

Maria Fátima da Silva Teixeira

T636.087.59

1988

1990



DESENVOLVIMENTO DE UM TESTE IMUNOENZIMÁTICO PARA DETECÇÃO DE ANTICORPOS PARA O VÍRUS DA DOENÇA DE GUMBORO E COMPARAÇÃO COM OS TESTES DE GEL DIFUSÃO EM ÁGAR, SORONEUTRALIZAÇÃO E ELISA COMERCIAL

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

Área: Medicina Veterinária Preventiva

Belo Horizonte
Minas Gerais
1990

ND 000003091

0916-87460

BIBLIOTECA UNIVERSITARIA
18/03/91

1413291-05

Univ. Federal de Minas Gerais

636.508 969 2

T266d Teixeira, Maria Fátima da Silva, 1951-

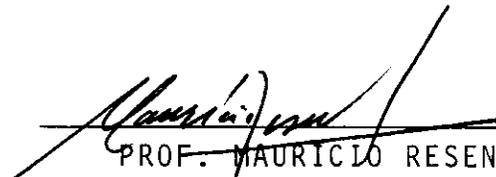
Desenvolvimento de um teste imunoenzimático para detecção de anticorpos para o vírus da Doença de Gumboro e comparação com os testes de gel difusão em ágar, soroneutralização e ELISA comercial/Maria Fátima da Silva Teixeira. - Belo Horizonte: UFMG-Escola de Veterinária, 1990.

44p. : il.-

Dissertação (Mestrado)

1. Doença de Gumboro - Diagnóstico. 2. ELISA. 3. Aves domésticas. Doenças. I. Título.

Aprovada em: 05/09/90


PROF. MAURICIO RESENDE
Orientador


PROF. JOSÉ SÉRGIO DE RESENDE


PROF. MAULORI CURIE CABRAL

Dedico este trabalho:

À minha mãe, Oselídia, por quem tenho profunda admiração e a quem devo tudo o que sou.

Às minhas filhas, Micaella e Cristianne, pois, vocês simbolizam a minha alegria de viver.

Às minhas irmãs Ana e Marta pelo apoio e fraternidade.

Aos meus sobrinhos Rodger e Robson pela alegria que vocês proporcionam.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Maurício Resende, pela valiosa orientação, pelo constante apoio, dedicação às pesquisas, pelos brilhantes ensinamentos, sem os quais não seria possível a realização deste trabalho.

Ao Prof. José Sérgio de Resende, pela orientação, ensinamentos transmitidos e a imprescindível ajuda em todas as fases do meu trabalho, pelo estímulo nas horas difíceis, grande amizade, fica difícil expressar em tão poucas palavras minha gratidão.

À Universidade Estadual do Ceará, pela oportunidade concedida, na política de capacitação de docentes em especial à FAVET na pessoa do Diretor Artur H. Soares, dos colegas Josefa Lineuda, Talapala G. Naidu, Socorro Furtado, Manoel Martins, Antonio Duarte e a minha grande amiga Alzenira Andrade, secretária do Departamento de Medicina Veterinária, sem a colaboração de vocês não teria sido possível o bom desempenho do meu trabalho.

Ao programa de Capacitação e Aperfeiçoamento de Professores do Ensino Superior-CAPEs, pela concessão de bolsa de estudos no período de 1986-1988.

Aos colegas do Curso de Medicina Veterinária Preventiva, Zélia, Isabel, Isabella, Sheila, Leda, Francisco Lobato, Nelson, Artur, Roberto, Pedro, Marcos, Gilvan, Hamilton, Odete e Olívia pela amizade e convívio alegre.

Aos colegas do Laboratório de Virologia Comparada ICB-UFMG, Alice Alfieri, Amauri Alfieri, Regina Carvalho, Fernando Fernandez, Vicente Toledo, Abdulsalan Ali Ashur, Edel Figueiredo, Ricardo Amaral, pelo companheirismo e grande amizade.

Aos demais colegas da Escola de Veterinária, das áreas de Zootecnia, Reprodução e Patologia em especial a Sineidia Fragoso, Elisa Barbieri e Jenecy de Fátima Aparecida pela amizade e convívio agradável.

À minha amiga-irmã Lúcia Brasil que acompanhou de perto todas as etapas da minha vida em Belo Horizonte, sempre dando aquela força incrível para superar os obstáculos, a esta sólida amizade.

À grande amiga Vilma Tânia, pelo apoio, por todos os aspectos que você colaborou, por esta amizade tão bonita.

Ao LANARA-Pedro Leopoldo-MG, nas pessoas das colegas Regina Carvalho, Rosilene Mont'Alverne e Mirian Soares, pelo constante apoio, e acesso a utilização do Laboratório de aves em parte do trabalho que desenvolvi.

Ao Departamento de Microbiologia do ICB-UFMG, pela oportunidade de realizar o experimento deste trabalho no Laboratório de Virologia Comparada.

Ao Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, aos docentes pelos ensinamentos recebidos.

Ao setor de Computação e Análise estatística do ICB-UFMG, pela análise estatística dos dados do meu trabalho.

À coordenação dos Cursos de Pós-Graduação da Escola de Veterinária da UFMG, na pessoa da Profª Vera Alvarenga Nunes, pelo apoio recebido.

À Cláudia Kafuri e Fátima, secretárias dos Cursos de Pós-Graduação da Escola de Veterinária pela colaboração e atenção dispensada.

Ao Setor de Doenças das Aves, da Escola de Veterinária e ao Prof. Regino Leonardo, pelo apoio e alegre convivência.

Ao Cláudio, Ismael e Ailton pelo apoio técnico e amizade.

Ao amigo Max, pelas colaborações, sugestões na correção da tese.

Ao setor de Virologia da Escola de Veterinária, representado pelo Prof. Rômulo Cerqueira Leite, pela oportunidade de utilização do laboratório.

À Doraci, do setor de cultivo de células da Escola de Veterinária, pelo apoio técnico.

Ao Prof. Carlos A. P. Tavares e sua equipe, pelas facilidades concedidas na utilização de sua infra-estrutura laboratorial, Departamento de Bioquímica do ICB-UFMG.

Aos Profs. Romain Goelher e Claudio Bonjardin e a equipe do Laboratório de Vírus do ICB-UFMG, pelo apoio técnico e utilização de equipamentos do seu laboratório.

Ao Prof. do Departamento de Bioquímica e Imunologia Marcos Vinícius Gomes, pela utilização de equipamentos.

À Marília N. Santos, Roberto Altavila e Neuza Rodrigues, pela amizade e colaboração técnica, no Laboratório de Virologia Comparada do ICB-UFMG.

À Maria Cecília, bibliotecária do ICB-UFMG, pela colaboração.

À Marília F. Carvalho, pela correção da revisão bibliográfica da tese, aos demais funcionários da biblioteca da Escola de Veterinária, pela colaboração e cordialidade.

À minha irmã Ana Maria Teixeira, pela cooperação, desempenho na sobrecarga e controle de todas as minhas atividades na minha ausência do Ceará. Você surpreendeu-me com sua capacidade.

Aos amigos, Paulo Roberto, Jacy Aparecida e Jenecy de Fátima, pela amizade, compreensão e o teto acolhedor que sempre me receberam.

À Ana Maria (Neca), pela ajuda e carinho dispensado à Micaella durante a época que dediquei totalmente à tese.

Aos que direta ou indiretamente contribuíram com a realização deste trabalho.

O presente trabalho contou com o apoio financeiro das seguintes instituições:

. Financiadora de Estudos e Projetos - FINEP - (Convênio FINEP/UFMG - Escola de Veterinária nº 42.86.0336-00/PADCT - Programa de Auxílio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico).

. Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Minas Gerais-FAPEMIG - Processo nº CAG-344/86.

. Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

. Conselho de Pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais-CPq-UFMG.

BIOGRAFIA DO AUTOR

MARIA FÁTIMA DA SILVA TEIXEIRA, filha de Adalberto Lima Teixeira e Oselídia da Silva Teixeira, nasceu em Fortaleza, Ceará, aos 12 dias do mês de abril de 1951.

Obteve o diploma de Médico Veterinário em 1973 pela Faculdade de Veterinária do Ceará.

Durante os anos de 1974 e 1975 prestou assistência técnica veterinária às empresas avícolas Companhia Brasileira de Rações-CBR e Granja São Carlos, Fortaleza-CE.

Ingressou na carreira do magistério superior em 1976 na Faculdade de Veterinária do Ceará, hoje Faculdade de Veterinária da Universidade Estadual do Ceará-UECE, onde permanece até hoje, ministrando a disciplina de Microbiologia Veterinária.

Cursou Especialização em Medicina Tropical na Universidade Federal do Ceará-UFC, de 1979 a 1981.

Estagiou, durante o ano de 1985, no Laboratório de Virologia do Instituto de Microbiologia da Universidade Federal do Rio de Janeiro UFRJ.

Ingressou em 1986 no curso de Mestrado em Medicina Veterinária Preventiva na Universidade Federal de Minas Gerais UFMG.

RESUMO

Foi desenvolvido um teste imunoenzimático com finalidade de detecção de anticorpos para o vírus da doença de Gumboro, denominado ELISA-B. Foram trabalhados três tipos de antígenos, dos quais dois foram preparados a partir de sobrenadante de cultivo celular (fibroblastos de embrião de ovos de galinha SPF) infectado com a amostra Lukert do vírus da doença de Gumboro (VDG), sendo que a etapa de produção inicial de ambos foi idêntica mas diferente na etapa final (um foi produzido por centrifugação e o outro por ultrafiltração). O terceiro antígeno foi produzido a partir de bolsas de Fabrício lesadas provenientes de galinhas SPF infectadas com a amostra BH-83 do VDG. Os antígenos provenientes de cultivo celular geraram resultados insatisfatórios e o antígeno preparado com bolsa de Fabrício produziu bons resultados. O conjugado desenvolvido foi preparado com imunoglobulina G de coelho anti-gamaglobulina de galinha acoplada à peroxidase. Os soros padrões controles utilizados (positivo e negativo) foram produzidos em galinhas SPF e testados inicialmente por imunodifusão (AGP).

