	Multiclonal
3D ₁₀	Multiclonal	Multiclonal
3F ₃	Multiclonal	Multiclonal
2H ₆	Multiclonal	Multiclonal
3E ₃	Multiclonal	Multiclonal
3C ₉	NR	NR
1G ₁	NR	NR
1E ₉	NR	NR
2H ₆	NR	NR
3C ₇	NR	NR
1H ₇	NR	NR
1B ₉	NR	NR
3D ₁₀ *	NR	NR

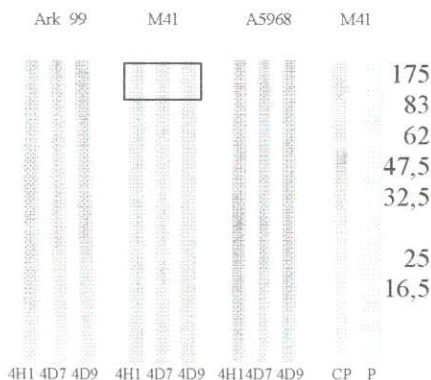
Notas: S - reagiu com a proteína íntegra; S₁ - reagiu com a subunidade S₁ da espícula; S₂ - reagiu com a subunidade S₂ da espícula; N - reagiu com a nucleoproteína; M - reagiu com a glicoproteína da membrana; NR - não reagiu no teste; * posições repetidas dos pocinhos.

Seguindo o objetivo do projeto, selecionou-se o híbrido 3E₂ que reagiu com o glicopeptídeo S₁ para clonagem e expansão. Os demais hibridomas foram congelados para trabalhos futuros.

Após o estabelecimento dos clones 4H₁, 4D₇ e 4D₉ produzidos a partir do híbrido 3E₂ e nova avaliação por ELISA, aqueles que reagiram no ELISA, foram testados frente às três amostras de VBIG: M41; ARK99 e A5968 em

immunoblotting. Os resultados podem ser observados na figura 1.

Figura 1 *Immunoblotting* dos clones 4H₁, 4D₇ e 4D₉



Notas: Ark-99: amostra do sorotipo Arkansas; M41: amostra do sorotipo Massachusetts; CONN: amostra A5968 do sorotipo Connecticut; CP- Controle positivo (soro do camundongo imunizado com VBIG); P- Padrão de peso molecular; reação positiva em destaque.

Pode-se verificar que os AcM 4H₁; 4D₇ e 4D₉ oriundos da clonagem de 3E₂, são específicos para a subunidade S₁ da amostra M41 do VBIG, pois os mesmos não reagiram com as outras duas amostras utilizadas no *immunoblotting*.

Os resultados estão de acordo com a literatura consultada. Cook (1997) relata que anticorpos monoclonais contra S₁ da glicoproteína S representam ferramentas de alta especificidade no estudo de amostras de VBIG. Cavanagh *et al.* (1992) também afirmam que diferenças sorológicas entre amostras de VBIG isoladas concentram-se na chamada região hipervariável da subunidade S₁.

Mockett *et al.* (1984) produziram anticorpos monoclonais contra S₁ evidenciando a sua especificidade apenas para a amostra M41 de VBIG e possibilidade de utilizá-los em testes de imunodiagnóstico.

Souza (1999) relatou a utilização de ELISA com anticorpos monoclonais contra S₁ constatando que a padronização do ensaio foi eficiente para diferenciação antigênica de amostras isoladas de VBIG.

4.7. Caracterização dos anticorpos quanto ao isotipo

No teste de ELISA realizado com o kit de isotipagem da American Qualex os anticorpos produzidos pelos clones 4H₁, 4D₇ e 4D₉ foram caracterizados como sendo da classe das imunoglobulinas G (IgG) e subclasse IgG 2a.

4.8. ELISA utilizando os AcM

O ponto de corte foi determinado pela média das absorvâncias do controle negativo (VDN) acrescida de três desvios-padrão. O resultado obtido foi de 0,060.

