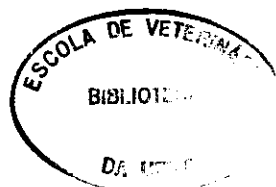


MARCELO TAFURI PANIAGO

ATIVIDADE HEMAGLUTINANTE DE AMOSTRAS
DO VÍRUS DA BRONQUITE INFECCIOSA
DAS GALINHAS ISOLADAS NO ESTADO
DE MINAS GERAIS



Dissertação apresentada
ao Departamento de
Medicina Veterinária
Preventiva da Escola de
Veterinária da
Universidade Federal de
Minas Gerais, como
requisito parcial para
obtenção de grau de
Mestre em Medicina
Veterinária, área de
concentração em Medicina
Veterinária Preventiva.

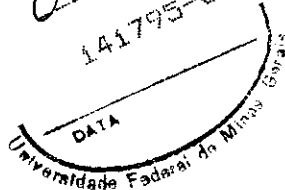
Orientador: Prof. José
Sérgio de Resende

Belo Horizonte
Minas Gerais
1994

BIBLIOTECA UNIVERSITARIA

07/02/95

141795-09



P192a Paniago, Marcelo Tafuri, 1964-

Atividade hemaglutinante de amostras do vírus da bronquite infecciosa das galinhas isoladas no Estado de Minas Gerais/Marcelo Tafuri Paniago. - Belo Horizonte: UFMG - Escola de Veterinária, 1994.

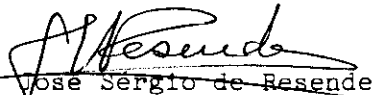
44 p. : il.

Dissertação (Mestrado)

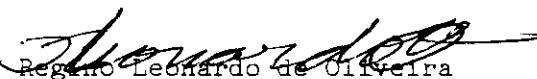
1- Galinha - Doenças - Teses. 2. - Bronquite infecciosa de galinha - Teses. I. Título.

CDD.636.508 969 2

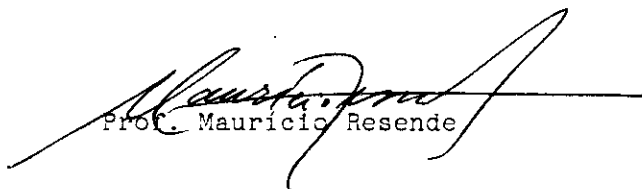
Dissertação defendida e aprovada em 30/03/94 pela
Comissão Examinadora constituída por:



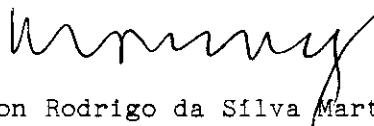
Prof. José Sérgio de Resende
Orientador



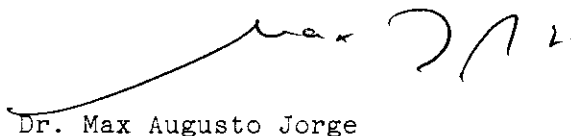
Prof. Regino Leonardo de Oliveira



Prof. Maurício Resende



Prof. Nelson Rodrigo da Silva Martins



Dr. Max Augusto Jorge

A Duarte e Neném Tafuri, seres de luz, exemplos de vida,

A meus pais, pelo amor e constante apoio,

A Bel, por tudo.



AGRADECIMENTOS

Ao Prof. José Sérgio de Resende pela orientação, ensinamentos, amizade e constante incentivo.

Ao Prof. Regino Leonardo de Oliveira pela atenção, apoio e constante estímulo.

Ao Dr. Max Augusto Jorge pelas discussões, críticas e sugestões.

Ao Prof. Nelson Rodrigo da Silva Martins pelo incentivo e sugestões apresentadas.

Ao Prof. Maurício Resende, pelas críticas e sugestões.

Aos funcionários do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, em especial a Ismael Faustino de Souza e Cláudio Rocha Públio, pela inestimável ajuda.

Às pessoas responsáveis pelo Biotério do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, que gentilmente nos doaram os camundongos Balb-C utilizados neste experimento.

Ao CNPq pela concessão de Bolsa de Mestrado no período de março de 1991 a agosto de 1993.

Aos tios Miguel e Vera e primos Verinha e Miguelzinho por dividirem comigo momentos inesquecíveis e por estarem sempre presentes nas horas mais difíceis.

Aos amigos Carlos Eduardo do Prado Saad, Teresinha Inês Assumpção e Raquel Vitarelli pela constante ajuda nos momentos de trabalho e pela ótima companhia nas horas de lazer.

Aos amigos da pós-graduação, Alejandro, Anna Paula, Edna, Ênio, Geraldo, Hélio, Márcia, Maria do Carmo, Mariana, Raquel e Rubens pelo convívio, amizade e ajuda.

A todas as pessoas com as quais convivi nestes anos e que, direta ou indiretamente, contribuíram para o sucesso deste trabalho.

Agradecimento, pelo suporte financeiro:

FINEP - Financiadora de Estudos e Projetos.

CNPq - Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico.

FAPEMIG - Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais.

FEP-MVZ - Fundação de Estudo e Pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecnia.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS.....	8
LISTA DE FIGURAS.....	9
LISTA DE ABREVIATURAS.....	10
RESUMO.....	11
1. INTRODUÇÃO.....	13
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	15
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	19
3.1. AMOSTRAS DE VBIG ESTUDADAS.....	19
3.2. REAVALIAÇÃO DAS AMOSTRAS DE VBIG.....	19
3.2.1. COMPORTAMENTO EM OVOS EMBRIONADOS DE GALINHAS SPF (OEG/SPF).....	21
3.2.2. AUSÊNCIA DE ATIVIDADE HEMAGLUTINANTE DIRETA.....	22
3.3. PRODUÇÃO DOS ANTÍGENOS HEMAGLUTINANTES.....	22
3.4. PRODUÇÃO DOS LÍQUIDOS ASCÍTICOS IMUNES EM CAMUNDONGOS BALB-C.....	24
3.5. PURIFICAÇÃO DA FRAÇÃO GAMAGLOBULINA DOS LÍQUIDOS ASCÍTICOS IMUNES ESPECÍFICOS.....	25
3.6. PROCEDIMENTOS DO TESTE DE INIBIÇÃO DA HEMAGLUTINAÇÃO (IH).....	26
3.6.1. PREPARO DA SUSPENSÃO DE ERITRÓCITOS.....	26
3.6.2. TITULAÇÃO DOS ANTÍGENOS.....	26
3.6.3. TITULAÇÃO DO LÍQUIDO ASCÍTICO IMUNE INDIVIDUAL.....	28
3.6.4. TITULAÇÃO DAS FRAÇÕES DE GAMAGLOBULINAS PURIFICADAS.....	28
4. RESULTADOS.....	30
4.1. TÍTULOS HEMAGLUTINANTES DOS ANTÍGENOS UTILIZADOS.....	30
4.2. TÍTULOS INIBIDORES DA HEMAGLUTINAÇÃO (IH) DOS LÍQUIDOS ASCÍTICOS IMUNES INDIVIDUAIS.....	30
4.3. TÍTULOS INIBIDORES DA HEMAGLUTINAÇÃO (IH) DAS FRAÇÕES CONTENDO GAMAGLOBULINAS OBTIDAS A PARTIR DA MISTURA DOS LÍQUIDOS ASCÍTICOS IMUNES DOS CAMUNDONGOS IMUNIZADOS COM A MESMA AMOSTRA DE VBIG.....	32
5. DISCUSSÃO.....	33
6. CONCLUSÃO.....	37
7. SUMMARY.....	38
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	39

