

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA



LIA TREPTOW COSWIG

**“METAPNEUMOVÍRUS AVIÁRIO: SUSCETIBILIDADE EM DIFERENTES SISTEMAS CELULARES E PRODUÇÃO DE ANTICORPOS MONOCLONAIS”**

Este exemplar corresponde à redação final  
da tese defendida pelo(a) candidato (a)  
Lia Treptow Coswig  
[Assinatura]  
Aprovada pela Comissão Julgadora.

Tese apresentada ao Instituto de Biologia para obtenção do Título de Doutor em Genética e Biologia Molecular, na área de Microbiologia.

Orientadora: Profa. Dra. Clarice Weis Arns

Co-Orientadora: Profa. Dra. Dagmar Ruth Stach-Machado

Campinas, 2008

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP**

<b>C829m</b>	<p>Coswig, Lia Treptow Metapneumovírus aviário: suscetibilidade em diferentes sistemas celulares e produção de anticorpos monoclonais / Lia Treptow Coswig. – Campinas, SP: [s.n.], 2008.</p> <p>Orientadoras: Clarice Weis Arns, Dagmar Ruth Stach-Machado. Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.</p> <p>1. Metapneumovírus aviário. 2. Anticorpos monoclonais. 3. Sistemas celulares. I. Arns, Clarice Weis. II. Stach-Machado, Dagmar Ruth. III. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. IV. Título.</p> <p>(rcdt/ib)</p>
--------------	---

**Título em inglês:** Avian metapneumovirus: susceptibility at different cell lines and production of monoclonal antibodies.

**Palavras-chave em inglês:** Avian metapneumovirus; Monoclonal antibodies; Cell lines.

**Área de concentração:** Microbiologia.

**Titulação:** Doutora em Genética e Biologia Molecular.

**Banca examinadora:** Clarice Weis Arns, Liana Maria Cardoso Verinaud, Marcelo Brocchi, Flávia Saldanha Kubrusly, Adolorata Aparecida Bianco Carvalho.

**Data da defesa:** 10/07/2008.

**Programa de Pós-Graduação:** Genética e Biologia Molecular.

Campinas, 10 de Julho de 2008.

**BANCA EXAMINADORA**

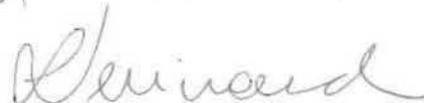
Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. CLARICE WEIS ARNS (Orientador)

  
Assinatura

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. ADOLORATA APARECIDA BIANCO  
CARVALHO

Assinatura  
  
Assinatura

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. FLÁVIA SALDANHA KUBRUSLY

  
Assinatura

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. LIANA MARIA CARDOSO VERINAUD

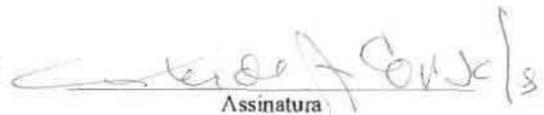
Assinatura

Prof. Dr. MARCELO BROCCHI

Assinatura

Prof. Dr. WANDERLEY DIAS DA SILVEIRA

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. CLEIDE ASCHENBRENNER CONSALES

  
Assinatura

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. ISABELA CRISTINA SIMONI

  
Assinatura

O presente trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Virologia Animal do Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Biologia da UNICAMP, Campinas, São Paulo.