O teste foi realizado em duplicata e o resultado de sua absorvância foi obtido da média destes dois testes para cada AcM frente às amostras testadas.

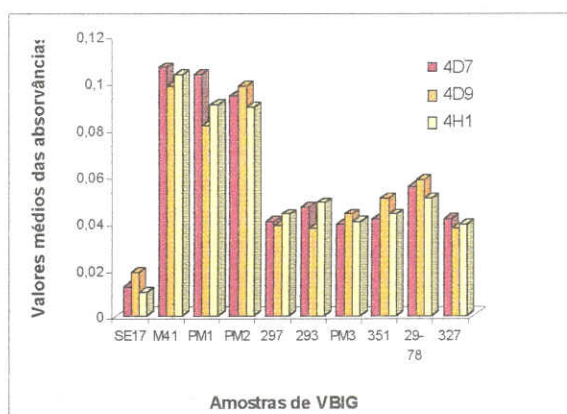
Os resultados podem ser observados na Tabela 5 e Figura 2.

Tabela 5. Valores médios das absorvâncias das amostras de VBIG testadas em ELISA frente aos anticorpos monoclonais anti-S₁ produzidos pelos clones 4H₁; 4D₇ e 4D₉

Amostras	Absorvância dos		AcM 4H ₁
	4D ₇	4D ₉	
SE17	0.012	0.018	0.010
H52	0.806	0.801	0.826
M41	0.106	0.098	0.103
PM1	0.103	0.801	0.090
PM2	0.094	0.098	0.089
297	0.040	0.038	0.043
293	0.046	0.037	0.048
351	0.041	0.050	0.043
PM3	0.039	0.043	0.040
29-78	0.055	0.058	0.050
327	0.041	0.037	0.039

Notas: SE17-sorotipo Geórgia SPAFAS Norwich, CT-EUA 06360-1301; H52 – amostra vacinal; valores em negrito são superiores ao ponto de corte = 0,060.

Figura 2. Valores médios das absorvâncias das amostras de VBIG testadas em ELISA frente aos anticorpos monoclonais anti-S₁ produzidos pelos clones 4H₁; 4D₇ e 4D₉



Analisando os resultados da Tabela 5 e Figura 2, pode-se observar que os AcM produzidos pelos clones 4D₇, 4D₉ e 4H₁ reagiram frente às amostras M41, PM1, PM2 e H52 com valores de absorvância acima do ponto de corte

determinado no ensaio. As reações dos AcM 4H₁ e 4D₇ foram mais intensas contra o antígeno de H52 (Tabela 2), que podem estar relacionadas com maior concentração de partículas virais neste antígeno, considerando sua maior adaptação ao cultivo em embriões de galinhas que as demais amostras, apesar de haver padronização quanto à concentração protéica.

As demais amostras testadas apresentaram absorvância abaixo do ponto de corte, ou seja, não foram reconhecidas pelos AcM.

As amostras que apresentaram valores médios de absorvância superiores ao ponto de corte, possuem afinidades antigênicas em relação à amostra M41 de VBIG e aquelas com valores de absorvância inferiores ao ponto de corte não possuem afinidades antigênicas com a amostras utilizadas na produção dos AcM, traduzindo a hipervariabilidade da região à qual estes anticorpos são direcionados.

É importante ressaltar que as amostras PM1, PM2 e PM3 são oriundas de uma mesma região do Estado de Minas Gerais, onde a atividade avícola é intensificada concentrando-se grande densidade de aves. Os anticorpos monoclonais utilizados no ELISA não reagiram com a amostra PM3, revelando um valor de absorvância inferior ao ponto de corte, traduzindo que a amostra não possui relação antigênica com a M41 do sorotipo Massachusetts.

Os resultados obtidos estão coerentes com a literatura. Mockett *et al* (1984) testaram AcM produzidos contra S₁ da amostra do VBIG frente a diversas amostras, verificando que os mesmos reconheceram somente M41. Souza (1999) utilizando AcM contra S₁ de M41 em ELISA, verificou que existem amostras isoladas de granjas do Estado de Minas Gerais que não possuem identidade antigênica com o sorotipo Massachusetts, utilizado em programas de vacinação.