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - AMOSTRAS DO VÍRUS DA BRONQUITE
INFECCIOSA DAS GALINHAS ISOLADAS DE
SURTOS CLÍNICOS DA DOENÇA NO ESTADO DE
MINAS GERAIS.....20

TABELA 2 - AMOSTRAS DE REFERÊNCIA IMPORTADAS
DO VÍRUS DA BRONQUITE INFECCIOSA
DAS GALINHAS.....21

TABELA 3 - TÍTULOS HEMAGLUTINANTES DOS ANTÍGENOS
CONTENDO AMOSTRAS DE VÍRUS DA BRONQUITE
INFECCIOSA DAS GALINHAS DE REFERÊNCIA OU
ISOLADAS DE SURTOS CLÍNICOS DA DOENÇA NO
ESTADO DE MINAS GERAIS - BRASIL.....31

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - DISTRIBUIÇÃO DE ANTÍGENOS NA PLACA
PARA TESTE DE HEMAGLUTINAÇÃO.....27

FIGURA 2 - DISTRIBUIÇÃO DOS LÍQUIDOS ASCÍTICOS
IMUNES NA PLACA PARA TESTE DE IH.....29



LISTA DE ABREVIATURAS

ATCC	American Type Culture Collection
BIG	Bronquite Infecciosa das Galinhas
HA	Hemaglutinação
IH	Inibição da Hemaglutinação
OEG	Ovos Embrionados de Galinhas
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
PEG	Polietilenoglicol
PLC	Fosfolipase
PVP	Polivinilpirrolidone
rpm	rotações por minuto
SPF	Specific Pathogen Free
UHA	Unidade Hemaglutinante
VBIG	Vírus da Bronquite Infecciosa das Galinhas



RESUMO

Quatorze amostras do vírus da bronquite infecciosa das galinhas isoladas de surtos clínicos da doença no Estado de Minas Gerais - Brasil foram replicadas em ovos embrionados de galinhas livres de patógenos específicos. O líquido alantóideo obtido foi concentrado contra polietilenoglicol, peso molecular 20.000 e tratado com a enzima fosfolipase C tipo 1. Das quatorze amostras estudadas, treze apresentaram atividade hemaglutinante.

O desenvolvimento de atividade hemaglutinante em 13 das 14 amostras examinadas, apesar de não ser revelador do aspecto antigênico das amostras isoladas em Minas Gerais, pode servir como indicador da semelhança destes isolados com a grande maioria daqueles descritos na literatura internacional, distinguindo-se apenas uma amostra, à semelhança das amostras nefrotrópicas descritas na Austrália e E.U.A., de difícil preparação para hemaglutinação.

Tentou-se classificar as amostras pela atividade de inibição de hemaglutinação utilizando líquidos ascíticos de camundongos imunes específicos contra as amostras em teste e contra amostras de referência. Os líquidos ascíticos imunes individuais não apresentaram atividade inibidora da hemaglutinação, nem mesmo após purificação da fração gamaglobulina. Portanto, não foi possível agrupar as amostras segundo suas eventuais relações antigênicas.

PALAVRAS-CHAVE: VÍRUS DA BRONQUITE INFECCIOSA DAS
GALINHAS;
HEMAGLUTINAÇÃO;
POLIETILENOGLICOL PM 20.000;
FOSFOLIPASE C TIPO 1.

1. INTRODUÇÃO

A Bronquite Infecciosa das Galinhas (BIG) é uma doença respiratória aguda, altamente contagiosa, provocada por um vírus da família Coronaviridae. Clinicamente, a doença caracteriza-se por estertores traqueais, tosse e espirros (HOFSTAD, 1978; KING & CAVANAGH, 1991). As principais perdas econômicas relacionadas à enfermidade são provocadas pela mortalidade, redução no crescimento, aumento de condenações de carcaças e pelos danos causados no oviduto de aves, adultas ou não, que se traduzem em diminuição na produção e na qualidade interna dos ovos (HOFSTAD, 1978; JORDAN, 1990; PEREZ, 1989).

Apesar da BIG ter sido descrita há aproximadamente seis décadas, ela continua sendo uma das enfermidades de grande impacto econômico para a indústria avícola mundial (TORO *et al.*, 1989). Calcula-se que, durante um surto, as perdas em um plantel podem atingir um dólar americano por ave durante 9 semanas, considerando-se que a BIG predispõe o lote a outras patologias (PEREZ, 1989).

Um dos aspectos que dificultam o controle da doença é a existência de numerosos sorotipos do vírus, podendo ocorrer infecção com amostras heterólogas ao vírus vacinal (PERROTA *et al.*, 1988). Para se estabelecer o controle eficiente da doença, é necessário elaborar-se um estudo epidemiológico, visando a verificação da prevalência dos sorotipos por região e a escolha do sorotipo vacinal deve ser baseada neste estudo. No Brasil, esta situação tem alguns agravantes. O pouco conhecimento sobre as amostras de VBIG prevalentes no país (BRANDEN, 1985; LAMAS DA SILVA, 1989) é fator decisivo para a elaboração de programas de vacinação mais eficazes.

Os episódios de BIG em plantéis vacinados com o sorotipo oficialmente reconhecido no Brasil (Massachusetts) podem estar sugerindo que há diferença significativa entre os nossos isolados de VBIG e o sorotipo Massachusetts. Entretanto, a disponibilidade de vacinas apenas do sorotipo Massachusetts poderia até facilitar o diagnóstico e, do diagnóstico, vai-se ao controle. Não seria problema se o Ministério da Agricultura tivesse liberado o uso de vacinas vivas dos diversos sorotipos existentes? Seguramente, haveria mais vírus para recombinar em nosso país, além de tornar mais difícil o diagnóstico epidemiológico relativo à sorotipagem dos VBIG autóctones.

O primeiro passo para melhorar esta situação é determinar quais sorotipos estão presentes no país e, em seguida, traçar sua distribuição epidemiológica.

Segundo DI FABIO (1993), as amostras de VBIG podem ser classificadas por meio de diferentes técnicas sorológicas como vírus neutralização em ovos embrionados de galinha (OEG) ou em cultura de células, cultura de anéis de traquéia, anticorpos monoclonais, inibição da hemaglutinação e por biologia molecular [Reação da Polimerase em Cadeia (PCR) e Western Blotting].

A determinação de um sistema de classificação de amostras de VBIG simples, confiável e de baixo custo seria uma boa solução para as condições brasileiras. Este trabalho objetivou estudar amostras do VBIG isoladas no Brasil utilizando antígeno hemaglutinante concentrado com polietilenoglicol, peso molecular 20.000 e anticorpos inibidores da hemaglutinação produzidos em camundongos.



2. REVISÃO DE LITERATURA

O fenômeno da hemaglutinação (HA) foi observado pela primeira vez por Hirst em 1941 quando estudava o vírus da influenza. Desde então, esta capacidade de aglutinar eritrócitos tem sido observada em diversos microrganismos (CASALS, 1967).