## ÍNDICE

<b>Lista de Siglas e Abreviaturas.....</b>	<b>vii</b>
<b>Agradecimentos.....</b>	<b>ix</b>
<b>Resumo.....</b>	<b>xi</b>
<b>Abstract.....</b>	<b>xiii</b>
<b>1. Introdução</b>	<b>1</b>
1.1 Histórico	3
1.2 Agente Etiológico	5
1.3 Patogenia e Sinais Clínicos	10
1.4 Diagnóstico	14
1.5 Controle da infecção	21
<b>2. Objetivos</b>	<b>24</b>
<b>3. Material e Métodos</b>	<b>25</b>
3.1 Vírus	25
3.2 Culturas Celulares	26
3.2.1 Cultivo de Anel de Traquéia	26
3.2.2 Cultura primária de embrião de galinha	26
3.2.3 Linhagens celulares	28
3.2.3.1 Produção das amostras virais SHS-BR-121 e STG-SHS-1439 em CER	29
3.2.3.2 Suscetibilidade dos sistemas celulares as amostras virais SHS-BR-121 e STG-SHS-1439	30
3.3 Cinética viral	31
3.4 Titulação Viral em Célula	31
3.5. Teste de Imunofluorescência Indireta	32
3.6 Análise Estatística	33
3.7 Purificação Viral	34
3.8 Determinação de concentração proteica	35
3.9 Padronização do Teste de ELISA	35
<b>4. Resultados</b>	<b>37</b>
4.1 Inoculação das amostras virais SHS-BR-121 e STG-SHS-1439 em Anel de Traquéia	37
4.2 Produção das amostras SHS-BR-121 e STG-SHS-1439 em FEG	37
4.3 Produção das amostras SHS-BR-121 e STG-SHS-1439 em CER	41
4.4 Cinética Viral	45
4.5 Propagação do vírus em diferentes sistemas celulares	47
4.6 Purificação e titulação viral	51

<b>4.7 Padronização do ensaio enzimático (ELISA) para detecção de anticorpos no soro dos camundongos</b>	<b>52</b>
<b>5. Artigo</b>	<b>54</b>
<b>6. Discussão</b>	<b>66</b>
<b>7. Conclusões</b>	<b>79</b>
<b>8. Referências Bibliográficas</b>	<b>80</b>

## **Lista de Siglas e Abreviaturas**

AMPV (avian metapneumovirus): Metapneumovírus Aviário

BHK-21: baby hamster kidney

BRSV (bovine respiratory syncytial virus): vírus respiratório sincicial bovino

ECP: efeito citopático

ED: Equine dermis

ELISA (enzyme linked immuno sorbent assay): ensaio imunoenzimático

F (fusão): proteína de fusão

FEG: fibroblasto de embrião de galinha

G (attachment): glicoproteína

HEp-2: Human laryngeal carcinoma

HMPV (human metapneumovirus): Metapneumovírus humano

IF: Imunofluorescência

IFI: Imunofluorescência indireta

IP: Immunoperoxidase

L (large protein): polymerase

M (matriz): proteína matriz

Mabs (monoclonal antibodies): anticorpos monoclonais

MDBK: Madin-Darby bovine kidney

MMEE: meio mínimo essencial Eagle

N (nucleoprotein): nucleoproteína

P (phosphoprotein): fosfoproteína

PCR (polymerase chain reaction): reação em cadeia da polimerase

SCI: Síndrome da Cabeça Inchada

SFB: soro fetal bovino

SHS (swollen head syndrome): Síndrome da Cabeça Inchada

SN: Soroneutralização

SPF: "Specific pathogen free"

TOC (tracheal organ culture): cultivo de anel de traquéia

TRT (turkey rhinotracheitis): Rinotraqueíte dos perus

VBI: Vírus da Bronquite infecciosa das galinhas

Vero: African green monkey kidney

VDN: Vírus da doença de Newcastle

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, meu Salvador e Criador de todas as coisas, sempre presente em todos os momentos da minha vida.

A meus pais, Egon e Vera, o agradecimento mais que especial por tudo que fizeram de mim e por mim.

Ao Marco, o grande amor da minha vida, por todos os momentos de vitórias e lutas ao meu lado.

À Profa. Dra. Clarice Weis Arns, pela calorosa acolhida, amizade e apoio, e orientação no trabalho desenvolvido.

A Profa. Dra. Dagmar Ruth Stach-Machado, pela orientação e pela amizade sempre presente.

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro aos trabalhos desenvolvidos nesta tese.

Aos meus irmãos Bethânia, Mateus e Samuel e as minhas cunhadas e cunhado por serem tão presentes apesar da distância. Ao meu sobrinho Daniel por ser o “fofinho” da família.

Ao Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) pela permissão do uso de seus laboratórios para a realização deste trabalho.