5. CONCLUSÕES

Foram produzidos AcM específicos contra componentes estruturais responsáveis pelo aspecto sorológico do vírus da bronquite infecciosa das galinhas e sua avaliação foi efetuada no estudo de amostras de referência e isoladas de BIG de campo.

Foram produzidos os AcM 4D7, 4D9 E 4H1, específicos contra a glicoproteína S1 da amostra M41 do vírus da bronquite infecciosa das galinhas e caracterizados como IgG e subclasse IgG 2a.

Foram avaliados os AcM 4D7, 4D9 E 4H1 anti-S1 de M41 frente as amostras de referência M41 (sorotipo Massachusetts), A5968 (sorotipo Connecticut) e Ark-99 (sorotipo Arkansas) em *immunoblotting* comprovando a especificidade para M41.

Foram avaliados os AcM 4D7, 4D9 E 4H1 frente as amostras de referência SE-17 (sorotipo Georgia) e H52 (amostra vacinal do sorotipo Massachusetts), em ELISA, comprovando sua especificidade contra amostras de diferentes origens (M41 e H52) integrantes do sorotipo Massachusetts.

A especificidade dos AcM 4D7, 4D9 E 4H1 é possivelmente de espectro que abrange diferentes amostras do sorotipo Massachusetts.

Foram avaliados os AcM frente a oito isolados de VBIG de campo 29/78, 283/83, 297/83, 327/83, 351/84, PM1/87, PM2/87 e PM3/89 em ELISA, com detecção apenas dos isolados PM1 e PM2, o que indica serem classificáveis no sorotipo Massachusetts. As demais foram antigenicamente diferentes da amostra M41 e podem ser sorologicamente diferentes do sorotipo Massachusetts.

Os AcM 4D7, 4D9 E 4H1 podem ser ferramentas para o estudo epidemiológico de amostras de VBIG.

A fusão de células de mieloma com esplenócitos previamente congelados resultou na produção de híbridos viáveis, traduzindo a possibilidade de formação de um banco de células de baço de camundongos imunizados com uma ampla variedade de antígenos de acordo com o interesse de cada laboratório.

6. APÊNDICES

APÊNDICE 1 – PBS 1x

Solução estoque 10x

NaCl	80g
KH ₂ PO ₄	2g
Na ₂ HPO ₄ +12H ₂ O	29g
KCl	2g
Água MilliQ 18MΩcm	1000mL

PBS 1x

Solução Estoque 10x	100mL
Água MilliQ 18MΩcm	900mL

APÊNDICE 2 – Solução Saturada de sulfato de amônia (SSSA)

Sulfato de Amônia	500g
Na ₂ HPO ₄ +12h ₂ O	15,4g
Água MilliQ 18MΩcm	500mL

APÊNDICE 3 – PMSF

PMSF	3,2g
Etanol pa (MERK)	3,5mL

APÊNDICE 4 – Tampão NET

NaCl	5,85g
EDTA	0,292g
Tris-HCl (PM: 157,6)	0,261g
Tris base (PM: 121,1)	1,010g
Água MilliQ 18MΩcm	1000mL

APÊNDICE 5 – Soluções de Sacarose

Solução estoque de sacarose

Sacarose	171g
Tampão NET	90mL

Soluções de sacarose de concentrações diferentes (25% a 55%)

Concentração Desejada	Volume da solução mL	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	1,4170