Os agentes hemaglutinantes (vírus, bactérias ou antígenos derivados destes) são necessariamente multivalentes. Ao atuarem no processo, adsorvem o eritrócito por meio de sítios localizados na superfície celular. Isto resulta na interligação das hemácias por mediação do aglutinógeno a elas adsorvido, sendo que o mosaico tridimensional resultante toma dimensões visíveis a olho nu como aglutinação. Esta ação pode ser inibida por anticorpos específicos contra os antígenos aglutinógenos, o que resultou no desenvolvimento da prova de inibição da hemaglutinação (IH). Esta reação pode ser facilmente executada, daí a larga utilização das provas de HA e IH na identificação de isolamentos virais e titulação de anticorpos (CASALS, 1967).

O princípio do teste de IH é bastante simples. Dadas certas condições, se uma hemaglutinina é colocada em contato com seu anticorpo homólogo em proporções adequadas e em seguida uma suspensão de eritrócitos é adicionada, a hemaglutinação não ocorre. Esta propriedade pode ser utilizada para se testar o título de anticorpos pela mensuração da quantidade mínima de soro capaz de inibir completamente a hemaglutinação de um determinado volume de suspensão de eritrócitos por uma quantidade constante de hemaglutinina (KABAT & MAYER, 1967).

A família Coronaviridae, da qual o VBIg é protótipo, possui um único gênero, coronavírus, que compreende agentes que infectam diferentes espécies animais, entre elas as galinhas, provocando, entre outros problemas, a BIG. Nesta família, somente o vírus hemaglutinante da Encefalomielite do Suíno e dois sorotipos humanos, denominados OC38 e OC43, possuem atividade hemaglutinante natural (McINTOSH, 1974). O VBIg, usualmente, não apresenta esta capacidade, sendo raras as amostras com hemaglutinação espontânea (KING & CAVANAGH, 1991).

Alguns estudos foram feitos na tentativa de induzir a atividade hemaglutinante no VBIg e com isso estabelecer um teste para diagnóstico e monitoramento sorológico da doença. Esta propriedade pode ser induzida por modificações na superfície do eritrócito ou por tratamento enzimático do vírus. CORBO e CUNNINGHAM (1959) relataram que o vírus aglutinava eritrócitos de galinhas após receber pré-tratamento com tripsina. Em 1960, CUNNINGHAM sugeriu a utilização do teste de hemaglutinação utilizando vírus com baixo número de passagens tratado com solução de tripsina e albumina do ovo.

BROWN *et al.* (1962) descreveram atividade hemaglutinante do VBIg frente a eritrócitos de cavalo tratados com ácido tânico e, em 1966, BISWALL *et al.* isolaram a hemaglutinina viral utilizando cromatografia, estudaram sua atividade e sugeriram que ela seria uma lipoproteína com traços de RNA e carboidratos.

Apesar de ter sido descrito que o VBIg também teria a capacidade de aglutinar eritrócitos (CORBO & CUNNINGHAM, 1959), este fenômeno não poderia ser interpretado como sendo a verdadeira hemaglutinação. A hemaglutinação do VBIg originada pelo tratamento com tripsina não era inibida por soro específico. Estas primeiras observações estimularam pesquisas sobre diversas enzimas, entre elas neuraminidase, fosfolipase C tipo 1,

fosfolipase C tipo 3 e fosfolipase D, com a finalidade de modificar a estrutura da superfície do vírus, levando-o a apresentar a atividade hemaglutinante. Em 1975, BINGHAM *et al.* descreveram a hemaglutinação provocada pelo VBIQ quando este vírus recebia pré-tratamento com a enzima fosfolipase C tipo 1 e relataram que esta atividade hemaglutinante podia ser inibida com o soro imune específico (POLI *et al.*, 1982).

A partir de então, o teste de IH vem sendo aprimorado e largamente utilizado na mensuração de anticorpos contra VBIQ (ALEXANDER *et al.*, 1976; MACPHERSON & FEEST, 1978; KING & HOPKINS, 1983; HATCHER *et al.*, 1983; FARAGHER, 1987; BOX *et al.*, 1988; TORO *et al.*, 1989; ABDUL-AZIZ & JAWAD, 1989; SURYANARAYAN, 1991) devido à facilidade de ser executado em grande número de amostras de soro.

A utilização do teste de IH para tipificação de amostras de campo do VBIQ vem sendo estudada por diversos autores (KING & HOPKINS, 1984; LASHGARI & NEWMAN, 1984; BROWN & BRACEWELL, 1985; COOK *et al.*, 1987; KING, 1988; GOUGH *et al.*, 1992). Os resultados têm sido conflitantes. Entre as vantagens do teste apontam-se a rapidez e a simplicidade de sua execução. Qualquer laboratório com um banco de soros de referência específicos para os diversos sorotipos conhecidos poderia fazer a classificação da amostra isolada em, por exemplo, 24 horas após a preparação de seu antígeno hemaglutinante (KING & HOPKINS, 1984). Entretanto, a incapacidade de algumas amostras de VBIQ de apresentar a hemaglutinação, mesmo após tratamento com fosfolipase C tipo 1 (BROWN & BRACEWELL, 1985) e a ocorrência de reações cruzadas entre sorotipos distintos (COOK *et al.*, 1987) têm sido apontadas como obstáculos à utilização mais abrangente deste teste para tipificação de amostras de VBIQ.

Embora seja considerado um ensaio bastante simples e barato, para a concentração do vírus usado na produção do antígeno hemaglutinante, a literatura

tem recomendado a utilização de ultracentrífugas, que possibilitam a formação do pellet viral para subsequente tratamento enzimático. Este é um fator limitante para a adoção desta técnica pelos laboratórios de diagnóstico como rotina na tipificação de amostras de VBIg de campo (WATT & MACPHERSON, 1980). ABDUL-AZIZ & JAWAD (1989) utilizaram a diálise contra polietilenoglicol, peso molecular 20.000 (PEG 20.000) para concentrar o VBIg e produzir antígeno hemaglutinante e compararam este antígeno ao produzido por ultracentrifugação, não sendo observadas diferenças entre as atividades hemaglutinantes dos dois antígenos. SURYANARAYAN (1991) utilizou antígeno hemaglutinante produzido a partir de amostras de campo concentradas com polietilenoglicol, peso molecular 6.000 e observou que os resultados da hemaglutinação foram confiáveis.



3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. AMOSTRAS DE VBIG ESTUDADAS

Foram estudadas quatorze amostras do VBIG isoladas de surtos com doença clínica na avicultura industrial do Estado de Minas Gerais - Brasil (TABELA 1). A amostra 208-10-BIG foi gentilmente cedida pelo Prof. Maurício Resende, Laboratório de Virologia Comparada do Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG. As outras treze amostras foram isoladas e caracterizadas no Laboratório de Doenças das Aves do Departamento e Medicina Veterinária Preventiva da Escola de Veterinária da UFMG. As amostras de referência empregadas neste estudo estão listadas na TABELA 2.

As amostras do VBIG em estudo foram estocadas em botijões¹ com nitrogênio líquido (-196°C), em alíquotas, no Laboratório de Doenças das Aves da Escola de Veterinária da UFMG.

3.2. REAVALIAÇÃO DAS AMOSTRAS DE VBIG

As amostras de VBIG utilizadas neste estudo foram reavaliadas de acordo com os seguintes critérios:

¹Botijões criogênicos Cryometal mod. SM-33 / criotubo Nunc - 2 ml cada.