Aos meus grandes amigos Joyce, Lica, Regina, Renata, Helena e Rodrigo por me ajudarem nos momentos difíceis e compartilharem dos momentos de alegria.

A minha grande amiga e quase uma irmã Maria Célia por todas as correrias e principalmente por tudo que me ensinou na escola da vida.

Aos funcionários Geneci Davi e José Raimundo pelo incentivo e auxílio na execução do projeto.

À Beatriz, Ariovaldo, Anna, Henrique e Iracema por terem sido minha família nos momentos de necessidade.

À minha amiga Juliana que tantas vezes foi mais que uma irmã.

A minha grande família de Campinas, que nunca me deixou sozinha, ocupando um lugar especial na minha vida.

Aos professores, funcionários e colegas dos cursos de Pós-Graduação de Campinas o meu muito obrigada por tudo que aprendi.

## RESUMO

O Metapneumovírus Aviário (AMPV), também denominado vírus da rinotraqueíte dos perus (TRT), é um vírus que acomete e causa infecção no trato aéreo superior das galinhas e perus. Além da infecção respiratória, em poedeiras e matrizes está associado com uma queda significativa na produção de ovos. Em galinhas o vírus está relacionado com a Síndrome da Cabeça Inchada (SCI), uma enfermidade multifatorial, e por este motivo é importante o diagnóstico diferencial. Testes realizados com anticorpos monoclonais (Mabs) e técnicas moleculares são capazes de detectar diferenças entre os subtipos do vírus. Os métodos de diagnóstico incluem isolamento ou detecção da partícula viral ou testes sorológicos. O isolamento das amostras virais SHS-BR-121 (subtipo A) e STG-SHS-1439 (subtipo B) foi realizado em cultura de anel de traquéia, em fibroblasto de embrião de galinha (FEG) e em células chicken embryo related (CER). A comparação das médias dos títulos obtidos para as duas amostras virais, em célula CER, apresentou diferença estatisticamente significativa ( $P=0,014$ ) com  $p \leq 0,05$ . Neste projeto foi avaliada a suscetibilidades de seis sistemas celulares (CER, Vero, BHK-21, HEp-2, MDBK e ED) para a multiplicação das duas amostras virais (subtipos A e B). Destes sistemas as células CER, Vero e BHK-21 demonstraram ser apropriadas para a replicação viral. Os títulos nestas células variaram de  $10^{5,5}$  a  $10^{7,0}$ /mL DICC<sub>50</sub>, para o vírus SHS-BR-121, e  $10^{5,5}$  a  $10^{6,0}$ /mL DICC<sub>50</sub> para o vírus STG-SHS-1439. As diferenças entre as médias dos títulos nos diferentes sistemas celulares foi estatisticamente significativa para a amostra SHS-BR-121 inoculada em CER em relação as células Vero e BHK-21 ( $P= 0,01$  e  $P=0,004$ , respectivamente) com  $p \leq 0,05$ . Para a amostra STG-SHS-1439 não houve diferença estatística significativa, com  $p \leq 0,05$ . A curva da cinética viral foi realizada para as duas amostras virais, em três sistemas celulares, CER, Vero e BHK-21, demonstrando estas diferenças. Foram produzidos anticorpos monoclonais contra o AMPV isolado no Brasil, sendo obtidos cinco anticorpos monoclonais para o antígeno viral através da fusão celular que apresentaram os isotipos IgG1, IgG2a e IgG2b quando da isotipagem. Dos cinco anticorpos monoclonais, três possuíam atividade neutralizante e quatro deles inibiram a fusão *in*

*vitro*. No teste de soroneutralização cruzada foram utilizadas três amostras virais para a análise, sendo elas SHS-Br-121, STG 854/88 e TRT-SHS-1439. Todos os anticorpos monoclonais apresentaram resultado positivo em relação à amostra homóloga, sendo que três apresentaram resultados positivos também para as amostras heterólogas. Os resultados confirmam que os dois anticorpos monoclonais descritos podem ser utilizados com importante ferramenta nos estudos epizootiológicos e para o diagnóstico específico dos subtipos na infecção pelo Metapneumovírus Aviário.