APÊNDICE 6 – PBST

PBS 10x (apêndice 1)	100mL
Tween 20	0,5mL
Água MilliQ 18MΩcm	900mL

APÊNDICE 7 – Tampão Carbonato/Bicarbonato

Solução estoque A

NaCO ₃ Carbonato de sódio anidro	21,2g
Água MilliQ 18,2MΩcm _{qsp}	1000mL

Solução estoque B

NaHCO ₃	16,8
Água MilliQ 18,2MΩcm _{qsp}	1000mL

Tampão carbonato/ bicarbonato

Solução estoque A	16mL
Solução estoque B	34mL

APÊNDICE 8 - Tartarato de sódio e potássio 4%

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

APÊNDICE 9 –

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

APÊNDICE 10 – NaCO₃ (Carbonato de sódio) 3% em NaOH 0,1N

Solução de NaOH (3N)	3,4 mL
Água MilliQ 18MΩcm	100mL
NaCO ₃	3g

APÊNDICE 11 – Solução 1

Solução de tartarato de sódio e potássio (apêndice 11)	0,1mL
Sulfato de cobre 2% (apêndice 12)	0,1mL
Solução de NaOH 0,1N (apêndice 13)	4,8mL

APÊNDICE 12 – Conjugado

PBST	Recomendações
Anti IgG + Fosfatase alcalina	do fabricante

APÊNDICE 13 - PNPP a 1mg/mL em dietanolamina

Pastilhas de pNPP (10mg)	1 pastilha
Tampão dietanolamina	10mL

* Diluição recomendada

APÊNDICE 14 – Substrato p-Nitrofenil fosfato (pNPP)**Tampão dietanolamina pH 8,6**

Dietanolamina	97mL
NaN ₃	0,2g
MgCl ₂ +6H ₂ O	100mg
HCl	20mL
Água MilliQ	1000mL
18,2MΩcm	

Atenção: Azida sódica é tóxica por inalação e contato

APÊNDICE 15 – NaOH 3N

NaOH	30g
Água MilliQ 18,2MΩcm	250mL

APÊNDICE 16 – Meio RPMI 1640 (SIGMA)

Meio RPMI	1frasco
NaHCO ₃	2g
Solução de HCl (3N)	50mL
Solução antib. antim. p/ cultivo celular	10mL
Sulfato de gentamicina (10mg)	1 ampola
Soro fetal bovino testado p/ hibridomas	100mL
Água MilliQ 18MΩcm	1000mL

APÊNDICE 17 – Azul de Tripan 0,3%

Azul de tripan	0,3g
Água MilliQ	100mL
18,2MΩcm	

APÊNDICE 18 – Polietilenoglicol (PEG)

PEG (PM: 1300-1600) autoclavado	5g
PBS autoclavado	10mL

APÊNDICE 19 – Meio HAT

Meio RPMI	450mL
HAT meio suplemento 5x	1 frasco
Soro fetal bovino testado p/ hibridomas	50mL
Solução antib. antim. p/ cultivo celular	5mL
Sulfato de gentamicina	1ampola

APÊNDICE 20 – Meio HT

Meio RPMI	450mL
HT meio suplemento 5x	1 frasco
Soro fetal bovino testado p/ hibridomas	50mL
Solução antib. antim. p/ cultivo celular	5mL
Sulfato de gentamicina	1ampola

APÊNDICE 21 – Meio de congelamento

DMSO (dimetil sulfóxido)	1mL
Soro Fetal bovino testado p/ hibridomas	9mL

APÊNDICE 22 – Solução estoque de antibiótico

Penicilina G potássica	1 frasco
1.000.000 UI	
Sulfato de Estreptomicina	1g
Sulfato de gentamicina	10mg
Água MilliQ 18MΩcm autoclavada	10mL

APÊNDICE 23 – Tampão 1,5M Tris HCl pH 8,8

Tris base (PM: 121,1)	15,15219g
Tris HCl	3,92739g
Água MilliQ 18MΩcm	100mL

APÊNDICE 24 – Tampão 0,5M Tris HCl pH 6,8

Tris base (PM: 121,1)	0,28952g
Tris HCl	0,50333g
Água Mill iQ 18MΩcm	100mL

APÊNDICE 25 – SDS 10%

SDS	1g
Água MilliQ 18MΩcm	10mL

APÊNDICE 26 – Tampão de amostra 2x PROMEGA

Azul de bromofenol	100µg
0,5M Tris HCl 6,8 (apêndice 24)	5mL
SDS 10% (apêndice 25)	2mL
Água MilliQ 18MΩcm	3mL