TABELA 1 - AMOSTRAS DO VÍRUS DA BRONQUITE INFECCIOSA DAS GALINHAS ISOLADAS DE SURTOS CLÍNICOS DA DOENÇA NO ESTADO DE MINAS GERAIS

Número de identificação da amostra	Número de passagens em OEG/SPF (a)	Ano de isolamento	Tipo de aves	Sintomas principais no surto de origem
208-10-BIG (b)	6	1972	Poedeira	Respiratório/ Queda de postura/ Postura de ovos anormais
TII (c)	6	1975	Frango de corte	Respiratório
G (c)	8	1975	Frango de corte	Respiratório
29-78 (c)	6	1978	Frango de corte	Respiratório
200 (c)	3	1981	Frango de corte	Respiratório
283 (c)	2	1983	Frango de corte	Síndrome Nefrite- Nefrose
290 (c)	2	1983	Frango de corte	Respiratório
297 (c)	2	1983	Frango de corte	Respiratório
327 (c)	2	1983	Frango de corte	Síndrome Nefrite- Nefrose
351 (c)	3	1984	Frango de corte	Síndrome Nefrite- Nefrose
PM-1 (c)	3	1987	Frango de corte	Respiratório
PM-2 (c)	2	1987	Frango de corte	Respiratório
PM-3 (c)	2	1989	Frango de corte	Respiratório
PM-4 (c)	2	1989	Frango de corte	Respiratório

(a) OEG/SPF - Ovos embrionados de galinha - SPF = Specific Pathogen Free = Livres de patógenos específicos.

(b) Isolada pelo Professor Mauricio Resende no Laboratório de Virologia Comparada do Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG.

(c) Isolada pelo Setor de Doenças das Aves do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva da Escola de Veterinária da UFMG.

TABELA 2 - AMOSTRAS DE REFERÊNCIA DO VÍRUS DA BRONQUITE INFECCIOSA DAS GALINHAS

Amostra	Sorotipo (a)	Número de passagens em OEG/SPF (b)	Procedência (Laboratório/Pais)
M-41	Massachusetts	8	ATCC (c)/EUA
A-5968	Connecticut	10	ATCC/EUA
JMK	Delaware	15	SPAFAS (d) /EUA
SE-17	Georgia	16	SPAFAS/EUA
ARK-99	Connecticut	7	ATCC/EUA
H-52 (e)	Massachusetts	52	SPAFAS/EUA

(a) Denominação segundo HOPKINS, S. R. Serological comparisons of strains of infectious bronchitis virus using plaque-purified isolants. *Avian Diseases*, 18: 231-239, 1974.

(b) Número de passagens em ovos embrionados de galinha - SPF (Specific Pathogen Free) = isentos de patógenos específicos. O número de passagens corresponde a somatória das feitas no laboratório de origem acrescidas das feitas no Laboratório do Setor de Doenças das Aves - Dep. Med. Vet. Preventiva da Escola de Veterinária da UFMG.

(c) American Type Culture Collection (ATCC), 112301 - Parklawn Drive, Rockville, MD-USA 20852.

(d) SPAFAS, Norwich, CT-USA 06360-1301.

(e) Utilizada apenas na produção de soro e líquido ascítico imunes específicos.

3.2.1. COMPORTAMENTO EM OVOS EMBRIONADOS DE GALINHAS SPF (OEG/SPF)

Cinco OEG/SPF com 9-11 dias de incubação foram inoculados com 0,1 ml de cada uma das amostras de VBIg utilizadas neste estudo (diluição 10^{-3} em PBS pH 7,2). Duzentas e dezesseis horas pós-inoculação, os ovos foram transferidos para geladeira (4°C) onde permaneceram por 16 horas. Os embriões foram, então, examinados para a presença de nanismo, enrolamento, formação de uratos nos mesonefros e hepatite hemorrágica.

3.2.2. AUSÊNCIA DE ATIVIDADE HEMAGLUTINANTE DIRETA

Setenta e duas horas após a inoculação das amostras estudadas em dez OEG/SPF (metodologia idêntica a descrita no sub-item 3.2.1), cinco embriões vivos foram colocados em geladeira durante 16 horas. A ausência de atividade hemaglutinante foi confirmada misturando-se uma gota (0,05 ml) de líquido alantóideo obtido dos ovos com uma gota de suspensão de hemácias (10% em PBS pH 7,2) de galinhas SPF. Líquido alantóideo contendo vírus da Doença de Newcastle - amostra LaSota e líquido alantóideo de OEG/SPF não inoculados foram utilizados como controles positivo e negativo, respectivamente.

3.3. PRODUÇÃO DOS ANTÍGENOS HEMAGLUTINANTES

Os antígenos utilizados neste trabalho foram preparados de acordo com VILLEGAS (1985), havendo alterações apenas na forma de concentração do VBIG e na quantidade de enzima utilizada. Em resumo, os antígenos foram preparados como descrito a seguir:

Individualmente, todas as amostras de VBIG, de referência ou não, foram diluídas a 10^{-3} em PBS pH 7,2 contendo antibióticos² e 0,1 ml desta solução foi inoculado na cavidade alantóidea de 100 OEG/SPF com 9-11 dias de incubação. Os OEG inoculados foram reincubados e, 24 horas depois, foi feita ovoscopia para descarte dos embriões mortos. Novas ovoscopias foram feitas com 48 e 56 horas pós-inoculação. Decorridas 72 horas, foi feita a última ovoscopia, sendo todos os ovos inoculados colocados em geladeira (4°C), onde permaneceram por 16 horas. Para cada amostra de VBIG, cinco OEG/SPF inoculados foram mantidos na incubadora e só foram abertos 216

² Cada ml de PBS pH 7,2 usado na diluição do vírus recebeu 0,05 ml de solução contendo: Penicilina G potássica - 1.000.000 ui + sulfato de estreptomicina - 1 g + sulfato de gentamicina - 20 mg + PBS pH 7,2 - 10 ml / Solução esterilizada por filtração em Swinnex Millipore, 25 mm ϕ , poro 0,22 μ .

horas pós-inoculação para controle da replicação do vírus.

O líquido alantóideo foi colhido e agrupado assepticamente em frasco estéril mantido em banho de gelo, seu volume total foi anotado e, em seguida, submetido à centrifugação³ a 8.000 rpm por 30 minutos sob refrigeração para sua clarificação.

A concentração das amostras foi feita colocando-se o líquido alantóideo clarificado em membranas de diálise⁴ e estas membranas foram, então, colocadas em aparelho dialisador⁵ contendo polietilenoglicol, peso molecular 20.000 (PEG 20.000)⁶, sendo o aparelho mantido a 4°C. Para uso, o PEG 20.000 foi preparado dissolvendo-se 500 g do produto em 1.000 ml de PBS pH 7,2. Neste sistema, o PEG 20.000 desidrata o líquido alantóideo, ficando o VBIg e outras proteínas retidos pela membrana de diálise. O tempo de concentração do líquido alantóideo e conseqüentemente do VBIg variou entre 24 e 48 horas.

O líquido alantóideo concentrado foi então ressuspense em solução tampão HEPES pH 6,5, a 1% do volume inicial. Em seguida foi colocado, sem nenhum conservante biológico, em pequenos frascos de plástico com tampa rosqueável e estocado em nitrogênio líquido (-196°C). O líquido alantóideo concentrado foi também utilizado na imunização de camundongos, como se descreve no sub-item 3.4. As amostras foram descongeladas e misturadas com igual volume de solução recém-preparada de fosfolipase C tipo 1⁷ preparada em tampão HEPES pH 6,5 contendo 10 unidades da enzima por mililitro. A mistura foi homogeneizada e em seguida incubada a 37°C por 2 horas. O antígeno foi tratado com thimerosal⁸

³ Centrifuga refrigerada Dupont mod. RC5B/rotor GSA.