## ABSTRACT

Avian Metapneumovirus (AMPV), also denominated virus of the rhinotracheitis of the turkeys, it is a virus that attacks and it causes infection in the upper respiratory tract of chickens and turkeys. Besides the respiratory infection, in breeders and layers is associated with a significant fall in the production of eggs. In chickens the virus is related with the Swollen Head Syndrome (SHS), an illness multifactorial and for this reason it is very important the differential diagnosis. Tests accomplished with monoclonal antibodies (Mabs) and molecular techniques are capable to detect differences among the subtypes of the virus. Methods for the diagnosis of AMPV infections include detection or isolation of the virus itself, demonstration of a specific antibody response to the virus. For the primary isolation of the two samples of AMPV, SHS-BR-121 (subtype A) and STG-SHS-1439 (subtype B) was it accomplished in chicken embryo tracheal organ culture (TOC), in chicken embryo fibroblast cell culture (CEF) and was it accomplished in cell line chicken embryo related (CER). Done the comparison of the averages of the titers obtain for the two strains, in cell line CER, did present statistically significant difference ( $P=0,014$ ) with  $p \leq 0,05$ . The growth of SHS-121-BR and STG-SHS-1439 was evaluated in six different cell lines (CER, Vero, BHK-21, HEp-2, MDBK and ED). CER, Vero and BHK-21 showed to be the most appropriate for virus multiplication. The titers in these cells varied from  $10^{5,5}$  to  $10^{7,0}/\text{mL TCID}_{50}$ , for the virus SHS-BR-121, and  $10^{5,5}$  to  $10^{6,0}/\text{mL TCID}_{50}$  for the virus STG-SHS-1439. The differences among the averages of the titers in the different cell lines was statistically significant differences ( $P=0,01$ ) with  $p \leq 0,05$  for the strain SHS-BR-121 in CER cell line. One-step growth curves of the strains SHS-BR-121 and STG-SHS-1439 in CER, Vero and BHK-21 showed that there was not statistically significant difference in the infectious virus titers from 0 to 60 hours after infection. Five monoclonal antibodies were obtained for the viral antigen through the cell fusion that showed the isotypes IgG1, IgG2a and IgG2b, when of the characterization of Mabs. Three of them showed neutralizing activity and four inhibited the fusion *in vitro*. These MAbs were used to investigate antigenic relationship among three strains (SHS-BR-121, STG 854/88 and TRT 1439/91) of aMPV subtypes A and B using cross-neutralization test. When the five

hybridomas were analyzed showed result positive for the homologous virus. In relation to two samples of heterologous AMPV three Mabs were positive to heterologous AMPV. The results confirm that the two monoclonal antibodies described can be used as a valuable tool in the epizootiological and serological studies, and also for the specific diagnosis of the subtypes in the infection for Avian Metapneumovirus.

## 1. Introdução

O desenvolvimento da área avícola no Brasil, tanto na produção de carne como de ovos, tem sido muito grande nas duas últimas décadas. Segundo o relatório 2006 – 2007 da União Brasileira de Avicultura (UBA) atualmente o Brasil ocupa a posição de maior exportador mundial, seguido dos Estados Unidos da América. Em 2007 o Brasil exportou carne de frango para 142 países, em um valor de US\$ 4,975 bilhões, 20% a mais do que em 2006. O Brasil produziu em 2007 mais de 10 milhões de toneladas de carne de frango e 24,2 bilhões de ovos. O consumo interno, tanto de carne de frango como de ovos aumentou em relação a 2006. São consumidos aproximadamente 36,97 Kg de carne e 142,8 ovos *per capita*.

A América é responsável por 48,8% da produção global de carne de frango, sendo os Estados Unidos da América o maior produtor (16.162 milhões de toneladas) seguido pelo Brasil (9.336 milhões de toneladas). No Brasil a Região Sul tem uma grande parcela na produção de carne de frango, com um alojamento de 55,86% de matrizes. Em relação a produção de ovos, a região Sudeste, e particularmente o Estado de São Paulo, são responsáveis pelo alojamento de 66,59% das poedeiras. Para 2008 existe a expectativa do abate de 4,32 bilhões de aves, o que representaria um aumento de 5,49% em relação a 2007.