Foram feitos estudos entre as provas de AGP, soro-neutralização (SN) e o ELISA-B envolvendo 312 amostras de soros de frangos de corte procedentes de granjas das regiões do Alto São Francisco e Zona Metalúrgica do Estado de Minas Gerais.

Entre o ELISA-B, o AGP e a SN foi encontrada uma cor

relação significativa através do estudo pelo χ^2 ($\chi^2 = 10,90$, $P < 0,05$).

Foram comparados, isoladamente, pelo χ^2 , o AGP com ELISA-B e o SN com ELISA-B, o que resultou em diferenças significativas ($\chi^2 = 7,87$, $P < 0,05$).

Ao correlacionar AGP com SN não foi detectado diferença significativa ($\chi^2 = 5,99$).

A análise pelo χ^2 entre ELISA-B e o ELISA comercial importado (ELISA-A) não foi possível de ser estabelecida, visto que o somatório entre os positivos e negativos foram muito próximos. O ELISA-A com 243 soros examinados apresentou um total de 111 positivos e 132 negativos. O ELISA-B, por sua vez, do mesmo total, apresentou 110 positivos e 133 negativos.

SUMÁRIO

	Página
1. INTRODUÇÃO.....	01
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	05
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	08
3.1. Soros.....	08
3.1.1. Soros testes.....	08
3.1.2. Soros controles.....	08
3.2. Cultivo celular e meios de cultura.....	08
3.3. Vírus.....	09
3.3.1. Amostra Lukert.....	09
3.3.2. Amostra BURSINE II.....	09
3.3.3. Amostra BH-83.....	10
3.4. Produção de imunesoros.....	10
3.4.1. Soro de coelho anti-gamaglobulina de ga- linha.....	10
3.4.2. Soro controle positivo para o VDG.....	10
3.4.3. Soro controle negativo para o VDG.....	11
3.5. Produção de antígeno para ELISA.....	11
3.5.1. Antígeno preparado com a amostra LUKERT... 11	11

	Página
4.4. Microtécnica de soroneutralização (SN).....	19
4.5. Testes sorológicos.....	20
5. DISCUSSÃO.....	31
6. CONCLUSÕES.....	38
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	39



LISTA DE TABELAS

	Página
TABELA 1 - Diferentes concentrações de antígeno BH-83 frente a diluições de soros controles positivo e negativo.....	21
TABELA 2 - Titulação de IgG de coelho anti-galinha conjugado com peroxidase.....	22
TABELA 3 - Titulação de anticorpos anti-VDG de frangos de corte procedentes das regiões do Alto São Francisco e Zona Metalúrgica do Estado de Minas Gerais, determinados pelo teste de soro-neutralização (SN).....	23
TABELA 4 - Resultados dos testes sorológicos de AGP, ELISA-B e SN para Ac anti-VDG em soros de frangos de corte das regiões do Alto São Francisco e Zona Metalúrgica do Estado de Minas Gerais...	24
TABELA 5 - Anticorpos anti-VDG de soros de frangos de corte, determinados pelo ELISA-A e ELISA-B, procedentes das regiões do Alto São Francisco e Zona Metalúrgica do Estado de Minas Gerais.	25

TABELA 6 - Comparação entre os resultados obtidos no AGP, ELISA-B e SN pelos testes de χ^2 em soros de frangos de corte das regiões do Alto São Francisco e Zona Metalúrgica do Estado de Minas Gerais.....	26
TABELA 7 - Comparação da pesquisa de anticorpos anti-VDG pelos testes de AGP e ELISA-B obtidas pelo método do χ^2 em frangos de corte da região do Alto São Francisco e Zona Metalúrgica do Estado de Minas Gerais.....	27
TABELA 8 - Comparação da pesquisa de anticorpos anti-VDG pelos testes AGP e SN obtidos pelo teste de χ^2 em frangos de corte das regiões do Alto São Francisco e Zona Metalúrgica do Estado de Minas Gerais.....	28
TABELA 9 - Comparação da pesquisa de anticorpos anti-VDG pelos testes de soroneutralização e ELISA-B obtidos pelo teste de χ^2	29

LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1 - Titulação do antígeno BH-83 com duas diferentes diluições de soros padrões positivos e negativos de galinhas SPF.....	30
---	----

1. INTRODUÇÃO

A produção anual de frangos de corte no Brasil foi superior a um milhão de aves em 1987, conforme PRODUÇÃO (1988), o que dá dimensão da real importância da avicultura em nosso país. Na atualidade tem-se inúmeras doenças que podem desempenhar um menor ou maior papel na avicultura industrial e entre elas está a Doença Infecciosa da Bursa de Fabricius (DIB). É também muito conhecida como Doença de Gumboro (DG). O seu diagnóstico tem sido problemático especialmente porque ainda não foram popularizadas as técnicas mais sensíveis como as que se baseiam em testes imunoenzimáticos em fase sólida (ELISA).

A DG tem como agente etiológico um vírus de simetria icosaédrica de 58 a 60 nm, não envelopado e que pertence à Família BIRNAVIRIDAE Gênero Birnavírus. Esse nome se deve à característica física do genoma por ser a RNA de fita dupla (HIRAI et al, 1979, BROWN, 1986).

Atualmente, a infecção pelo vírus da doença de Gumboro (VDG) tem sido predominantemente de natureza sub-clínica. Entretanto, devido à destruição celular que ocorre mesmo nesse tipo de infecção e em função do papel importante dos linfócitos B, as aves apresentam imunodepressão que pode ser permanente, especialmente quando se infetam ainda jovens. Consequentemente, ficam mais susceptíveis à implantação de outros agentes infecciosos como hepatite por corpúsculo de inclusão, doença de

Marek, salmoneloses, colibaciloses e coccidioses (CHO & EDGARD, 1969, WYETH & CULLEN, 1976).

Embora o índice de mortalidade seja baixo (às vezes até 5-6%) a morbidade é muito grande (aproximadamente 80%). Em frangos de corte, principalmente, pode haver diminuição do peso final e um aumento nos índices de condenação de carcaças ao abate, devido às manifestações clínicas dos agentes oportunistas frente a situação de imunodepressão (LUKERT & HITCHNER, 1984).

O VDG está disseminado no mundo inteiro. A partir da primeira descrição no sul dos EUA por COSGROVE (1962) foi detectado na maioria dos países com avicultura industrial (OKOYE, 1984). No Brasil, já havia indícios da existência da doença quando WINTERFIELD (1968) conseguiu demonstrar anticorpos (Ac) neutralizantes anti-VDG em soros de aves procedentes do nosso território. A primeira notificação de infecção com base em achados histopatológicos foi feita por NAKANO et al (1972) que a encontrou em aves avôs procedentes dos EUA. O primeiro isolamento e caracterização de VDG no Brasil foi realizado por SAUKAS (1978).

Segundo ATIVIDADE (1980), embora sem especificação dos métodos de diagnóstico empregados, a DG é encontrada nos estados de Santa Catarina, Ceará, Pernambuco e Pará. Posteriormente, SILVA et al (1981) e OLIVEIRA et al (1981), em soros de aves enviados para laboratórios de diagnóstico avícola de Belo Horizonte, encontraram grande número de soros (72%) com Ac anti-VDG ao teste de precipitação em gel (AGP) para VDG. SAUKAS et al (1981), estudando, sorologicamente, a prevalência do VDG em aves do estado de Pernambuco, encontraram uma positividade de 48,54% com o teste de AGP.

No período de 1983 a 1984, vários focos de DG clínica foram notificados nos estados do Rio de Janeiro, Paraná e Região Centro-Oeste (DOENÇAS, 1983, DOENÇAS, 1984).

LEVANTAMENTO (1988), estudando 177 lotes de frangos de corte em 106 diferentes granjas das regiões do Alto São Francisco e Zona Metalúrgica de Minas Gerais, encontraram 87% dos

lotes positivos para VDG pelo AGP.

Com o desenvolvimento do teste de ELISA por ENGVALL & PERMAN (1971) e a posterior adaptação deste para microtécnica (VOLLER et al, 1985) descortinou-se um universo de possibilidades para sua utilização. No que se refere ao diagnóstico na avicultura foi inicialmente aplicado para Reovírus (SLAGHT et al, 1978). Já para o VDG coube a MARQUARDT et al (1980) a primeira aplicação do teste.

O teste de ELISA pode ser preparado de maneira que apresente como características ser específico, sensível e relativamente barato. Os reagentes envolvidos são estáveis e seguros, de fácil manuseio e a leitura pode ser automatizada (NICHOLAS & THORNTON, 1986). Tem as mais variadas aplicações na sorologia podendo ser adaptado para detectar diferentes classes de Ac, separadamente ou em grupo, através de alterações de especificidade dos Ac ligados à enzima (NICHOLAS & THORNTON, 1986). Pode ser usado em estudos epidemiológicos das enfermidades infecciosas devido a facilidade de se trabalhar com um grande número de amostras (MELENDEZ et al, 1985). O teste de ELISA indireto tem sido largamente usado para detecção de Ac anti-vírus da bronquite infecciosa, enterite hemorrágica, VDG e encefalomielite (VOLLER et al, 1985, NICHOLAS & THORNTON, 1986). Uma outra aplicação consiste em se poder avaliar a produção de Ac de aves que tenham sido vacinadas (MARQUARDT et al, 1980).

Atualmente, no Brasil, o diagnóstico sorológico do VDG vem sendo feito por AGP, soroneutralização (SN) e, eventualmente, por ELISA indireto com um "Kit" importado.

Com o intuito de se aplicar um teste imunoenzimático com reagentes produzidos localmente e, portanto, difundir a metodologia envolvida em todas as etapas foi proposto a produção e desenvolvimento de um "Kit" ELISA para a pesquisa de Ac anti-VDG.