⁴ THOMAS - MW 12.000 - ϕ 45 mm.

⁵ POPE - Multiple dialyser - THOMAS.

⁶ Polyethylene glycol MW 20.000 - SIGMA CHEMICAL CO.

⁷ Phospholipase C P-7633 Lot 10H6801 SIGMA CHEMICAL CO.

⁸ Eli Lilly Co. Ltd. (etil mercuritosalicilato de sódio).

1:10.000 (KING, 1988) e então estocado a 4°C até comprovação de atividade hemaglutinante.

3.4. PRODUÇÃO DOS LÍQUIDOS ASCÍTICOS IMUNES EM CAMUNDONGOS BALB-C

Para a produção de líquido ascítico imune, a concentração total de proteínas presentes em cada um dos líquidos alantóideos concentrados (100 X) contendo VBIG foi determinada com auxílio de um Refratômetro Clínico Manual⁹. Na preparação dos inóculos, tanto para a primeira quanto para a segunda inoculação, esta concentração total de proteínas foi ajustada, por diluição em PBS pH 7,2, para 100 µg/dose.

Para cada amostra de VBIG, quinze fêmeas de camundongo Balb-C com seis semanas de idade foram inoculadas, por via intraperitoneal, com 0,25 ml de uma mistura contendo 0,125 ml de suspensão com 100 µg de proteína + 0,125 ml de adjuvante incompleto de Freund. Trinta dias após a primeira inoculação, os mesmos quinze camundongos receberam uma segunda inoculação de VBIG homólogo, mas sem adjuvante. Dez dias após a reimunização, os animais foram inoculados com 0,25 ml de suspensão de células de tumor de Ehrlich e começaram a desenvolver quadro de ascite. Entre 5 e 10 dias após esta última inoculação, os camundongos foram sacrificados, o líquido ascítico colhido assepticamente e centrifugado a 1.500 rpm por 15 minutos. Os sobrenadantes líquidos foram estocados individualmente a -20°C. Para a produção do controle, os camundongos foram inoculados com líquido alantóideo de OEG/SPF não inoculados com VBIG, concentrado por diálise contra PEG 20.000 e com a concentração de proteína também ajustada para 100 µg/dose.

⁹ SELMCO THOMAS.

Antes do uso, todos os líquidos ascíticos imunes individuais foram descongelados e colocados em banho-maria a 56°C por 30 minutos para inativação de inibidores não específicos da hemaglutinação, tratados com thimerosal 1:10.000 e, em seguida, estocados em geladeira.

3.5. PURIFICAÇÃO DA FRAÇÃO GAMAGLOBULINA DOS LÍQUIDOS ASCÍTICOS IMUNES ESPECÍFICOS

Para purificação da fração gamaglobulina, IgG principalmente, foi feito "pool" com os líquidos ascíticos imunes obtidos de camundongos inoculados com a mesma amostra de VBIg e este "pool" foi submetido a nova centrifugação a 1.500 rpm por 15 minutos para clarificação adicional e misturado a solução saturada de sulfato de amônia (HEBERT, 1974; MCKINNEY & PARKINSON, 1987). Esta mistura foi feita por gotejamento da solução saturada de sulfato de amônia, sendo que a mistura foi mantida em banho de gelo e sob agitação permanente até que a concentração de sulfato de amônia atingisse 45% da solução final.

A mistura contendo sulfato de amônia e gamaglobulinas foi submetida a nova centrifugação a 3.000 rpm por 15 minutos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado reconstituído em PBS pH 7,2 e colocado em membranas de diálise¹⁰.

As diálises foram feitas em PBS pH 7,2 e mantidas a 4°C, sob agitação permanente por 24 horas. Esta operação foi repetida por mais 3 vezes, apenas trocando-se o PBS.

As membranas de diálise foram então transferidas para um recipiente com solução contendo 40% de polivinilpirrolidone, peso molecular 40.000 (PVP 40), preparada em PBS pH 7,2, onde permaneceram por 48 horas em geladeira até que seu conteúdo ficasse

¹⁰ THOMAS - MW 12.000 - ϕ 16 mm.

concentrado. A ressuspensão deste material foi feita em PBS pH 7,2 de modo que ficasse, no mínimo, 50 vezes mais concentrado que o líquido ascítico original.

3.6. PROCEDIMENTOS DO TESTE DE INIBIÇÃO DA HEMAGLUTINAÇÃO (IH)

Este teste foi conduzido de acordo com VILLEGAS (1985).

3.6.1. PREPARO DA SUSPENSÃO DE ERITRÓCITOS

Os eritrócitos foram obtidos de galinhas adultas SPF. A sangria foi feita na veia da asa com seringa estéril de 10 ml contendo 5 ml de solução de Alsever também estéril. O sangue e a solução de Alsever foram gentilmente homogeneizados na própria seringa, sendo em seguida transferidos para tubo de centrífuga. A mistura foi centrifugada a 1.200 rpm por 5 minutos e o sobrenadante descartado. O volume original foi completado com PBS pH 7,2 e nova centrifugação foi feita. Este procedimento foi repetido mais duas vezes. Após a última lavagem, os eritrócitos foram ressuspensos em PBS pH 7,2 de forma a obter concentração de 0,5%.

A suspensão de eritrócitos era preparada 24 horas antes de seu uso e mantida em geladeira.

3.6.2. TITULAÇÃO DOS ANTÍGENOS

A determinação do título hemaglutinante dos antígenos foi feita para avaliar se as amostras apresentavam atividade hemaglutinante após tratamento com fosfolipase C tipo 1 e para preparar o antígeno com 8 unidades hemaglutinantes (UHA) necessário para a execução do teste de IH.

Placas de microtitulação de poliestireno rígido com 96 orifícios com fundo em U¹¹ foram utilizadas. Em todos os orifícios da placa, com exceção dos da primeira coluna, foram colocados 50 µl de PBS pH 7,2. Cada antígeno foi testado em duplicata.


Foram adicionados 50 µl dos antígenos no primeiro e no segundo orifícios de cada linha, homogeneizados a partir do segundo orifício e em seguida passados 50 µl para o terceiro.

Esta operação foi repetida até o penúltimo orifício quando foram descartados 50 µl. O último orifício da placa foi destinado a controle de eritrócitos.

Em seguida foram adicionados 50 µl da suspensão de eritrócitos a 0,5 % em toda a placa que, então, foi homogeneizada em agitador automático¹² por um minuto e deixada em repouso em geladeira por uma hora quando foi feita a sua leitura.

FIGURA 1 - DISTRIBUIÇÃO DE ANTÍGENOS NA PLACA PARA TESTE DE HEMAGLUTINAÇÃO

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Antígeno 1	A												
	B												
Antígeno 2	C												
	D												
Antígeno 3	E												
	F												
Antígeno 4	G												
	H												


 Controle de Eritrócitos

¹¹ DIFCO.

¹² Vertical Vibrator - THOMAS, operado na intensidade de vibração "50".

3.6.3. TITULAÇÃO DO LÍQUIDO ASCÍTICO IMUNE INDIVIDUAL

Para a titulação dos líquidos ascíticos individuais homólogos também foi utilizada placa de microtitulação com fundo em U. Inicialmente, todos os orifícios, com exceção dos da coluna 1, receberam 50 µl de PBS pH 7,2.