O desempenho do frango de corte deu à avicultura destaque ainda maior na economia brasileira. Possibilitou que a população consumisse um produto protéico de

alta qualidade, sanidade e baixo custo e, mediante as exportações, uma expressiva receita cambial.

Um dos aspectos importantes para que a produção avícola do Brasil possa crescer ainda mais é a manutenção da sanidade dos plantéis. Diversas enfermidades preocupam o setor e dentre estas podemos citar a Síndrome da Cabeça Inchada (SCI), que está associada à presença do Metapneumovírus Aviário (AMPV). A SCI acomete criações de galinhas e perus, e é responsável por grandes perdas econômicas na avicultura, estando disseminada praticamente por todo o mundo.

Os prejuízos econômicos provocados pela SCI em galinhas são relevantes. Em frangos de corte a morbidade pode alcançar 100% e a mortalidade pode variar entre 1 a 5%, na ausência de infecções secundárias e 20 a 30% na presença de infecções bacterianas secundárias (Pattison *et al.*, 1989; Gough *et al.*, 1994). Em matrizes e poedeiras a doença normalmente se manifesta no início do pico de postura, entre 24 a 52 semanas, com morbidade e mortalidade relativamente baixas, variando de 3 a 10% e de 1 a 4%, respectivamente. A queda na produção de ovos gira em torno de 1 a 10%, durante duas a quatro semanas, e a mortalidade embrionária entre 3 a 10% (O'Brien, 1985; Hafez & Lohren, 1990).

Os testes de diagnóstico, como ELISA e Soroneutralização, e o isolamento do vírus tem demonstrado a ampla distribuição mundial do vírus. Atualmente, além dos métodos sorológicos de diagnóstico, as técnicas de biologia molecular também vêm ganhando importância tanto na pesquisa como na classificação dos sorotipos do vírus.

No Brasil o AMPV foi constatado em criações comerciais desde 1992 utilizando imunodiagnóstico, e isolamento viral (Arns & Hafez, 1992; Arns & Hafez, 1995, Coswig, 1998).

Em vista dos problemas ocasionados pela SCI e pela atual situação do Brasil no mercado avícola internacional, é necessário um levantamento mais amplo sobre a importância da doença e os prejuízos por ela causados nas criações brasileiras.

## 1.1 Histórico

O Metapneumovírus Aviário (AMPV) é o agente causal da Rinotraqueíte dos Perus, em perus (Cook, 2000), e está associado a Síndrome da Cabeça Inchada (SCI) em frangos, estando disseminado praticamente no o mundo ocasionando perdas consideráveis nestas criações (Gough, 2003; Cook & Cavanagh, 2002).

O primeiro relato da presença do AMPV foi feito na década de 70 na África do Sul em perus, e posteriormente em frangos de corte (Buys & Du Prez, 1980; Buys *et al.*, 1989a). O mesmo agente foi identificado alguns anos depois na França (Giraud, *et al.*, 1986), posteriormente isolado no Reino Unido (McDougall & Cook, 1986; Jones *et al.*, 1991) e caracterizado como pneumovírus por Cavanagh & Barret (1988). O AMPV disseminou-se mundialmente, acometendo aves também na Espanha, Israel, Itália, Japão, Holanda, Alemanha, México, Hungria, Bélgica, Chile, Brasil e recentemente Estados Unidos. Os dados de isolamento do AMPV são apresentados no Quadro 1.

Anticorpos contra o AMPV foram detectados na África do Sul (Morley & Thompson, 1984), Israel (Perelman, 1988), França (Drouin *et al.*, 1985), Inglaterra (Wyeth *et al.*, 1987), Marrocos (El Houadfi, 1991) e México (Decanini, 1991), Brasil (Arns & Hafez, 1992) e Estados Unidos (Seal, 1998). A Austrália e o Canadá, até o momento, parecem não apresentar casos de infecção por AMPV (Bell & Gough 2003, 1990; Heckert & Myers, 1993).