Como outros objetivos desse desenvolvimento experimental realizaram-se:

- . comparação dos níveis de Ac anti-VDG em soros de

frangos de corte de 55-60 dias de idade através das técnicas de AGP, SN e ELISA;

. comparação dos níveis de Ac anti-VDG em soros de frangos de corte em idade de abate através do teste de ELISA indireto desenvolvido neste trabalho (denominado ELISA-B) e um "Kit" de ELISA comercial importado (denominado ELISA-A).

2. REVISÃO DE LITERATURA

HOWIE & THORSEN (1981) investigaram a aplicação de um teste de ELISA indireto para detectar Ac anti-VDG. O antígeno (Ag) usado foi preparado com a amostra BECHT adaptada a fibroblastos de embrião de galinha (CEF) e o conjugado empregado foi imunoglobulina (IgG) de coelho anti-galinha acoplado à peroxidase. Padronizaram um teste adotando como diferença mínima para distinguir positivo do negativo 0,30 DO de leitura em espectrofotômetro a 449 nm. Concluíram ser o teste desenvolvido objetivo, sensível, específico e econômico e, além disso, acharam que a técnica foi de fácil execução, sendo a conjugação com peroxidase o passo mais complexo. O fator crítico encontrado no desenvolvimento do teste foi a purificação do Ag usado, além da temperatura e tempo de reação.

MARQUARDT et al (1980) elaboraram um ELISA indireto para medir Ac anti-VDG em galinhas. O Ag foi preparado a partir de células renais de embrião de galinha (CEK) infectadas com uma amostra de VDG vacinal. Após a destruição celular, o sobrenadante da cultura foi ultracentrifugado e o sedimento obtido reconstituído em tampão TRIS-EDTA-NaCl em uma diluição de 1:200. Utilizaram-se na revelação IgG de coelho anti-galinha conjugada com peroxidase na diluição de 1:3000. Compararam os resultados do teste desenvolvido com os resultados por SN e AGP. Constataram que Ac anti-VDG podem ser detectados por ELISA

quatro dias pós-infecção. Com uma semana de infecção os títulos variaram entre 1600 a 25.000, permanecendo altos por um ano. Ac precipitantes foram detectados no soro sem diluir sete dias pós-infecção e o pico detectável de AGP foi obtido entre 2-6 semanas (títulos de 40 a 160). O teste de ELISA detectou altos títulos no período de 1-4 semanas e pós-infecção mostrou uma menor sensibilidade em comparação com SN na 23ª, 43ª e 48ª semanas. A diferença entre SN e ELISA refletiu a divergência de especificidades antigênicas dos Ac medidos pelos dois testes empregados. Concluíram que o ELISA desenvolvido é sensível, específico, reproduzível e rápido.

NICHOLAS et al (1985) testaram em ELISA, AGP e SN soros de galinhas SPF anteriormente vacinadas com quatro tipos diferentes de vacina oleosa contra VDG. Na SN usaram os soros diluídos ao dobro e 200 TICD₅₀ de VDG. No ELISA usaram o sistema de microtécnica e as amostras de soro diluídas 1:20. Utilizaram na revelação IgG de coelho anti-galinha conjugada com peroxidase. O teste de ELISA detectou Ac anti-VDG na maioria das aves sete dias após a vacinação (dav), a SN detectou, nesse prazo, Ac em alguns soros e AGP em nenhum. No 14º dav as aves estavam positivas aos três testes, excetuando-se um grupo (A). No 21º dav todas estavam positivas aos três testes. Houve concordância na maioria dos resultados entre ELISA e SN. Entretanto, 37 aves negativas para SN e AGP estavam positivas no ELISA e 31 positivas para ELISA estavam negativas para AGP e SN. Existiu significativa correlação entre as médias das respostas a todos os testes. Foi demonstrado uma correlação entre SN e AGP de $r = 0,818$, entre SN e ELISA de $r = 0,665$ e entre AGP e ELISA de $r = 0,573$.

SNYDER (1985) utilizou o ELISA para detecção de Ag e Ac em programas de controles de DG em plantéis de poedeiras comerciais. Demonstrou a possibilidade de emprego de um teste duplo indireto de Ac para identificação de vírus (Amostra D-78) e frisou a versatilidade do ELISA indireto na determinação quantitativa de Ac anti-VDG.

BRIGGS et al (1986) empregaram um teste de ELISA para pesquisa e determinação de título de Ac anti-VDG. Desenvolveram uma equação, através da análise de uma curva preparada utilizando-se da relação positivo-negativo, de maneira a se determinar o título de Ac usando-se uma única diluição do soro. Os resultados foram comparáveis com a SN.

CASTELLÓ et al (1987) determinaram Ac anti-VDG em matrizes que tinham sido anteriormente vacinadas contra DG com vírus vivo e também com vírus inativado, através das provas de AGP, SN e ELISA. Concluíram que nos animais positivos os títulos SN foram maiores do que para o ELISA. Não encontraram falsos positivos sendo que apenas o AGP apresentou dois falsos negativos (2,53%).

MEULEMANS et al (1987) compararam um teste de ELISA com SN para DG em 74 soros de matrizes vacinadas. Para o ELISA, o Ag foi preparado com a amostra PBG-988 de VDG adaptada a CEF, concentrado através do sistema AMICON, reconstituído e ultracentrifugado. Os soros testes foram diluídos a partir de 1:100 em série na base dois. A amostra PBG-988 foi usada na concentração de 100 TICD₅₀. Os resultados comparativos do teste SN e ELISA realizados entre 74 soros analisados apresentaram um coeficiente de correlação $r = 0,72$. Consideraram como positivo no ELISA um título igual ou superior a 400 o que correspondia a 10 na SN.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Soros

3.1.1. Soros testes

Foram utilizadas 312 amostras de soros provenientes de 19 granjas das regiões do Alto São Francisco e Zona Metalúrgica do Estado de Minas Gerais. Foram armazenadas em volumes de 10 ml a -20°C e descongeladas no momento do uso.

3.1.2. Soros controles

Os soros utilizados como controles positivo e negativo foram obtidos de galinhas SPF (SPAFAS REZENDE) (vide sub-ítens 3.4.2 e 3.4.3). Foram armazenados nas mesmas condições das amostras de soros testes.

3.2. Cultivo celular e meios de cultura

Prepararam-se células (fibroblastos - CEF) a partir de embriões de galinhas SPF com dez dias de incubação, conforme ROMERO (1986). Resumidamente, os embriões foram colocados em uma placa de petri (100 mm x 15 mm) contendo Salina de Saint Growth (NaCl : 8,0 g; KCl : 0,4 g; $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{H}_2\text{O}$: 1,77 g; NaH_2PO_4 :

0,69 g; solução de vermelho de fenol 1%: 0,5 ml; H₂O dd: 1000 ml - pH final 7,2). Após a lavagem, foram retiradas as vísceras, massa cerebral e parte das asas e patas. Foram novamente lavados e, em seguida, passados através de uma seringa de 20 ml. Os fragmentos foram recolhidos em um erlemayer contendo uma solução de tripsina 0,25% (p/v). A mistura foi posta sob agitação magnética com velocidade suave durante dez minutos a 37°C. A suspensão foi decantada e o sobrenadante transferido para tu bos de centrífuga contendo um ml de soro fetal bovino (CULTILAB, Campinas). A tripsinização foi repetida por mais duas vezes. A suspensão com células foi centrifugada durante dez minutos a 1.000 rpm e o depósito celular ressuspendido em meio-199 (SIGMA) com 5% de soro fetal bovino, 40 µg/ml de gentamicina (SCHERING) e 40 µg de fungizona (SQUIBB). Após contagem em câmara de Neubauer, foram semeadas 150.000 células por pocinho. As placas foram incubadas durante 24-48 horas em estufa a 37°C com 5% de CO₂ até o total fechamento da monocamada celular.

3.3. Vírus

3.3.1. Amostra Lukert

É uma amostra vacinal adaptada a CEF e utilizada para produção de Ag para o teste de ELISA. Foi gentilmente cedida pela Dr^a Rosilene Mont Alverne (LANARA - Pedro Leopoldo-MG).

3.3.2. Amostra BURSINE II

Essa amostra vacinal foi reconstituída em H₂O destilada e armazenada em nitrogênio líquido para uso na prova de soroneutralização em cultivo celular. Foi gentilmente cedida pela VACCINAR (Belo Horizonte-MG).

3.3.3. Amostra BH-83

É uma amostra patogênica e que tem sido passada (4X) em galinhas SPF. Foi gentilmente cedida pelos Professores Regino Leonardo de Oliveira e José Sérgio de Resende (Escola de Veterinária da UFMG).

3.4. Produção de imunesoros

3.4.1. Soro de coelho anti-gamaglobulina de galinha

Quatro coelhos de aproximadamente 2 kg de peso cada, da raça Nova Zelândia branco, foram inoculados por via intradérmica no dorso com 1 ml de inóculo contendo 100 µg de proteína de gamaglobulina de galinha diluída ao terço em adjuvante completo de Freund (DIFCO) segundo HERBERT (1974a) e HERBERT (1974b). Após 60 dias foi feito reforço com 2 ml contendo 200 µg de gamaglobulina de galinha diluída ao terço em adjuvante incompleto de Freund (AIF) e injetado por via sub-cutânea na dobra da pele do pescoço. Após oito dias, foi feito um novo reforço com 1 mg de gamaglobulina de galinha já usada e na mesma diluição anterior com AIF, também pela via sub-cutânea. Uma semana depois, foi feita uma sangria de prova na orelha e, com o soro, realizado teste de imunodifusão em gel de agarose nas diluições de 1:10, 1:20, 1:40 e 1:80. Três dos coelhos reagiram produzindo Ac com reatividade até a diluição 1:80, apenas um deles reagiu 1:10. Foi realizada a sangria por punção cardíaca nos coelhos cujos soros obtiveram maior título. Os 90 ml de soro obtidos foram fracionados em 10 ml (frascos tipo penicilina) e armazenados a -20°C.