Em seguida foram adicionados 50 µl de líquido ascítico imune nos orifícios das colunas 1, 2 e 12 e o processo de diluição deste líquido ascítico foi feito a partir da coluna 2 até a coluna 9, sendo descartados 50 µl após a última diluição.

Cinquenta µl de antígeno homólogo à amostra de VBIG empregada na imunização dos camundongos, contendo 8 UHA, foram adicionados aos orifícios das colunas 1 a 10. A placa foi homogeneizada (idem sub-item 3.6.2) e deixada em repouso (com tampa) durante 20 minutos em geladeira (4°C).

O último passo da execução do teste de IH foi a adição de 50 µl de suspensão de eritrócitos 0,5% em todos os orifícios. A placa foi novamente homogeneizada (idem sub-item 3.6.2) e deixada em repouso (com tampa) por uma hora em geladeira, sendo então feita a leitura.

Como controle positivo de teste IH utilizou-se soro imune produzido em galos SPF imunizados contra amostra H-52. O controle negativo foi feito com líquido ascítico imune produzido por inoculação de líquido alantóideo concentrado sem vírus.

3.6.4. TITULAÇÃO DAS FRAÇÕES DE GAMAGLOBULINAS PURIFICADAS

As frações de gamaglobulinas purificadas foram estudadas com a mesma metodologia descrita no sub-item 3.6.3.

FIGURA 2 - Distribuição dos líquidos ascíticos imunes na placa para teste de IH

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Líquido Ascítico 1	A											
	B											
Líquido Ascítico 2	C											
	D											
Líquido Ascítico 3	E											
	F											
Líquido Ascítico 4	G											
	H											

Controle de Virus ————
Controle de Eritrócitos ————
Controle de Líquido Ascítico ————



4. RESULTADOS

4.1. TÍTULOS HEMAGLUTINANTES DOS ANTÍGENOS UTILIZADOS

Os títulos hemaglutinantes dos antígenos preparados a partir de amostras de VBIG de referência e das amostras isoladas de campo estão expressos na TABELA 3.

A partir destes resultados, foram preparados os antígenos com 8 UHA para serem utilizados no teste de IH, sendo que as amostras H-52, G e 351 foram utilizadas puras e não foi utilizado antígeno com amostra TII por esta não apresentar reação de hemaglutinação detectável. Todos os antígenos hemaglutinantes foram tratados com thimerosal 1:10.000 (KING, 1988) e estocados em geladeira até sua utilização.

4.2. TÍTULOS INIBIDORES DA HEMAGLUTINAÇÃO (IH) DOS LÍQUIDOS ASCÍTICOS IMUNES INDIVIDUAIS

Nenhum dos líquidos ascíticos imunes apresentou atividade de inibição da hemaglutinação frente aos antígenos homólogos, com exceção daqueles preparados contra a amostra 208-10-BIG que variaram entre 8 e 32. Controles positivos e negativos funcionaram como previsto.

O "pool" de soros de galos inoculados com a amostra H-52, usado como controle positivo do teste de IH, apresentou título igual a 64 frente ao antígeno preparado com amostra M-41.

TABELA 3 - Títulos hemaglutinantes dos antígenos preparados com amostras de Vírus da Bronquite Infecciosa das Galinhas de referência ou isoladas de surtos clínicos da doença no Estado de Minas Gerais - Brasil

Amostra	Título (a)
CONTROLE (b)	0
M-41 (c)	160
A-5968 (c)	160
JMK (c)	320
ARK-99 (c)	160
SE-17 (c)	320
H-52 (c)	40
G (d)	20
TH (d)	0
200 (d)	160
PM-1 (d)	160
PM-2 (d)	160
PM-3 (d)	80
PM-4 (d)	320
290 (d)	80
297 (d)	80
208-10-BIG (d)	1280
283 (d)	160
327 (d)	320
351 (d)	20
29-78 (d)	640

(a) Recíproca da mais alta diluição onde houve 100% de hemaglutinação.

(b) Líquido alantóideo concentrado de ovos não inoculados.

(c) Amostras de referência.

(d) Amostras isoladas de surtos clínicos da doença no Estado de Minas Gerais - Brasil.

4.3. TÍTULOS INIBIDORES DA HEMAGLUTINAÇÃO (IH)
DAS FRAÇÕES CONTENDO GAMAGLOBULINAS OBTIDAS A
PARTIR DA MISTURA DOS LÍQUIDOS ASCÍTICOS IMUNES
DOS CAMUNDONGOS IMUNIZADOS COM A MESMA AMOSTRA DE
VBIG

Nenhuma das frações estudadas apresentou atividade de inibição da hemaglutinação frente aos antígenos homólogos, nem mesmo aqueles produzidos contra a amostra 208-10-BIG. Controles positivos e negativos funcionaram como previsto.



5. DISCUSSÃO

Dos objetivos iniciais deste trabalho, avaliação da atividade hemaglutinante e tipificação de amostras brasileiras de VBIG pelo teste de IH, o primeiro foi cumprido satisfatoriamente. O segundo, entretanto, foi comprometido pela não detecção de anticorpos inibidores da hemaglutinação no modelo escolhido.

Das 14 amostras de campo estudadas, 13 apresentaram atividade hemaglutinante após tratamento com fosfolipase C tipo 1. Estes resultados foram similares aos obtidos por ALEXANDER *et al.* (1976) que relataram que, de 9 amostras de VBIG tratadas com esta enzima, apenas 4 mostraram atividade hemaglutinante. A indução da atividade hemaglutinante pela fosfolipase C tipo 1 provavelmente é provocada pela hidrólise da fosfatidilcolina no envelope do VBIG que resultaria numa ligeira alteração nas características físicas desta membrana, gerando nova configuração tridimensional de polipeptídeos necessária para hemaglutinação (BINGHAM *et al.*, 1975). Entretanto, ainda não está claro o motivo de algumas amostras não apresentarem tal atividade após tratamento enzimático. ALEXANDER *et al.* (1976) sugerem que esta diferença não estaria relacionada com as características sorológicas ou morfológicas da amostra e nem com o número de partículas víricas presentes no antígeno. Por estes motivos, BROWN e BRACEWELL (1985) advertiram que esta incapacidade de algumas amostras apresentarem atividade hemaglutinante após o tratamento enzimático é um obstáculo à utilização mais ampla do teste de IH como instrumento para tipificação de amostras de VBIG.

A concentração de VBIg com PEG 20.000 mostrou-se bastante eficiente, uma vez que os antígenos produzidos a partir de vírus concentrado por este método foram eficazes. ABDUL-AZIZ & JAWAD (1989) compararam a concentração de vírus por ultracentrifugação e diálise contra PEG 20.000. Estes autores não encontraram diferenças significativas entre títulos hemaglutinantes dos antígenos concentrados por estes métodos. A concentração de VBIg com PEG 20.000 é de baixo custo e não requer a utilização de ultracentrifugas, fator limitante para muitos laboratórios. Entretanto, nas condições utilizadas neste trabalho, os antígenos mostraram-se espessos, provavelmente como consequência da concentração de proteínas do líquido alantóideo que também ficaram retidas na membrana de diálise. Esta característica do antígeno dificultou a leitura das reações em suas diluições iniciais.