APÊNDICE 27 – APS 10%

APS	100mg
Água MilliQ 18MΩcm	1mL

APÊNDICE 28 – Solução estoque de acrilamida 40%**Atenção: Acrilamida é neurotóxica por inalação e contato**

Acrilamida	40g
Bis-acrilamida	1,1g
Água MilliQ 18MΩcm	100mL

APÊNDICE 29 – Tampão do Gel de corrida 4x

1,5 Tris HCl 8,8 (apêndice 27)	100mL
SDS	0,4g

APÊNDICE 30 – Tampão do Gel de aplicação 4x PROMEGA

0,5 Tris HCl 6,8 (apêndice 26)	100mL
SDS	1,4g

APÊNDICE 31 – Gel de aplicação 4%

Água MilliQ 18,2MΩcm	6,4mL
Solução estoque de acrilamida 40%	1,0mL
Tampão do gel de aplicação 4x	2,5mL
APS 10%	100μL
TEMED (N,N,N',N'-tetrametil etilenodiamino)	10μL

APÊNDICE 32 – Gel de corrida 10%

Água MilliQ 18,2MΩcm	4,9mL
Solução estoque de acrilamida 40%	2,5mL
Tampão do gel de aplicação 4x	2,5mL
APS 10%	100μL
TEMED (N,N,N',N'-tetrametil etilenodiamino)	10μL

APÊNDICE 33 – Tampão de transferência

Tris base (PM: 121,1)	5,82g
SDS 10%	3,75mL
Glicina SDS 10%	2,93g
Metanol	200mL
Água MilliQ 18MΩcm	800mL

APÊNDICE 34 – Tampão de lavagem

Tris base PM 121,1g	6,055g
NaCl	8,766g
Tween 20	0,5mL
Água MilliQ 18,2MΩcm	1000mL

APÊNDICE 35 – Tampão de Bloqueio

Albumina sérica bovina	5g
Tris base	0,6g
NaCl	0,9g
Água MilliQ	100mL

APÊNDICE 36 – Solução fixadora

Metanol	100mL
Ácido acético	50mL
Água MilliQ 18,2MΩcm	1000mL

APÊNDICE 37 – Solução corante para proteínas (Coomassie)