3.4.2. Soro controle positivo para o VDG

Foi obtido a partir de galinhas SPF (SPAFAS REZENDE) com 12 semanas de idade e infectadas com VDG (via oral/0,2 ml

de suspensão de BF/10 DIE₅₀). O soro foi colhido oito semanas após infecção e a efetiva comprovação de positividade foi realizada através de AGP (WEISMAN & HITCHNER, 1978).

3.4.3. Soro controle negativo para o VDG

Foi obtido a partir de galinhas SPF não imunizadas contra o VDG e, portanto, insentas de Ac contra VDG conforme comprovado através de testes de AGP, SN e ELISA.

3.5. Produção de antígeno para ELISA

3.5.1. Antígeno preparado com a amostra LUKERT

O vírus foi inoculado em garrafas com CEF que foram incubadas a 37°C com 5% de CO₂ durante 48 e ou 72 horas até o aparecimento de efeito citopático (CPE) do vírus caracterizado por arredondamento celular. As garrafas foram submetidas a dois ciclos de congelamento e descongelamento e o sobrenadante foi clarificado por centrifugação a 8.000 rpm durante 30 minutos (SORVALL SS-34). O vírus foi concentrado por dois métodos diferentes.

3.5.1.1. Concentrado por centrifugação

O vírus foi sedimentado por centrifugação a 18.000 rpm durante 2 horas através de um colchão de sacarose 30% (p/p). O sedimento foi reconstituído em tampão TRIS-HCl 0,05 M pH 7,6 (SIGMA) e a concentração protéica determinada pelo método de BRADFORD (1976).

3.5.1.2. Concentrado por ultrafiltração

O Ag foi também preparado por concentração do sobrenadante de cultura por ultrafiltração (CX30 MILLIPORE) e a con

centração protéica determinada pela mesma metodologia já usada anteriormente.

3.5.2. Antígeno preparado com a amostra BH-83

Foi preparado segundo PATTISON et al (1975). Galinhas SPF com oito semanas de idade foram expostas à amostra BH-83. Após o aparecimento da doença (72 horas após exposição), as aves foram sacrificadas e as BF com lesões macroscópicas foram extraídas e lavadas com PBS (0,1 M pH 7,0), trituradas (OMNIMIXER-SORVALL) em três ciclos de 10.000 rpm durante 60 segundos em banho de gelo e, em seguida, sonicados em três ciclos consecutivos de 15 segundos cada (aparelho de ultrassom MSE). Em seguida, o triturado das bursas foi diluído 1:2 com PBS (0,2 M pH 7,0) e retriturada em potter Elvehjem (THOMAS). Em continuação, o triturado das bursas foi homogeneizado com idêntico volume de triclorotrifluoretano 1.1.2 (FREON-SIGMA) e centrifugados a 2.000 rpm durante 15 minutos. A fase aquosa foi clarificada por centrifugação a 10.000 rpm durante 30 minutos a 4°C e o sobrenadante concentrado com PEG 20.000 (SIGMA) durante 24 horas a 4°C. O concentrado de BF foi ultracentrifugado (SORVALL rotor AH 629 SW) através de um colchão de sacarose a 30% (p/p) a 25.000 rpm durante 60 minutos. O sedimento foi reconstituído em tampão TRIS-HCl 0,2 M pH 8,0 e novamente ultracentrifugado em gradiente de sacarose 40-60% (p/p) durante 90 minutos. A banda contendo o vírus foi colhida e a concentração protéica determinada pelo método de BRADFORD (1976). Esse Ag foi estocado em tubos Eppendorf a -20°C até o uso.

3.5.3. Titulação dos antígenos

Isoladamente, para cada Ag produzido, microplacas de poliestireno (HEMOBAG) foram revestidas com diluições de Ag em tampão de revestimento (tampão carbonato 0,5 M pH 9,6) contendo 1.000, 500, 250 e 100 ng de proteína vírica. Os soros con-

troles (positivo e negativo) foram diluídos 1:100 e 1:200 em PBS 0,1 M pH 7,6. O conjugado desenvolvido (Ítem 3.6) foi diluído de acordo com o título ótimo determinado (2.000) e o teste realizado como descrito no Ítem 3.7. A densidade ótica (DO) foi determinada em espectrofotômetro a um comprimento de onda de 492 nm (MULTISCAN).

3.6. Produção do conjugado

3.6.1. Produção do conjugado

O "pool" de soros de coelhos anti-gamaglobulina de galinha foi obtido conforme descrito no Ítem 3.4.1. A fração gamaglobulina dos soros de coelhos foi purificada de acordo com HERBERT (1974a), através da técnica de precipitação com sulfato de amônia. A concentração protéica final foi de 11,68 mg/ml. A IgG de parte dessa fração concentrada de gamaglobulina 3,5 ml, foi purificada através da passagem em coluna (de proteína-A-Sepharose C1-4B da PHARMACIA), conforme MARQUARDT et al (1980). Nessa passagem, a liberação da IgG se deu após exaustiva lavagem com PBS seguida de aplicação da solução eluidora (Tampão glicina 0,2 M pH 2,8-SIGMA). Após passagem na coluna, a solução tampão glicina mais IgG foi neutralizada com solução NaOH 1 N de forma a se obter pH final 4,5. A IgG foi concentrada através de uma única precipitação com sulfato de amônia (iguais volumes de solução sulfato de amônia 50% e da solução contendo IgG), por duas vezes foram lavadas. O "pelet", após centrifugação (10.000 rpm a 4°C durante 15 minutos), foi reconstituído em 1,5 ml de salina 0,15 M e dializado, contra a mesma, durante 72 horas. A determinação protéica (3,3 mg de IgG/ml) foi feita pelo método de BRADFORD (1976).

No processo de conjugação da IgG com a enzima peroxidase (Tipo VI SIGMA), utilizou-se a técnica descrita por AVRAMEAS & TERNYCK (1971). Resumidamente, dissolveram-se 10 mg de peroxidase em 200 µl de PBS 0,1 M pH 6,8 contendo 1,25% (V/V)

de glutaraldeído (MERCK). Em seguida, cinco mg de IgG, diluídas em tampão carbonato 0,5 M pH 9,6, foram misturadas à solução de peroxidase. Deixou-se a mistura sob agitação magnética a 4°C durante 24 horas. Em seguida, foi adicionada uma solução de lisina 1 M (SIGMA) e a mistura foi incubada por duas horas à temperatura ambiente (TA). O conjugado foi misturado com glic_{er}ina tamponada em PBS 0,1 M pH 7,6 em partes iguais e aliquotado em tubos Eppendorf, os quais foram armazenados a -20°C.

3.6.2. Titulação do conjugado

Visando obter a diluição para trabalho, microplacas de poliestireno (HEMOBAG) foram revestidas com 100 µl com diluições contendo 1.000, 500, 250 e 100 ng de gamaglobulina de galinha em tampão carbonato-bicarbonato 0,1 M, pH 9,6. As placas foram incubadas em câmara úmida à TA de 4°C durante uma noite. No dia seguinte, a placa foi lavada duas vezes com solução de lavagem do ELISA (SLE) Salina-Tween 20, 0,05% e feito o bloqueio com 150 µl de caseína 2% por pocinho durante um período de 30 minutos. Após lavagem das placas, foram colocados 100 µl de diferentes diluições do conjugado (1:100; 1:200; 1:500; 1:700; 1:800; 1:1000; 1:2000; 1:2500 e 1:3000) e as placas foram incubadas 45 minutos à TA. Foi feita a lavagem da placa com SLE e adicionados 100 µl por pocinho da solução do substrato [tampão citrato pH 5,0, 20 mg por cento de ortofenilenodiamine (OPD) e 0,012% de peróxido de hidrogênio (H₂O₂)] e incubados por 15 minutos em TA na obscuridade. A reação foi interrompida com 50 µl de solução H₂SO₄ 4N em cada pocinho. Foi determinada a DO em espectrofotômetro a 492 nm.

3.7. Teste de ELISA indireto para o VDG

Neste trabalho, esse teste foi denominado ELISA-B. As microplacas (HEMOBAG) foram adsorvidas com 100 µl de Ag de VDG (500 ng de proteína) diluído em tampão carbonato a 4°C por

uma noite e, em seguida, foram lavadas com SLE. Receberam depois 150 μ l de solução de bloqueio (caseína 2%) e foram incubadas durante 30 minutos à TA. As microplacas adsorvidas com o Ag VDG, foram lavadas e receberam 100 μ l por pocinho do soro teste diluído em tampão de incubação (PBS-tween 0,05%). Após 45 minutos de incubação, foram novamente lavadas com SLE. Em seguida, foram adicionados 100 μ l por pocinho de conjugado na diluição conveniente (1:2000) e as placas foram incubadas por 45 minutos à TA. Após a incubação, foram lavadas com SLE e adicionados 100 μ l por pocinho de solução de substrato. A leitura foi determinada conforme descrito no item 5.3.

3.8. Kit de ELISA comercial importado (AGRITEK) para o VDG

Neste trabalho, esse teste foi denominado ELISA-A. Foram fornecidos os seguintes reagentes: placas de 96 pocinhos com Ag adsorvido, conjugado peroxidase anticorpo de cabra anti-galinha diluído em tampão TRIS, controle positivo diluído em tampão, controle negativo também diluído em tampão, tampão de diluente da amostra, tabletes de OPD e tampão citrato para diluição do OPD. A técnica foi executada de acordo com as recomendações e os reagentes fornecidos pelo fabricante AGRITEK/USA-comercializado pela EMBRABIO.

3.9. Microtécnica de soroneutralização para o VDG

A preparação de CEF para o VDG foi realizada conforme descrito no item 3.2. A execução da microtécnica de soroneutralização (SN) foi conduzida de acordo com MARQUARDT et al (1980). Em placas de 96 pocinhos (PETECIL) foi feita a diluição dos soros de 1:10 e de 1:280 (diluição em base 2) e o volume ajustado para 50 μ l por pocinho. Após a diluição, foram adicionados 50 μ l contendo 100 T_{ICD}₅₀ amostra Bursine (sub-item 3.2.) por pocinho exceto no controle de células e as placas in

cubadas a 37°C durante 30 minutos. Em seguida, a mistura sorovírus (50 µl) foi transferida para monocamadas CEF e as placas incubadas a TA por 60 minutos. Após a incubação, a mistura sorovírus foi eliminada e adicionado meio 199. As placas foram incubadas em estufa a 37°C com 5% de CO₂. A leitura foi realizada após 72 horas e foi usado o critério descrito por WEISMAN & HITCHNER (1978).