LASHGARI & NEWMAN (1982) trataram amostras de VBIg com diferentes concentrações de fosfolipase C tipo 1 e não observaram diferenças significativas no título hemaglutinante dos antígenos obtidos. Com base nestes dados, optou-se por usar concentração alta de enzima (10 unidades por amostra) em face da presença de proteínas no líquido alantóideo concentrado. Esta concentração de enzima mostrou-se eficiente já que foi capaz de induzir atividade hemaglutinante em 13 das 14 amostras estudadas. Efeito adverso desta alta concentração de fosfolipase C tipo 1 poderia ser a lise dos eritrócitos pela presença residual da enzima, caso os testes de HA e IH fossem conduzidos à temperatura ambiente (POLI *et al.*, 1982). Por este motivo, todos os testes foram realizados a 4°C.

A literatura registra controvérsias quanto a forma e temperatura de estocagem de antígenos (ALEXANDER *et al.*, 1976; ALEXANDER & CHETTLE, 1977; LASHGARI & NEWMAN, 1982, POLI *et al.*, 1982). Neste experimento, como o tempo de estocagem seria curto, optou-se por usar o método de conservação adotado

por KING (1984), que consistia em tratar o antígeno com thimerosal (1:10000) e, em seguida, estocá-lo a 4°C. Os antígenos utilizados para se testar os líquidos ascíticos imunes individuais no teste de IH foram também utilizados para mensurar o título IH das frações contendo gamaglobulinas, obtidas a partir da mistura dos líquidos ascíticos homólogos. Entre um teste e outro, os antígenos permaneceram estocados em geladeira. Houve então necessidade de titulá-los novamente para verificar se ainda mantinham as 8 UHA necessárias para a execução do teste de IH. Foi observada elevação nos títulos hemaglutinantes e conseqüente necessidade de diluição para acerto destes títulos. Este aumento nos títulos possivelmente foi em decorrência da presença de agregados de partículas víricas no antígeno que foram se desfazendo aos poucos, aumentando o número de partículas disponíveis para hemaglutinação. Este fato também pode acontecer com outros vírus concentrados com PEG 6.000 ou por ultracentrifugação (VILLEGAS, 1985).

A produção de líquido ascítico anti-VBIG em camundongos foi o ponto crítico deste trabalho. A idéia original era inocular alguns camundongos Balb-C com amostras de VBIG concentradas e outros com amostras de VBIG concentradas e tratadas com enzima (antígeno), numa tentativa de verificar se haveria melhora na especificidade do teste de IH. A utilização de camundongos teve como objetivo evitar inconvenientes encontrados em outros modelos animais (galinhas, coelhos, cobaias e outros) convencionalmente empregados para obtenção de soros imunes. Neste trabalho, foi utilizado antígeno viral não inativado, pois não haveria perigo ou replicação do vírus nos camundongos, além da vantagem de menor ocupação de espaço. Entretanto, a grande maioria dos camundongos inoculados com o vírus tratado com fosfolipase C tipo 1, uma potente neurotoxina, morreu em menos de 24 h. Aqueles poucos que sobreviveram, provavelmente devido a erros na inoculação do antígeno, foram descartados.

No teste de IH, as amostras de líquidos ascíticos imunes foram testadas individualmente na tentativa de evidenciar possíveis variações nos títulos de anticorpos existentes entre indivíduos. Nenhuma das amostras apresentou reação de inibição da hemaglutinação consistente. Os títulos de anticorpos IH anti-amostra 208-10-BIG encontrados no teste dos líquidos ascíticos imunes individuais homólogos podem ter sido devido a presença de inibidores inespecíficos da hemaglutinação. Depois da purificação da fração contendo gamaglobulinas, estes líquidos ascíticos concentrados foram aquecidos para inativação dos inibidores inespecíficos de hemaglutinação e não mais foram detectados títulos de anticorpos IH para a amostra 208-10-BIG.

Finalmente, a despeito de camundongo ser um bom modelo experimental, especialmente como produtor de soros e líquidos ascíticos imunes, neste experimento, eles não funcionaram como bons produtores de anticorpos IH anti-VBIG. O problema, provavelmente, não esteve ligado aos animais mas à metodologia utilizada (antígeno grosseiro não purificado, principalmente).

6. CONCLUSÃO

→ As amostras de VBIG estudadas apresentaram atividade hemaglutinante quando submetidas a tratamento com a enzima fosfolipase C tipo 1, com exceção da amostra TII.

→ O método de concentração de líquido alantóideo contendo VBIG com o PEG 20.000 mostrou-se eficiente, mas o antígeno obtido ficou muito espesso, dificultando a leitura das reações de hemaglutinação ou daquelas que se apresentavam como negativas, em suas diluições iniciais.

→ Com a metodologia empregada neste experimento, camundongos Balb-C não produziram anticorpos IH anti-VBIG em níveis detectáveis.

7. SUMMARY

Fourteen strains of avian infectious bronchitis virus isolated from outbreaks of clinical disease in Minas Gerais State, Brazil, were concentrated by dialysis against polyethylene glycol (20.000 MW) and treated with phospholipase C type 1. Among the investigated strains, thirteen showed hemagglutinating activity.

These strains were tentatively classified by cross reaction hemagglutination-inhibition (HI) test using as antisera, ascitic fluids from Balb-C mice immunized with concentrates of the thirteen strains.

The individual immune ascitic fluids did not show HI activity. Not even after the purification of the gammaglobulin fraction from homologous ascitic fluid with the utilization of ammonium sulfate was possible to detect the presence of HI antibodies. It was not possible to group the strains by this method.



8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDUL-AZIZ, T. A., JAWAD, G. M. Hemagglutination and hemagglutination inhibition tests for avian infectious bronchitis. *Indian Journal of Comparative Microbiology, Immunology and Infectious Diseases*, v. 10, n. 2, p. 100-102, 1989.
- ALEXANDER, D. J., BRACEWELL, C. D., GOUGH, R. E. Preliminary evaluation of the haemagglutination and haemagglutination inhibition tests for avian infectious bronchitis virus. *Avian Pathology*, v. 5, n. 2, p. 125-134, 1976.
- ALEXANDER, D. J., CHETTLE, N. J. Procedures for the haemagglutination and haemagglutination inhibition test for avian infectious bronchitis virus. *Avian Pathology*, v. 5, n. 1, p. 9-17, 1977.
- BINGHAM, R. W., HILARY MADGE, M., TYRELL, D.A. Haemagglutination by avian infectious bronchitis virus. *Journal of General Virology*, v. 28, n. 2, p. 381-390, 1975.
- BISWALL, N., NAZERIAN, K., CUNNINGHAM, C. H. A haemagglutination fraction of infectious bronchitis virus. *American Journal of Veterinary Research*, v. 27, n. 120, p. 1157-1167, 1966.
- BOX, P. G., HOLMES, H. C., FINNEY, P. M., FROYMANN, R. Infectious bronchitis in laying hens: the relationship between haemagglutination inhibition antibody levels and resistance to experimental challenge. *Avian Pathology*, v. 17, n. 2, p. 349-361, 1988.