Brilhante Blue R-250	1g
Água MilliQ 18,2MΩcm	100mL

APÊNDICE 38 – Solução descorante

Ácido acético	70mL
Água MilliQ 18,2MΩcm	1000mL

APÊNDICE 39 – Tampão de corrida 5x

Tris base (PM: 121,1)	15,0g
Glicina	72,0g
SDS	5,0g
Água MilliQ 18MΩcm	1000mL

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBAS A. K.; LICHTMAN, A. H.; POBER, J. S. *Imunologia Celular e Molecular*. 2 ed. Rio de Janeiro: RevinteR, 1998, 469 p.
- BHATTACHARJEE; NAYLOR, C. J. ; JONES, R. J. A simple method for immunofluorescence staining of tracheal organ cultures for the rapid identification of infectious bronchitis virus. *Avian Pathology*, v. 23, 1994, p. 471-480.
- BLANN, A. B. Cell hybrids an important source of antibody production. *Med. Lab. Sci.* v. 36, 1979, p. 329.
- BOURSNELL, M. E. G.; BROWN, T. D. K.; BINNS, M. M. Sequence of the membrane protein gene from avian coronavirus IBV. *Virus Research*, 1, 1984, p. 303-313.
- CAMPBELL, A. M. *Monoclonal antibody and immunosensor technology*. Amsterdam: Elsevier, 1991. 427p.
- CAMPBELL, A. M. In: BURDON, R. H.; KNIPPENBERG, P. H. *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology - Monoclonal Antibody Technology*. v. 13 New York Elsevier Sci., Oxford, 1984.p.265.
- CAVANAGH, D.; NAQI, S. A. Infectious Bronchitis. In: CALNEK, B. W.; BARNES, H. J. ; BEARD, C. W. et. al. *Diseases of Poultry*. 10th ed. Iowa, USA: Poultry Iowa State University Press, 1997. p. 510-527.
- CAVANAGH, D.; DAVIS P. J. Coronavirus IBV: relationships among recent European isolates by limited proteolysis of virion glycopolipeptides. *Avian Pathology*, v. 16, n. 1, 1987, p. 1-13.
- CAVANAGH, D. DAVIS, P.J. COOK, J. K. A. et al. Location of the amino acid differences in the S₁ spike glycoprotein subunit of closely related serotypes of infectious virus. *Avian Pathology*, v. 21, n. 1, 1992, p. 33-43.
- CAVANAGH, D. et al. Induction of humoral neutralising and haemagglutination-inhibiting antibody by the spike protein of avian infectious bronchitis virus. *Avian pathology*, v.13, 1984, p. 573-583.
- CAVANAGH, D. Coronavirus IBV: Further evidence that the surface projections are associated with two glycopolypeptides. *Journal General of Virology*, v.64, 1983, p. 1787-1791.
- CHUBB, R. C.; CUMMING, R. B. The use of gel diffusion precipitin technique with avian infectious bronchitis nephritis virus. *Australian Veterinary Journal.*, v. 47, 1971, p. 496-499.
- COOK, J. K. A. Diagnóstico de la Bronquitis Infecciosa In: XVI CONGRESSO LATINOAMERICANO DE AVICULTURA 1999, *Anais...Peru*, 1999, p. 25-27.
- COOK, J. K. A. Bronquite Infecciosa Aviária: Situação mundial e distribuição de sorotipos. In: SIMPÓSIO SOBRE SANIDADE AVÍCOLA, 1997, SÃO PAULO. *Anais... São Paulo: Facta*, 1997. p. 13-27.
- COOK, J. K. A.; ; BROWN, A. J. ; BRACEWELL, C. D. Comparison of the haemagglutination inhibition test and the serum neutralisation test in tracheal organ cultures for typing infectious bronchitis virus strains. *Avian Pathology*, v. 16, 1987, p. 505-511.
- COOK, J. K. A.; SMITH, H. W.; HUGGINS, M. B. Infectious bronchitis immunity: Its study in chickens experimentally infected with mixtures of infectious bronchitis virus and *E. coli*. *Journal of Genèral Virology*, v. 67, 1886, p. 1427-1434.
- COOK, J. K. A.; HUGGINS, M. B. Newly isolated serotypes of infectious bronchitis virus: Their role in disease. *Avian Pathology*, v.15, 1986, p. 129-138.
- DARBYSHIRE, J. H. COOK, J. K. A.; PETERS, R. W. Comparative growth kinetic studies on avian infectious bronchitis virus in different systems. *Journal of Comparative Pathology*, v.85, 1975, p. 623-630.
- FÁBIO, J. Bronquite infecciosa das galinhas: aspectos clínicos e controle da BIG no Brasil. In: CONFERÊNCIA APINCO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLAS. 1993 *Anais...Campinas: Facta*, 1993, p. 1-6.