3.10. Testes sorológicos

Foram testadas 312 amostras de soro de frango de corte, conforme descrito no item 1 para os testes de ELISA-B e AGP. Dessas, 171 foram testadas em SN e 243 no teste de ELISA-A. Na TAB. 5 são apresentados apenas os resultados do ELISA-B comparados com 243 soros analisados no ELISA-A.

3.11. Análise dos dados

Os resultados foram comparados com respeito a sua positividade e a análise pelo χ^2 foi usada para determinar o nível de significância entre os testes (HOEL, 1981).



4. RESULTADOS

4.1. Produção do "Kit" de ELISA para VDG

4.1.1. Antígenos produzidos

4.1.1.1. Amostra LUKERT

4.1.1.1.1. Concentração por centrifugação

De um litro de suspensão vírica de sobrenadante celular infectado com VDG, obteve-se 1,0 ml de Ag com concentração protéica de 200 µg/ml.

4.1.1.1.2. Concentração por ultrafiltração

A partir de um litro da mesma suspensão vírica descrita anteriormente, obteve-se 1,0 ml de Ag com a concentração protéica de 2,96 mg/ml.

4.1.1.2. Amostra BH-83

A partir de dez BF infectadas, obtiveram-se 500 µl de Ag com uma concentração protéica de 1,16 mg/ml.

4.1.1.3. Seleção do Ag apropriado do "Kit" de ELISA produzido (ELISA-B)

Para os três Ag obtidos, individualmente, foi realizada a adsorção em microplacas de 96 pocinhos para testar a eficácia do Ag, usando várias diluições. Os testes com os Ag preparados com a amostra LUKERT apresentaram resultados insatisfatórios, dando uma reação incolor, enquanto que o Ag preparado com a amostra BH-83 (AG BH-83) apresentou resultados satisfatórios que estão discriminados na TAB. 1.

A concentração de 100 ng de Ag BH-83 resultou em uma diferença de DO entre o positivo e negativo de 410 na diluição de 1:100 do soro e 494 na de 1:200. Já com a concentração de 500 ng de proteína antigênica foram obtidas diferenças de 527 e 423, nas diluições de soro 1:100 e 1:200, respectivamente. À medida que a concentração diminuiu, os resultados das diferenças entre positivo e negativo foram ficando mais próximas, chegando a resultados irrelevantes. Com base nesses resultados, determinou-se que a concentração de uso (trabalho) do Ag seria 500 ng de proteína e os soros seriam diluídos em 1:100, visto que a diluição de 1:200 não apresentou diferenças significativas entre os positivos e negativos, podendo ser evidenciado através da observação do GRÁF. 1.

4.2. Conjugado

Cinco mg de IgG de coelho anti-galinha conjugada com 10 mg de peroxidase resultaram em 800 µl de conjugado, o qual foi titulado empregando-se de gamaglobulina de galinha em fase sólida, nas concentrações de 500, 250 e 100 ng de proteína com várias diluições do conjugado variando de 1:100, 1:200, 1:500, 1:700, 1:800, 1:1000, 1:1600, 1:2000 e 1:2500. A leitura em espectrofotômetro com DO 492 nm foi 2000 nas diluições de 1:100 até 1:1600 e só foi possível realizar leituras nas últimas diluições (1:2000 e 1:2500). Esses dados estão apresentados na

TAB. 2.

4.3. Produção de imunesoros

4.3.1. Soro de coelho anti-gamaglobulina de galinha

A partir de 50 ml de soro de coelho anti-gamaglobulina de galinha, foi obtida uma solução concentrada de imunoglobulinas (11,68 mg/ml). De 3,5 ml dessa solução concentrada, foram obtidas 3,3 mg/ml de IgG após passagem em coluna de proteína A - Sepharose (SIGMA).

4.3.2. Soro de galinha positivo para VDG

Galinhas SPF de 12 semanas de idade criadas em isoladores foram infectadas por via oral com 0,2 ml da amostra BH-83 e após 40 dias foram submetidas a sangria total por punção cardíaca obtendo-se uma média de 50 ml por galinha.

4.3.3. Soro de galinha negativo para o VDG

Galinhas com a mesma idade, padrão de qualidade e procedência identificadas no item 3.2 foram submetidas a sangria total, com um rendimento médio de 50 ml de soro por galinha.

Todos os soros obtidos, conforme sub-ítem 3.1, 3.2 e 3.3., foram testados por AGP. Nos soros negativos, como esperado, não foi observada nenhuma linha de precipitação e os soros positivos formaram fortes linhas nas diluições de 1:10, 1:20, 1:40 e 1:80. Foram aliqüotados e armazenados a -20°C até subsequente uso nos testes de SN, ELISA e AGP.

4.4. Microtécnica de soroneutralização (SN)

Dos 171 soros de frango de corte pesquisados, procedentes de 14 diferentes granjas, 84 foram positivos apresen-

tando títulos $\geq 10^2$ e 87 negativos cujos títulos foram de $\leq 10^1$, conforme apresentado na TAB. 3.

4.5. Testes sorológicos

Foram utilizadas 312 amostras de soro de frango de corte para AGP e ELISA. Dessas amostras apenas 171 foram testadas para SN por motivos variados (contaminação bacteriana e soros tóxicos). Os resultados acham-se discriminados na TAB. 4.

Também foi realizada a comparação dos resultados de 243 soros de frango de corte processados pelo "Kit" de ELISA comercial importado (AGRITEK), denominado ELISA-A, e pelo teste de ELISA indireto para o VDG desenvolvido, denominado de ELISA B. Os resultados obtidos foram muito próximos, ou seja, 111 positivos para o ELISA-A e 110 para o ELISA-B. De forma semelhante, ocorreram 132 resultados negativos para o ELISA-A e 133 para o ELISA-B, conforme discriminado na TAB. 5.

As análises pelo teste χ^2 entre AGP, SN, ELISA-B e ELISA-A, foram discriminadas nas TAB. 6, 7, 8 e 9.

TABELA 1 - Diferentes concentrações de antígeno BH-83 frente a diluições de soros controles positivo e negativo

ng de pro- teína	Médias das leituras em DO 492 nm				Diferenças entre o positivo e o negativo	
	Soro controle positivo		Soro controle negativo		1:100	1:200
	1:100	1:200	1:100	1:200		
1000	1,207	1,216	0,797	0,722	0,410	0,494
500	1,037	0,863	0,510	0,440	0,527	0,423
250	0,443	0,417	0,280	0,372	0,163	0,045
100	0,252	0,358	0,199	0,295	0,053	0,063

TABELA 2 - Titulação de IgG de coelho anti-galinha conjugado com peroxidase

Diluições do conjugado	Média das DO 492 nm		
	Concentrações de gamaglobulina (ng)		
	500	250	100
1:2000	0,860	0,653	0,432
1:2500	0,680	0,645	0,491

TABELA 3 - Titulação de anticorpos anti-VDG de frangos de corte procedentes das regiões do Alto São Francisco e Zona Metalúrgica do Estado de Minas Gerais, determinados pelo teste soroneutralização

Denominação da granja	Positivos		Negativos		Total de soros
	Títulos $\geq 10^2$		Títulos $\leq 10^1$		
D	8		5		13
E	17		0		17
F	6		11		17
G	2		12		14
H	9		0		9
I	7		12		19
J	2		6		8
L	11		1		12
M	1		7		8
O	0		10		10
P	0		7		7
Q	7		6		13
R	3		1		4
S	11		9		20
Total	84		87		171

TABELA 4 - Resultados dos testes sorológicos de AGP, ELISA-B E SN para anticorpos anti-VDG em soros de frangos de corte das regiões do Alto São Francisco e Zona Metalúrgica do Estado de Minas Gerais

Denominação da granja	T i p o d e t e s t e					
	A G P		ELISA-B*		S N **	
	+	-	+	-	+	-
A	0	20	6	14	-	-
B	0	19	7	12	-	-
C	0	15	13	2	-	-
D	18	0	18	0	8	5
E	19	0	19	0	17	0
F	18	0	18	0	6	11
G	18	0	18	0	2	12
H	3	6	9	0	9	0
I	19	0	19	0	7	12
J	20	0	20	0	2	6
L	0	20	20	0	11	1
M	0	19	19	0	1	7
N	0	8	7	1	-	-
O	0	15	15	0	0	10
P	0	8	7	1	0	7
Q	20	0	15	5	7	6
R	10	10	15	5	3	1
S	7	13	13	7	11	9
T	0	7	7	0	-	-
Sub total	152	160	265	47	84	87
Total	312		312		171	

AGP = Precipitação em gel de agarose.

ELISA-B = Ensaio imunoenzimático com "Kit" produzido.

SN = Teste de soroneutralização.

* = Considerou-se positivo DO $\geq 0,400$.

** = Considerou-se positivo títulos $\geq 10^2$.



TABELA 5 - Anticorpos anti-VDG de soros de frangos de corte determinados pelo ELISA-A e ELISA-B, procedentes das regiões do Alto São Francisco e Zona Metalúrgica do Estado de Minas Gerais

Denominação da granja	T i p o d e "K i t"			
	ELISA-A		ELISA-B	
	+	-	+	-
A	17	0	13	4
B	12	0	12	0
C	12	0	12	0
D	0	18	0	18
E	0	19	3	16
F	3	14	0	17
G	8	3	2	9
H	0	19	3	16
I	0	20	0	20
J	18	0	5	13
L	11	4	1	14
M	7	0	6	1
N	4	15	18	1
O	4	15	15	4
P	15	5	20	0
Sub total	111	132	110	133
Total	243		243	

ELISA-A = ELISA comercial Agriteck.