A situação da SCI no Brasil foi relatada por Arns & Hafez em 1992, através de imunodiagnóstico utilizando como ensaios a Soroneutralização e ELISA indireto, e demonstrou a prevalência de 65-70%. O isolamento do AMPV foi realizado por Arns & Hafez em 1995 a partir de matrizes infectadas provenientes dos Estados de Minas Gerais e São Paulo. Posteriormente foi realizado um levantamento sorológico onde foram detectados anticorpos para o AMPV em frangos de corte, matrizes e poedeiras, nas regiões Sul, Sudeste e Nordeste (Coswig, 1998), demonstrando deste modo sua ampla distribuição no país.

**Quadro1: Isolamento do AMPV em diferentes Países.**

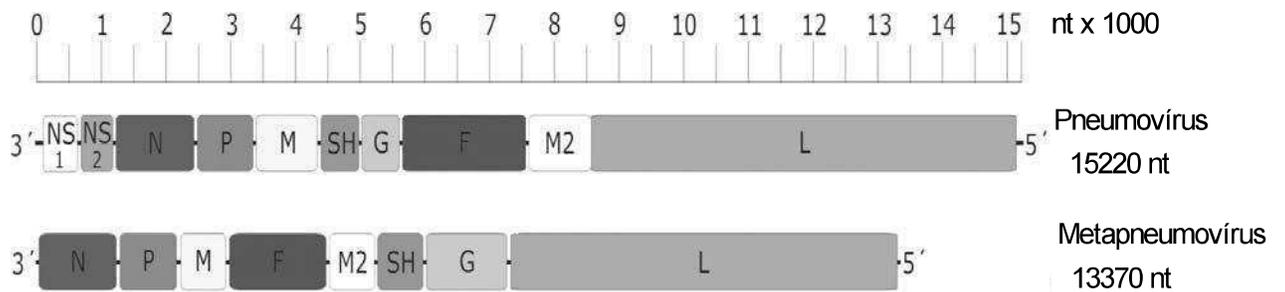
PAÍS	AUTOR	ANO
ESPAÑA	PAGES MANTÉ	1984
FRANÇA	PICAULT <i>et al.</i>	1987
ÁFRICA DO SUL	BUYS <i>et al.</i>	1989
ALEMANHA	HAFEZ & WEILAND	1990
REINO UNIDO	JONES <i>et al.</i>	1991
TAIWAN	LU <i>et al.</i>	1994
BRASIL	ARNS & HAFEZ	1995
JAPÃO	TANAKA <i>et al.</i>	1995
USA	SEAL	1998

## 1.2 Agente Etiológico

O Metapneumovírus Aviário pertence à família *Paramyxoviridae*, sub família *Pneumovirinae*. A comparação do AMPV com outros vírus do gênero *Pneumovirus* como o Vírus Respiratório Sincicial Bovino (BRSV) e o Vírus da Pneumonia dos