- BRANDEN, R. C. Bronquite Infecciosa - variantes no Brasil com conseqüências econômicas. III Seminário dos Produtores de Pintos de Corte. In: *Anais...*, Campinas, p. 21-23, 1985.
- BROWN, A. J., BRACEWELL, C. D. Application of the haemagglutination inhibition test to typing of infectious bronchitis virus. *Veterinary Record*, v. 116, n. 2, p. 47-48, 1985.
- BROWN, W. E., SCHMITTLE, S. C., FOSTER, J. W. A tannic acid modified haemagglutination test in infectious bronchitis of chickens. *Avian Diseases*, v. 6, p. 99-106, 1962.
- CASALS, J. Immunological techniques for animal viruses. In: MARAMAROSCH, K., KOPROWSKY, H. *Methods in Virology III*, Academic Press, 1967. 677 p. cap. 4. p. 113-198.
- COOK, J. K. A., BROWN, A. J., BRACEWELL, C. D. Comparison of the haemagglutination inhibition test and the serum neutralization test in tracheal organ cultures for typing infectious bronchitis virus strains. *Avian Pathology*, v. 16, n. 3, p. 505-511, 1987.
- CORBO, L. J., CUNNINGHAM, C. H. Haemagglutination by trypsin - modified infectious bronchitis virus. *American Journal of Veterinary Research*, v. 20, n. 78, p. 876-883, 1959.
- CUNNINGHAM, C. H. Recent studies on the virus of infectious bronchitis. *American Journal of Veterinary Research*, v. 21, p. 498-503, 1960.
- DI FABIO, J. Bronquite infecciosa das galinhas: Aspectos clínicos e controle da BIG no Brasil. Conferência APINCO 1993 de Ciência e Tecnologia Avícolas, Santos - SP. In: *Anais...* p. 1-8, 1993.

- FARAGHER, J. T. A haemagglutination inhibition test for infectious bronchitis virus antibody. *Australian Veterinary Journal*, v. 64, n. 8, p. 250-252, 1987.
- GOUGH, R. E., RANDALL, C. J., DAGLESS, M., ALEXANDER, D. J., COX, W. J., PEARSON, D. A "new" strain of infectious bronchitis infecting domestic fowl in Great Britain. *Veterinary Record*, v. 132, n. 8, p. 493-494, 1992.
- HATCHER, J. A., SKEELES, J. K., BLORE, P. J., STORE, J. D. Comparison of the haemagglutination-inhibition test with the constant-virus diluting-serum microneutralization test for detecting antibody to avian infectious bronchitis virus. *Avian Diseases*, v. 27, n. 4, p. 1157-1161, 1983.
- HEBERT, G. A. Ammonium sulfate fractionation of sera: mouse, hamster, guinea pig, monkey, chimpanzee, swine, chicken and cattle. *Applied Microbiology*, v. 27, p. 389-393, 1974.
- HOFSTAD, M. S. Avian infectious bronchitis. In: HOFSTAD, M. S., CALNEK, B. W., HEMBOLDT, C. F., REID, W. M., YODER, H. W. *Diseases of Poultry*, 7 ed., Ames: Iowa State University Press, 1978. 949 p. cap. 16, p. 487-503.
- HOPKINS, S. R. Serological comparisons of strains of infectious bronchitis virus using plaque-purified isolants. *Avian Diseases*, v. 18, p. 231-239, 1974.
- JORDAN, F. T. W. Infectious bronchitis. In: Jordan, F. T. W. *Poultry Diseases*. 3 ed., Cambridge: Cambridge University Press, 1990. 497 p. cap. 22, p. 159-166.

- KABAT, E. A., MAYER, M. M. Agglutination. In: KABAT, E. A., MAYER, M. M. *Experimental Immunochemistry*, 2 ed., Charles C. Thomas Publishers, 1967, 905 p., p. 111-132.
- KING, D. J. Observations on the preparation and stability of infectious bronchitis virus haemagglutination antigen from virus propagated in chicken embryos and chicken kidney cell cultures. *Avian Diseases*, v. 28, n. 2, p. 504-513, 1984.
- KING, D. J. A comparison of infectious bronchitis virus haemagglutination-inhibition test procedures. *Avian Diseases*, v. 32, n. 2, p. 335-341, 1988.
- KING, D. J., CAVANAGH, D. Infectious bronchitis. In: CALNEK, B. W., BARNES, H. J., BEARD, C. W., REID, W. M., YODER Jr., H. W. *Diseases of Poultry*, 9 ed., Ames: Iowa University Press, 1991, 929 p. cap. 17, p. 471-484.
- KING, D. J., HOPKINS, S. R. Evaluation of the haemagglutination-inhibition test to measuring the response of chickens to avian infectious bronchitis virus vaccination. *Avian Diseases*, v. 27, n. 1, p. 100-102, 1983.
- KING, D. J., HOPKINS, S. R. Rapid serotyping of infectious bronchitis virus isolates with the haemagglutination-inhibition test. *Avian Diseases*, v. 28, n. 3, p. 727-733, 1984.
- LAMAS DA SILVA, J. M. Bronquite infecciosa das galinhas: como e quando introduzir novas vacinas. Conferência APINCO 1989 de Ciência e Tecnologia Avícolas, Campinas - S.P. In: *Anais...* Campinas - S.P., p. 75-79, 1989.

- LASHGARI, M. S., NEWMAN, J. A. Preparing haemagglutinating antigen from isolates of infectious bronchitis virus. *Avian Diseases*, v. 26, n. 3, p. 508-519, 1982.
- MACPHERSON, I., FEEST, A. Some observations on the value of the infectious bronchitis haemagglutination-inhibition test in the field. *Avian Pathology*, v. 7, n. 3, p. 337-347, 1978.
- McINTOSH, K. Coronaviruses; a comparative review. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, v. 63, p. 85-129, 1974.
- McKINNEY, M. M., PARKINSON, A. A simple, non-chromatographic procedure to purify immunoglobulins from serum and ascites fluid. *Journal of Immunological Methods*, v. 96, p. 271-278, 1987.
- PEREZ, M. C. L. Algunos aspectos sobre la epizootiología de la bronquitis infecciosa aviar. In: *Instituto Superior de Ciencias Agropecuarias de la Habana*. Facultad de Medicina Veterinaria, 1989, 69 p.
- PERROTA, C., FURTEK, C., WILSON, R. A., COWEN, B. S., ECKROADE, R. J. A standardized enzyme-linked immunosorbent assay for infectious bronchitis virus: comparison with haemagglutination inhibition and virus-neutralization assays for measuring protective antibody levels in chickens. *Avian Diseases*, v. 32, p. 451-460, 1988.
- POLI, G., RAMPIN, T., TONIOLO, A., MISCIATELLI, M. E. Indagini sull'attività emoagglutinante del virus della bronchite infettiva aviaria indotta dal trattamento con fosfolipasi C. *Clínica Veterinaria*, v. 105, n. 1/2, p. 88-97, 1982.

SURYANARAYAN, T. A modified haemagglutination inhibition test for the detection of antibody to infectious bronchitis virus in chicken. *Indian Journal of Animal Sciences*, v. 61, n. 11, p. 1174-1175, 1991.

TORO, H., HIDALGO, H., CARDOSO, W., MORALES, M. A. Bronquitis infecciosa en Chile: prospeccion de anticuerpos contra la cepa M-41 y las cepas variantes D-274 y D-1466 através de la prueba de inhibición de la hemoaglutinación. *Archives de Medicina Veterinária*, v. 21, n. 2, p. 109-115, 1989.

VILLEGAS, P. *Laboratory Manual of Avian Virus Diseases*. Georgia: College of Veterinary Medicine, 1985. 56 p.

WATT, R. G., MACPHERSON, I. Freeze-dried infectious bronchitis haemagglutinating antigen. *Veterinary Record*. v.106, p.467, 1980.

UFMG - ESCOLA DE VETERINÁRIA - BIBLIOTECA

Doação de Col. Curso P. Grad.

EV. UFMG Preço _____

Data 07/02/95