ELISA-B = ELISA ensaio imunoenzimático com "Kit" produzido.

TABELA 6 - Comparação entre os resultados obtidos no AGP, ELISA-B e SN pelos testes de χ^2 em soros de frangos de corte das regiões do Alto São Francisco e Zona Metalúrgica do Estado de Minas Gerais

T e s t e	Observado			E s p e r a d o		
	+	-	Total	+	-	Total
AGP	152	160	312	196,7	115,4	312
ELISA-B	265	47	312	196,7	115,4	312
SN	84	87	171	107,7	63,2	171
Total	501	294	795	501	291	795

χ^2 = 10,90 com $P < 0,05$.

AGP = Precipitação em gel de agarose.

ELISA-B = Ensaio imunoenzimático com "Kit" produzido.

SN = Teste de soroneutralização.

TABELA 7 - Comparação da pesquisa de anticorpos anti-VDG pelos testes de AGP e ELISA-B obtidas pelo método do χ^2 em frangos de corte das regiões do alto São Francisco e Zona Metalúrgica do Estado de Minas Gerais

T e s t e	Observado			E s p e r a d o		
	+	-	Total	+	-	Total
AGP	152	160	312	208,5	103,5	312
ELISA-B	265	47	312	208,5	103,5	312
Total	417	207	624	417	207	624

χ^2 = 7,87 com $P < 0,05$.

AGP = Precipitação em gel de agarose.

ELISA-B = Ensaio imunoenzimático com "Kit" produzido.

TABELA 8 - Comparação da pesquisa de anticorpos anti-VDG pelos testes AGP e SN obtidos pelo teste de χ^2 em frangos de corte das regiões do Alto São Francisco e Zona Metalúrgica do Estado de Minas Gerais

T e s t e	Observado			E s p e r a d o		
	+	-	Total	+	-	Total
AGP	152	160	312	152,6	159,6	312
SN	84	87	171	83,6	87,4	171
Total	236	247	483	236	247	483

$\chi^2 = 5,99$ com $P < 0,05$.

AGP = Precipitação em gel de agarose.

SN = Teste de soroneutralização.

TABELA 9 - Comparação da pesquisa de anticorpos anti-VDG pelos testes de soroneutralização e ELISA-B obtidos pelo teste de χ^2

T e s t e	Observado			E s p e r a d o		
	+	-	Total	+	-	Total
SN	84	87	171	123,6	47,4	171
ELISA-B	265	47	312	225,4	86,6	312
Total	349	134	483	349	134	483

$\chi^2 = 7,87$ com $P < 0,05$.



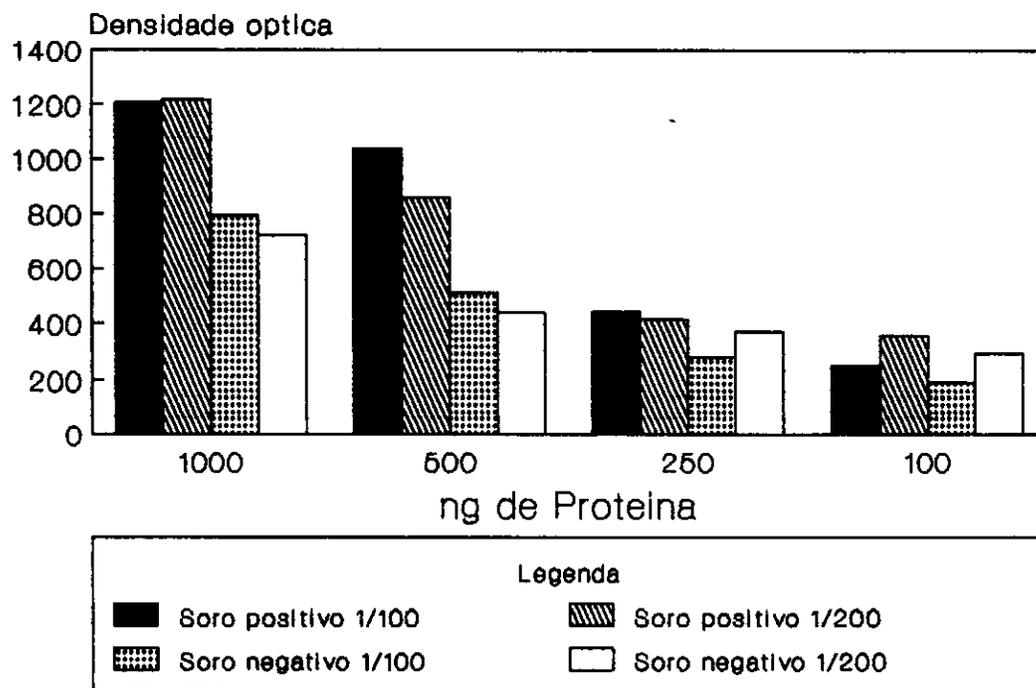


GRÁFICO 1 - Titulação do antígeno BH-83 com duas diferentes diluições de soros padrões positivos e negativos de galinhas SPF.

5. DISCUSSÃO

Os resultados obtidos nessa pesquisa sugerem que o ELISA é sem dúvida uma metodologia simples, rápida e mais barata do que os testes de AGP e SN para se pesquisar anticorpos para VDG. É sabido que apenas o radioimunoensaio é comparável em termos de sensibilidade ao ELISA, entretanto, são os reagentes do ELISA são seguros e duráveis (VAN WEEMEN & SHURS, 1977). A equipe do laboratório de Virologia Comparada tem mais de uma década de experiência com esse tipo de teste e sabe que, embora sem nenhuma complicação, a etapa da conjugação com peroxidase, é a mais complexa do processo. Uma conjugação defeituosa pode levar a uma perda de sensibilidade e estabilidade do conjugado, conforme a experiência que se adquiriu.

Os fatores que são críticos e dos quais irá depender a atuação do ELISA são a pureza do Ag, principalmente no caso do Ag desenvolvido a partir de BF, a temperatura e o tempo da reação, o título do conjugado, o substrato, o tempo e a forma de lavagem das placas de ELISA entre as diferentes etapas do teste. A preparação do Ag (VDG) é a etapa central e de maior importância na precisão do ELISA. Muitos autores, entre os quais se pode citar GILMAN & DOGHERTY (1977) e SAUNDER et al (1977), comprovaram que os resultados variáveis no ELISA se devem a problemas com purificação do Ag. Reações falso-positivas podem ser devido à presença de fatores séricos não especí-

ficos que se ligam à preparação antigênica e que não são eliminados quando o processo de purificação é efetuado de maneira descuidada. Dever-se-ia ter investido muito mais na purificação do Ag. Agora, se sabe, por exemplo, que teria sido melhorada a recuperação do vírus se o tempo de centrifugação em colchão de sacarose fosse aumentado para duas horas (NICK et al, 1976), dentro da metodologia empregada.

Devido à premência de tempo e recursos não se investigou o insucesso da produção de Ag em cultivos celulares, já que se conseguiram os objetivos ao se empregar BF lesadas de galinhas experimentalmente infectadas com VDG (amostra BH-83). O genoma do VDG consiste de duas peças de aproximadamente mesmo peso molecular (2×10^6 daltons). Se essas duas peças representam um artefato de preparação, isso ainda não foi demonstrado. Já se mostrou que o segmento maior de RNA está preferencialmente associado com partículas que se sedimentam mais rápido em gradiente de sacarose. No presente trabalho (dados não apresentados), duas bandas sempre foram detectadas nos gradientes de sacarose. Não se pode afirmar mas é possível que ambas as bandas são necessárias para se obter infecciosidade. A passagem do VDG (amostra LUKERT) em cultivos celulares foi mal sucedida, possivelmente, devido a partículas defectivas interferentes. Não foi pesquisado o que de fato aconteceu para prevalecer apenas partículas defectivas mas não se pode descartar que a amostra tenha sido passada em alta multiplicidade de infecção. Houve tamanha predominância de possíveis partículas interferentes que nenhuma banda foi recuperada em gradiente de sacarose de material processado a partir de cultivos celulares (dados não apresentados).

Não se tentou infectar cultivos celulares e determinar a infecciosidade da banda que migra mais rápido com a outra banda. Pode-se especular, inclusive, que poderia existir uma banda que contivesse a maioria das partículas infecciosas e que conteria uma molécula de RNA maior que migrasse ainda mais rápido no gradiente de sacarose mas em virtude de representar

uma minoria de partículas se encontraria abaixo do limite de detectabilidade.

Como os resultados de produção em CEF e VERO foram desapontadores não se traçou uma curva de produção da amostra LUKERT em cultivo de tecido. O encontrado já foi bastante relatado e, como se sugere na literatura, a diminuição ou drástica redução de partículas defectivas é conseguida quando se passa o VDG em células linfóides (MULLER & BECHT, 1982). Há autores que tem conseguido a separação das partículas incompletas das infecciosas com auxílio de centrifugações repetidas em gradiente de cloreto de césio (JACKWOOD et al, 1984).