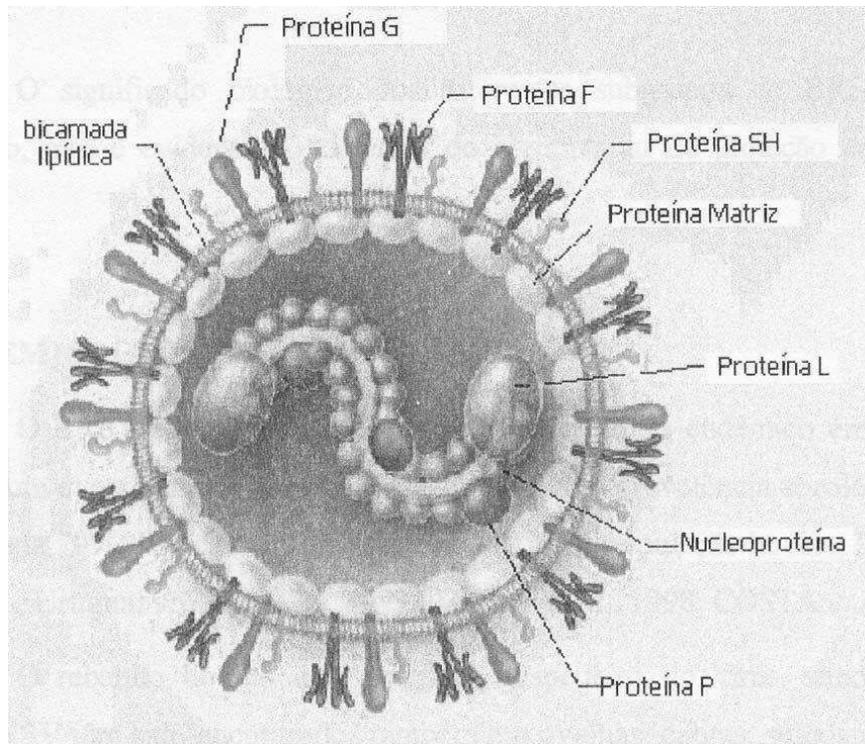
camundongos, demonstrou a existência de diferenças importantes entre eles como a não codificação de duas proteínas não estruturais denominadas de NS1 e NS2, presentes nos BRSV e no vírus da Pneumonia dos Camundongos (Figura 1). Além destas diferenças, há baixa identidade entre os genes e proteínas codificadas pelo AMPV e RSV, deste modo o primeiro também tem sido classificado no gênero *Metapneumovirus* (Collins *et al.*, 1996; Pringle, 1998; Lamb, 2000; Gonvidarajan & Samal, 2004).

O AMPV, anteriormente classificado dentro do gênero *Pneumovirus*, foi designado como um metapneumovírus por apresentar o genoma contendo oito genes organizados em uma ordem diferente dos 10 genes dos pneumovírus de mamíferos. No genoma dos pneumovírus os genes F e M2 situam-se entre os genes G e L, enquanto que nos metapneumovírus se localizam entre os genes M e SH (Collins *et al.*, 1996; Pringle, 1998). O AMPV é o protótipo do gênero *Metapneumovirus*, onde foi também classificado o recentemente identificado metapneumovírus humano (HMPV; Van den Hoogen *et al.*, 2001).



**Figura 1:** Comparação dos genomas dos vírus pertencentes aos gêneros Pneumovirus e Metapneumovirus. (Adaptado de Easton, 2002 e gentilmente cedido por Helena Lage Ferreira).

Os vírions são pleomórficos, muitas vezes de forma esférica, podendo apresentar longos filamentos. Apresentam diâmetro entre 100 a 200 nm, com variações de 70 a 600 nm. O envelope viral, derivado da membrana celular, é coberto por projeções que medem entre 7 a 19 nm (Figura 2). O nucleocapsídeo é helicoidal com diâmetro de 13 a 14 nm (Collins & Gough, 1988; Giraud *et al.*, 1986, Picault *et al.*, 1987, Wyeth *et al.*, 1986; Gough 2003, Cook, 1993). A morfologia do AMPV foi estudada através da microscopia eletrônica de transmissão por contrastação negativa (Wyeth *et al.*, 1986; Giraud *et al.*, 1986; Gough & Collins, 1989).



**Figura 2:** Estrutura do vírus respiratório sincicial (Hall, 2001).

O AMPV apresenta uma densidade de 1,20 a 1,22 g/mL em gradiente de sacarose (Collins & Gough, 1988) e não apresenta atividade hemoaglutinante e neuramínica, não aglutinando eritrócitos de aves ou de mamíferos. Quando o vírus está adaptado em cultivos celulares apresenta como característica a formação de sincício, com inclusões intracitoplasmáticas. Este sincício é caracterizado como um arredondamento celular disseminado sobre o tapete, inicialmente em poucos lugares até se apresentar por todo o tapete (Fenner, 1993). O vírus é sensível à solventes lipídicos e é termolábil (McDougall & Cook, 1986).