- EL-HOUADFI, M. D.; JONES, R. C.; COOK, J. K. A. *et al.* The isolation and characterization of six avian infectious bronchitis viruses isolated in Morocco. *Avian Pathology*, v. 15, 1986, p. 93-105.
- ENDO-MUNOZ, L. B.; FARAGHER, J. T. A fluorescence test in allantoic cells for the detection of infectious bronchitis virus. *Australian Veterinary Journal*, v. 66, 1989, p.10.
- 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.
- GODIN, J. W. Antibody production by hybridomas. *Journal Immunology Methods*, v. 36, 1980, p. 285-308.
- GOUGH, R. E.; ALEXANDER, D. J.; COLLINS, M. S. *et al.* Routine virus isolation or detection in the diagnosis of diseases in birds. *Avian Pathology*, v.17, 1988, p. 893-906.
- HARLOW, E. LANE, D. *Antibodies, A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, New York, USA, 1988, 726 p.
- HIPÓLITO, O.; BOTTINO, J. A.; PINTO, A. A. Estudo de duas amostras de vírus isoladas de casos da síndrome nefrite-nefrose das galinhas no Brasil. *Ciência e Cultura*, v.25, 1973, p. 569.
- HIPÓLITO, O. Isolamento e identificação do vírus da bronquite infecciosa das galinhas no Brasil. *Arquivos da Escola Superior de Veterinária (Minas Gerais)*, v. 10, 1957, p.131-163.
- HOPKINS, S. R.; YODER, Jr. H. W. Reversion to virulence of chicken passaged infectious bronchitis vaccine virus. *Avian Disease*, v. 30, 1986, p. 221-223.
- HUDSON, L.; HAY, F. C. *Practical Immunology*, 3 ed. Oxford, 1989, p. 507.
- INGNJATOVIC, J.; GALLI, L. The S₁ glycoprotein of avian infectious bronchitis virus induces protection in vaccinated chickens. *Archives of Virology*, n. 138, 1994, p.117-134.
- 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 Diseases*, v. 36, n. 1-2, 1992, p. 403-409.
- JONSSON, L.C.O.; ENGSTROM, B. E. Immunohistochemical detection of infectious bursal disease and infectious bronchitis virus antigens in fixed paraffin embedded chicken tissues. *Avian Pathology* v.15, 1986, p. 385-393.
- JUNGHERR E. L.; CHOMIAK, T. W. LUGINBUHL, R. E. Immunologic differences in strain of infectious bronchitis virus. *Proceedings of the 60th Annual Meeting of the United States Livestock Sanitary Association*, Chicago, Illinois, 1956, p.203-209.
- KARACA, K. ; NAQI, S. GELB, J. Production and characterization of monoclonal antibodies to three infectious bronchitis virus serotypes. *Avian Diseases*, v. 36, 1992, p. 903-915.
- KINDE, H. DAFT, B. M.; CASTRO, A. E. *et al.* Viral pathogenesis of anephrotropic infectious bronchitis virus isolated from commercial pullets. *Avian Diseases*, v.35, 1991, p. 415-421.
- KOCH, G.; HARTOG, L.; KANT, A. *et al.* Antigenic differentiation of avian infectious bronchitis virus variant strains employing monoclonal antibodies. *Isr. J. Vet. Med.*, v.42, n.2, 1986, p. 89-97.
- KÖHLER, G.; MILSTEIN, C. Continuous culture of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*, v. 256, 1975, p. 495-497.
- LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T 4. *Nature*, v. 227, 1970, p. 680-686.
- LAI, M. M. M.; CAVANAGH, D. The molecular biology of coronaviruses. *Advances in Virus Research*, v. 48, 1997, p. 1-100.
- LIDDELL, J. E.; CRYER, A. *A practical guide to monoclonal antibodies*. Ontario: John Wiley & Sons. 1991. 188p.