Com as dificuldades encontradas na produção do Ag em CEF restou a alternativa de se purificar o Ag a partir de BF de aves experimentalmente expostas ao VDG (amostra BH-83). O desafio dessa metodologia foi conseguir preparações suficientemente puras com um rendimento razoável, conforme verificadas por PATTISON et al (1975) e DUBOS et al (1979). A centrifugação através de um colchão de sacarose a 30% (p/p) pareceu ter a vantagem de condensar e limpar o Ag vírico que foi subsequentemente, aplicado ao gradiente de sacarose. Essa centrifugação, através do gradiente de sacarose, pareceu ser essencial para a remoção de material celular e outros contaminantes da BF, já que tentativas preliminares de se montar um ELISA com VDG obtido da centrifugação através do colchão de sacarose levou a resultados desastrosos (dados não apresentados). Uma avaliação prévia do Ag através da análise em SDS-PAGE teria sido de grande valia. A experiência atual do Grupo de Virologia Comparada é de que todos os lotes de Ag de ELISA devem ter suas proteínas contaminantes determinadas e avaliadas. Esse é um passo fundamental para que se estabeleçam os critérios de avaliação do estado de real pureza do Ag e que tipo de material ainda persiste como contaminante. Como controle de Ag, obviamente se processa um Ag negativo, que é obtido de bursas não infectadas. O emprego de tal tipo de Ag controle é fundamental na determinação da especificidade e em várias etapas da padronização. Nes-

te projeto, o qual ainda está em sua primeira fase, não se usou o controle do Ag por SDS-PAGE e não se empregou um Ag controle que também poderia ser chamado de Ag negativo. Além do mais, o Ag negativo seria de extrema utilidade na avaliação do conjugado, no estudo dos casos de inespecificidade encontradas e do "background" encontrado especialmente com soros poucos diluídos e nos soros negativos. Esses dados com o ELISA desenvolvido (ELISA-B) certamente mostraram problemas que deverão ser atacados para se melhorar o teste. Sem dúvida alguma, ainda se tem que melhorar o Ag. A titulação do Ag mostrou isso claramente (TAB. 1). A sensibilização das placas com 500 ng de Ag, como o encontrado na titulação, é uma indicação disso. Na experiência do Grupo de Virologia Comparada, com outros Ag víricos como rotavírus e herpesvírus, a sensibilização pode ser feita com bons resultados com 25 a 50 ng de Ag por pocinho (dados não apresentados). Pode-se também inferir, por observação TAB. 1, que o revestimento com tão alta dosagem de Ag foi necessária devido a presença de contaminantes protéicos de bursa ainda presentes no Ag. Esse problema só pode ser resolvido melhorando o Ag. Para tal, deve-se definir quais os contaminantes da BF que ainda estão presentes, fazer um segundo bandeamento do Ag em gradiente de cloreto de césio, preparar o controle ou Ag negativo e definir a razão da inespecificidade através do teste de Western-blot. Em muitos casos, quando uma refinada purificação do Ag é extremamente cara, o problema pode ser resolvido pelo desenvolvimento do ELISA de bloqueio. No ELISA de bloqueio, o ponto crítico muda. Deixa de ser o Ag que passa a não ser mais imobilizado na fase sólida. No ELISA de bloqueio, vai na fase sólida um anticorpo (Ac), geralmente preparado em camundongo, contra o vírus. Esse Ac usado na fase sólida tem que ser preparado com Ag víricos altamente purificados a fim de eliminar toda a inespecificidade do teste. Os dados preliminares obtidos até o presente no desenvolvimento do ELISA foram importantes a fim de levantar as peculiaridades do teste em aves. O conjugado preparado, o sistema de bloqueio e o substrato empregado foram usados

sem problema. A lenta alteração de cor após a interrupção de reação com H_2SO_4 4N é particularmente sem problemas porque ocorre tanto nos controles, como nos testes positivos e negativos. A diluição ótima do conjugado, como foi determinado, é importante para diminuir ou eliminar a ligação inespecífica do conjugado que pode mascarar a atividade específica do teste ou levar a resultados falso-negativos. Todos os testes foram repetidos a fim de se estabelecer a validade e reprodutibilidade de cada resultado obtido. A importância desse procedimento é que pode haver população antigênica diferente absorvido em diferentes partidas de microplacas. Uma precisão exata é difícil devido à variabilidade de absorção dos reagentes nas placas de poliestireno. Controles positivo e negativo foram incluídos em cada placa a fim de melhor avaliar a variabilidade de absorção dos reagentes. Infelizmente, não foi incluído Ag de BF normal. Em cada placa, também foram incluídos outros controles para a detecção de problemas com reagentes, tais como um controle onde o PBS substitua o soro, controle de substrato e controle do conjugado. A correlação entre o teste de ELISA-B, AGP e o SN foi pesquisada nesse estudo pelo teste de χ^2 , e foi significativa devido ter alcançado valor de 10,90 ($P < 0,05$) conforme apresentado na TAB. 6. Esses dados são concordantes com outros autores que já tinham encontrado resultado semelhantes (NICHOLAS et al, 1985 e CASTELLÕ et al, 1987). Esses autores encontraram uma correlação positiva de 0,44 ($P < 0,01$) quando compararam as técnicas de SN e ELISA para detecção de Ac anti-VDG. MEULEMANS et al (1987) desenvolveram um ELISA para medir Ac de galinhas imunizadas com vacinas de DG vivas e oleosas. No presente trabalho, para avaliação do ELISA-B, os soros dos frangos testados foram provenientes de granjas que não vacinavam suas aves contra VDG. Os níveis de Ac encontrados possivelmente refletiram a infecção natural ao vírus em estudo, servindo também para inferir a situação de prevalência do VDG nas regiões do Alto São Francisco e Zona Metalúrgica do estado de Minas Gerais. Os resultados encontrados somam-se àqueles obtidos em outro le

vantamento sorológico, realizado através de AGP (LEVANTAMENTO, 1988).

A análise comparativa dos dados também foi realizada correlacionando os testes um com o outro. ELISA-B foi comparado com AGP e depois com SN. O AGP por sua vez também foi comparado com SN.

Comparando-se o ELISA-B com AGP, observou-se que ocorreram diferenças significativas nas amostras testadas porque o χ^2 foi igual a 7,87 ($P < 0,05$), conforme discriminado na TAB. 7. Em taxas percentuais, o ELISA apresentou 36,2% a mais de positivos além dos 48,72% já estipulados pelo AGP. CASTELLÓ et al (1987), no mesmo tipo de comparação, encontraram resultados falsos positivos em menor quantidade e também resultados falsos negativos. Através de comparações individuais de soros de galinhas, o ELISA foi de 20 a 25.000 vezes mais sensível que o teste de AGP (MARQUARDT et al, 1980).

As comparações feitas pelo χ^2 entre ELISA-B e a SN foram iguais a 7,87 sendo, portanto, significativa a diferença ($P < 0,05$), conforme discriminado na TAB. 9. Os resultados foram concordantes aos de NICHOLAS et al (1985) que ao estabelecerem comparações entre o ELISA e SN, concluíram ser a SN mais variável e menos reproduzível que o ELISA. Outros autores (CASTELLÓ et al, 1987 e MEULEMANS et al, 1987), também encontraram o mesmo resultados embora mais favoráveis à utilização de várias diluições do ELISA usando uma curva de regressão linear para correlacionar melhor as duas técnicas já citadas. MEULEMANS et al (1987) conseguiram resultados que demonstraram ser o título de 400 no ELISA correspondente a 10 na SN.

Quando as comparações foram feitas entre os testes de AGP e SN, o χ^2 foi igual a 5,99, conforme discriminado na TAB. 8, e foi interpretado como um resultado não significativo. Acreditou tratar-se de diferenças de especificidades antigênicas detectadas pelos dois testes. HOWIE & THORSEN (1981) fizeram alusão a uma situação semelhante, justificando que em alguns animais a detecção de Ac pelo ELISA não coincidia com a

fase de detecção de Ac pela SN. Na literatura consultada existem dados discordantes como os apresentados por WEISMAN & HITCHNER (1978) que estabeleceram comparações entre AGP e SN em quatro diferentes situações e obtiveram resultados variados, tais como igual número de positivos nos dois testes e resultados negativos no AGP que foram positivos na SN, corroborando com DOMINGO et al (1985).

Ao tentar se estabelecer o mesmo tipo de comparação através de χ^2 entre o ELISA-A e o ELISA-B, isto não foi possível, visto que o somatório dos casos positivos e negativos entre ambos os testes foram muito próximos. No ELISA-A foram realizados 243 testes com 111 positivos e 132 negativos enquanto o ELISA-B, dos 243 testes, 110 foram positivos e 133 negativos. Não foi necessário realizar a análise estatística devido a identidade dos resultados. Consultaram-se pesquisadores com maior experiência estatística os quais foram unânimes em afirmar a impossibilidade de se fazer uma análise estatística. Embora haja semelhança nos testes (ELISA-A e ELISA-B), detectaram-se falhas no ELISA-B com algumas discrepâncias de resultados (TAB. 5) como no caso da Granja G onde o ELISA-A detectou oito soros positivos e três negativos e os mesmos soros testados pelo ELISA-B apresentaram apenas dois resultados positivos enquanto que os outros nove foram negativos. Na Granja J, foram obtidos 18 soros positivos e nenhum negativo com o ELISA-A e cinco soros positivos e 13 negativos para o ELISA-B, o mesmo ocorrendo na Granja L. Já nas granjas denominadas N e O o número de positivos foi de quatro para o ELISA-A enquanto que no ELISA-B este número elevou-se a 18 e 15, respectivamente, sugerindo a existência de falsos positivos e retratando algumas falhas. Há, portanto, necessidade de se acertar e melhorar o ELISA-B, principalmente no tocante à purificação de Ag ou da utilização de outra metodologia (ELISA de bloqueio com Ac-anti-VDG na fase sólida).



6. CONCLUSÕES

As conclusões decorrentes dos resultados obtidos, nas condições em que o trabalho foi realizado, podem ser sintetizadas do seguinte modo:

. o "Kit" de ELISA indireto para VDG produzido, correspondeu às expectativas de produção local, necessitando de mo dificações apenas no que diz respeito à etapa de purificação do Ag;

. houve diferenças significativas nos resultados en contrados, quando comparou-se os três tipos de diagnósticos (AGP, SN e ELISA-B) empregados na detecção de Ac anti-VDG em frangos de corte;

. com relação à comparação do ELISA-A e ELISA-B, houve identidade nos resultados, existindo alguns falsos positivos e menor número ainda de falsos negativos, o que com certeza serão eliminados quando se usar maior precisão na produção do Ag.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ATIVIDADE da rede LANARA na área de diagnósticos de doenças dos animais - Brasil, 1980. *Inf. LANARA*, v.2, n.10, p. 7, 1980.
 2. AVRAMEAS, S., TERNICK, T. Communication to the editors. *Immunochemistry*, v.8, n.3., p.1175, 1971.
 3. BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Bioch.*, v.72, n.1, p. 248-54, 1976.
 4. BRIGGS, D.J., WHITFILL, C.E., SKEELES, J.K. et al. Application of the positive/negative ratio method of analysis to quantitate antibody responses to infectious bursal disease virus using a commercially available ELISA-Research Note. *Avian Dis.*, v.30, n.1, p.216-8, 1986.
 5. BROWN, F. The classification and nomenclature of viruses: summary of results of meeting of International Committee on Taxonomy of Viruses in Sendai, september 1984. *Intervirology*, v.25, n.3, p.141-3, 1986.
 6. CASTELLÓ, L.A.M., MARTINEZ, L.B., HERNÁNDEZ, R. Comparación de las pruebas de precipitación in agar, neutralization viral e inmunoadsorción enzimática en la determinación de
-

- anticuerpos contra la infeccion de la bolsa de Fabrício. *Vet. Mex.*, v.18, n.2, p.317-23, 1987.
7. CHO, Y., EDGARD, S.A. Characterization of infectious bursal agent. *Poult. Sci.*, v.48, n.6, p.2102-9, 1969.
 8. COSGROVE, A.S. An apparently new disease of chicken avian nephrosis. *Avian Dis.*, v.6, n.3, p.385-9, 1962.
 9. DOENÇAS das aves-Brasil-1983. *Bol. Def. San. Anim.*, v.17, n.14, p.64-5, 1983.
 10. DOENÇAS das aves-Brasil-1984. *Bol. Def. San. Anim.*, v.18, n.1/4, p.64-8, 1984.
 11. DOMINGO, E., MARTINEZ-SALAS, E., SOBRINO, F. et al. The quasispécies (extremely heterogenous) nature of viral RNA, genome populations: biological relevance - a review. *Gene*, v.40, n.1, p.1-8, 1985.
 12. DUBOS, P., HILL, B.P., HALLET, R. et al. Biological and biophysical characterization of five animal viruses with bisegmented double-stranded RNA genomes. *J. Virol.*, v.32, n.2, p.593-605, 1979.
 13. ENGVALL, E., PERLMANN, P. Enzyme - Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA) quantitative of immunoglobulin G. *Immunochemistry*, v.8, n.2, p.871-4, 1971.
 14. GILMAN, S., DOGHERTY, J. Detection of antibodies specific for herpes simplex virus in human sera by the Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay. *J. Infect. Dis.*, v.136, suppl. n.2, p.s286-93, 1977.
 15. HERBERT, G.A. Ammonium sulphate fractionation of sera: mouse, hamster, guinea pig, monkey, chimpanzee, swine, chicken and cattle. *Appl. Microbiol.*, v.27, n.3, p.389-93, 1974a.
 16. HERBERT, W.J. Mineral-oil adjuvants and the immunization of laboratory animal. In: WEIR, D.M. ed. *Handbook of experimental immunology*. 2.ed. Oxford: Blackwell Scien-
-

- tific Publication, 1974b. v.3, appendix 2-3.
17. HIRAI, K., KATO, N., FUJIURA, A. et al. Further morphological characterization and structural proteins of infectious bursal disease virus. *J. Virol.*, v.32, n.1, p.323-8, 1979.
 18. HOEL, G.P. *Estatística elementar*, São Paulo: Atlas, 1981. Teste de χ^2 . p.430.
 19. HOWIE, R., THORSEN, J. An Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA) for infectious bursal disease virus. *Can. J. Com. Med.*, v.45, n.1, p.51-5, 1981.
 20. JACKWOOD, D.J., SAIF, Y.M., HUGHES, J.H. Nucleic acid and structural protein of infectious bursal disease virus isolates belonging to serotypes I and II. *Avian Dis.*, v.28, n.4, p.990-1006, 1984.
 21. LEVANTAMENTO sanitário em avicultura de corte nas regiões do Alto São Francisco e Zona Metalúrgica do Estado de Minas Gerais, 1985-1986. *Bol. Téc. EMATER/MG.*, v.9, n. 1, p.1-41, 1988.
 22. LUKERT, P.D.; HITCHNER, B.S. Gumboro disease. In: BARNEY, J.H., HOFSTAD, S.M.; CALNEK, W.B.J. et al. ed. *Diseases of poultry*, 4. ed. Ames, American Society Avian Pathologists, 1984. v.1, 1176p.
 23. MARQUARDT, W.W., JONHSON, R.B., ODENWALD, W.F. et al. An indirect Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA) for measuring antibodies in chicken infected with infectious bursal disease virus. *Avian Dis.*, v.24, n.2, p.375 - 85, 1980.
 24. MELENDEZ, L., GERHARD, G., SCHURIG, G. et al. *Virales de los animales empleando métodos Immuno-enzimáticos*, Buenos Aires, IICA, 1985. 47p. Curso para Veterinários Laboratoristas de Reparticiones Gubernamentales de Países da América Latina.
-

25. MEULEMANN, G., DECAESSTECKER, M., HALEN, P. et al. Comparation des tests ELISA et seroneutralization pour la recherche d' anticorps contre le virus de la maladie de Gumboro. Application pratiques du test ELISA (I). *Rec. Med. Vet.*, v.163, n.5, p.561-5, 1987.
 26. MULLER, H., BECHT, H. Biosynthesis of virus-specific proteins in cells infected with infectious bursal disease virus and their significance as structural elements for infectious virus and incomplete particles. *J. Virol.*, v. 44, n.1, p.384-92, 1982.
 27. NAKANO, M., PORTUGAL, M.A.S.C., SALIBA, A.M. et al. Ocorrência no Brasil de "Doença de Gumboro" diagnóstico anatomo patológico. Nota Prêvia. *Biológico*, v.38, n.2, p. 60-1, 1972.
 28. NICHOLAS, R.A.J., REED, N.E., WOOD, W.G. et al. Detection of antibodies against infectious bursal disease virus: a comparison of three serological methods. *Res. Vet. Sci.*, v.38, n.2, p.189-92, 1985.
 29. NICHOLAS, R.A.J., THORNTON, D.H. The use of the Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay in detecting antibodies to avian viruses: a review. *Vet. Bull.*, v.56, n.5, p.337-43, 1986.
 30. NICK, H., CURSIEFEN, D., BECHT, H. Structural and growth characteristics of infectious bursal disease virus. *J. Virol.*, v.18, n.1, p.227-34, 1976.
 31. OKOYE, A.O.J. Infectious Bursal disease of chickens. *Vet. Bull.*, v.54, n.6, p.425-36, 1984.
 32. OLIVEIRA, R.L., FREIRE, F.G.G., CAMPOS, E.J. et al. Doenças de aves diagnosticadas em dois laboratórios de Belo Horizonte entre 1975 e 1980. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE AVICULTURA, 7. 1981, Recife. *Anais*. Recife: União Brasileira de Avicultura, 1981. p.247-59.
-

33. PATTISON, M., ALEXANDER, D.J., HARKNESS, J.W. Purification and preliminary characterization of a pathogenic strain of infectious bursal disease virus. *Avian Pathol.*, v.4, n.3, p.171-87, 1975.
 34. PRODUÇÃO equilibrada. *Avic. Ind.*, v.79, n.946, p.16, 1988.
 35. ROMERO, C.H. *Manual de técnicas virológicas e sorológicas para o isolamento e identificação de vírus aviários e seus anticorpos*. Concórdia: EMBRAPA, Centro Nacional de Pesquisa de Suínos e Aves, 1986. não paginado.
 36. SAUKAS, T.N. *Caracterização de amostra de vírus da doença infecciosa bursal (doença de Gumboro) isolada no Brasil, Rio de Janeiro, UFRRJ, 1978. 88p. Tese (Mestre em Patologia Animal)*.
 37. SAUKAS, T.N., VASCONCELOS, A.P., VIEIRA, R.G. Prevalência da doença infecciosa bursal no Estado de Pernambuco. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE AVICULTURA, 7. 1981, Recife, *Anais*, Recife: União Brasileira de Avicultura, 1981. p.381-6.
 38. SAUNDER, G.C., CLINARD, E., BAOLETT, M. et al. Application of the indirect enzyme labeled antibody microtest for the detection and surveillance of animal diseases. *J. Infect. Dis.*, v.136, suppl. p.258-66, 1977.
 39. SILVA, J.M.L., HWANG, M.H., HIPOLITO, O. Detecção de anticorpos contra o vírus da doença de Gumboro. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE AVICULTURA, 7. 1981, Recife. *Anais*. Recife: União Brasileira de Avicultura, 1981. p.230.
 40. SLAGHT, S.S., YANG, T.J., VAN DER HEIDE, L. et al. An Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA) for detecting chicken anti-reovirus antibody at high sensitivity. *Avian Dis.*, v.22, n.4, p.802-5, 1978.
 41. SNYDER, D.B. Latest developments in the Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA). *Avian Dis.*, v.30, n.1. p.19-23, 1985.
-

42. VAN WEEMEN, B.K., SCHURS, R.S. "Enzyme immunoassay". *Clin. Chim. Acta.*, v.81, n.1, p.1-40, 1977.
 43. VOLLER, A., BIDWEEL, D., BARTLETT, A. Review Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay. In: LENNETE, E., SANDING, E.H., TRUANT, J.P. ed. *Manual of clinical immunology*. 2. ed. New York: American Society for Microbiology, 1985. p.359.
 44. WEISMAN, J., HITCHNER, S.B. Virus neutralization versus agar-gel precipitin test for detecting serological response to infectious bursal disease virus. *Avian Dis.*, v.22, n.4, p.598-603, 1978.
 45. WINTERFIELD, R.W. Immunity response to the infectious bursal agent. *Avian Dis.*, v.13, n.3, p.548-57, 1969.
 46. WYETH, P.J., CULLEN, G.A. Maternally derived antibody effect on susceptibility of chicken to infectious bursal disease. *Avian Pathol.*, v.5, n.4, p.253-60, 1976.
-