- LOHR, J. E. Diagnosis of infectious bronchitis (IB) by examination of tracheal mucus for IB-precipitating antigens. *Avian Diseases*, 25, 1981, p. 1058-1064.
- MARQUARDT, W. W.; SNYDER, D. B.; SCHLOTTHOBER, B. A. Detection and quantification of antibodies to infectious bronchitis virus enzyme-linked immunosorbent assay. *Avian Diseases*, v.25, 1981, p. 713-722.
- MARUSICH, M. F. Efficient hybridoma production using previously frozen splenocytes. *Elsevier Science Publishers* 1988, p. 155-159.
- MOCKETT, A. P. A.; COOK, J. K. A. The detection of specific IgM to infectious bronchitis virus in chickens serum using an ELISA. *Avian Pathology*, v. 15, n. 3, 1986, p. 437-446.
- MOCKETT, A. P. A.; CAVANAGH, D.; BRAUN, T. D. K. Monoclonal antibodies to spike and membrane proteins of avian infectious bronchitis coronavirus strain Massachusetts M41 *Journal of General Virology*, v. 1984, p. 2281-2286.
- MOCKETT, A. P. A.; DARBYSHIRE, J. H. Comparative studies with an enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) for antibodies to infectious bronchitis virus. *Avian Pathology*, v. 10, 1981, p. 1-10.
- MONREAL, G.; BAUER, H. J.; WIEGMANN, J. Comparison of the enzyme linked immunosorbent assay (ELISA), haemagglutination inhibition test and agar gel precipitation test for detection of antibodies to avian infectious bronchitis virus. *Avian Pathology*, v. 14, 1985, p. 421-434.
- NAQI, S. A. A monoclonal antibody-based immunoperoxidase procedure for rapid detection of infectious bronchitis virus in infected tissues. *Avian Diseases*, 34, 1990, p. 893-898.
- NAQI, S. A.; KARACA, K.; BAUMAN, B. A monoclonal antibody based antigen capture enzyme linked immunosorbent assay for identification of infectious bronchitis virus serotypes. *Avian Pathology*, v.22, n.3, 1993, p. 555-564.
- OWEN, R. L.; COWEN, B. S. HATTEL, A. L. *et al.* Detection of viral antigen following exposure of one-day-old chickens to the Holland-52 strain of IBV. *Avian Pathology*, v. 20, 1991, p. 663-673.
- PROMEGA **Protocols and applications guide**. Ed. Promega Corporation, 3^{ed.}, 279-304. (cat#p1610), 1996.
- RAJ, G. D.; JONES, R. C. Infectious bronchitis virus: immunopathogenesis of infection in the chicken. *Avian Pathology*, n. 26, 1997, p. 677-706.
- SALLE, C. T. P.; SILVA, A. B.; MORAES, H. L. S.; BRAGA, A. C. Bronquite infecciosa: diagnóstico, prevenção e amostras variantes. *Boletim do Instituto de Pesquisas Veterinárias "Desidério Finamor"* v. 10, 1988, p. 87-97.
- SCHALK, A. F.; HAWN, M. C. An apparently new respiratory disease of baby chicks. *J. American Veterinary Medicine Association*, v. 78, 1931, p. 413-422.
- SCHMIDT, V. Bronquite infecciosa das galinhas In: Beer, J. *Doenças infecciosas em animais domésticos*. São Paulo: Roca LTDA. 1988. v. 1 p. 233-236.
- SOULA, A.; MONREAU, Y. Antigen requirements and specificity of microplate enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for detecting infectious bronchitis viral antibodies in chicken serum. *Archives of Virology*, v.67, 1981, p. 283-295.
- 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)
- WENTZ, I. Bronquite Infecciosa: que cepa vacinal usar? In: CONFERÊNCIA APINCO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVIÁRIAS, 1992, Santos. *Anais...* Santos: Facta, 1992, p. 165-167.
- WINTERFIELD, R. W.; HITCHNER, V. M. D. Etiology of infectious nephritis-nephrosis syndrome of chickens. *American J. Vet. Res.* V. 23, 1962, p. 1273-1279.

YAGYU, K.; OHTA, S. Detection of infectious bronchitis virus antigen from experimentally infected chicken by immunofluorescent assay with monoclonal antibody. *Avian Diseases*, v. 34, 1990, p. 246-252.

YOSHIDA, N.; NUSSENVWEIG, R. S.; POTOENJAK, P.; *et al.* Hybridoma produces protective antibodies directed against the sporozoite stage of malaria parasite. *Science*, v.207, 1980, p.71-73.

ESCOLA DE VETERINARIA
BIBLIOTECA

1980