São vírus RNA de fita simples, não segmentada de sentido negativo, com 15 a 16 Kb, contendo seis ou mais genes, que codificam oito polipeptídeos estruturais, dos

quais dois são glicosilados e três proteínas não estruturais. São codificadas a nucleoproteína (N), fosfoproteína (P), duas proteínas de matriz (M e M2), glicoproteína de superfície (G), proteína de fusão (F), pequena proteína hidrofóbica (SH) e uma proteína RNA polimerase dependente do RNA viral (L). A glicoproteína G é responsável pela adsorção do vírus com a célula do hospedeiro enquanto que a proteína F é responsável pela fusão com a célula alvo. As glicoproteínas F e G são as mais imunogênicas e por este motivo tem grande importância na caracterização dos subtipos e do antígeno vacinal. As proteínas N e F são essenciais para a replicação do vírus e apresentam-se altamente conservadas entre os diferentes isolados de AMPV e entre pneumovírus distintos (Collins & Gough, 1988; Ling & Pringle, 1988; Gough & Collins, 1989; Fenner, 1993; Gough, 2003; Naylor *et al.*, 2004).

Inicialmente o AMPV foi classificado sorologicamente com um único sorotipo com dois subtipos, denominados A e B. A comparação entre várias cepas europeias do vírus da Rinotraqueíte dos Perus por ELISA e SN sugeriu que, embora estas fossem relacionadas entre si, existia uma grande diversidade entre as mesmas (Cook *et al.*, 1993). Dados posteriores foram obtidos de sete isolados diferentes de vírus da Rinotraqueíte dos Perus de diferentes países europeus. Esses isolados mostraram-se antigenicamente relacionados, mas puderam ser separados em dois grupos distintos (Collins *et al.*, 1993). Dados obtidos por determinação da seqüência nucleotídica do gene G de cinco cepas diferentes de vírus da Rinotraqueíte dos Perus de isolados obtidos em diferentes países europeus em diferentes tempos evidenciam os dois subtipos distintos (Easton & Juhasz, 1994). Estes subtipos foram assim designados por Easton & Juhasz, 1994 em referência aos subtipos

encontrados para o Metapneumovirus humano (HMPV). Este agrupamento foi confirmado com o reconhecimento das diferenças antigênicas através dos testes de ELISA e vírus neutralização viral utilizando anticorpos monoclonais (Toquin *et al.*, 1996, Collins *et al.*, 1993; Cook *et al.*, 1993, Eterradossi *et al.*, 1995).

Atualmente pertencem ao subtipo A os vírus isolados no Reino Unido, França e África do Sul antes de 1993 e o vírus isolado no Brasil (D'Arce *et al.*, 2005, Dani *et al.*, 1999, Hafez *et al.*, 2000), enquanto que ao subtipo B pertencem os vírus isolados no continente europeu, atualmente encontrados no Reino Unido, Espanha, Hungria, Itália e França (Bäyon-Auboyer, *et al.*, 2000).

A comparação preliminar das seqüências de genes que codificam para a proteína F e M demonstrou que o vírus isolado nos EUA era diferente do tipo circulante na Europa, indicando ser de um sorotipo diferente de A e B, denominado de C (Seal *et al.*, 2000; Cook & Cavanagh, 2002). Isolados do vírus obtidos em meados da década de 1980 na França, apresentaram-se também geneticamente e antigenicamente diferentes dos outros três subtipos, deste modo vem sendo proposto um quarto subtipo denominado de D (Bäuyon-Auboyer, *et al.*, 2000).

### **1.3 Patogenia e Sinais Clínicos**

A via de entrada do Metapneumovirus Aviário é o trato respiratório, sendo as células ciliadas inicialmente infectadas pelo vírus. De acordo com Jones *et al.*, (1988) e

Giraud *et al.* (1986) a replicação viral ocorre no citoplasma das células epiteliais ciliadas que revestem a mucosa dos condutos nasais, da laringe e da traquéia de perus, galinhas e galinha d'Angola. Durante o processo de replicação viral estas células perdem a atividade ciliar, levando a uma maior susceptibilidade a infecções por outros agentes, como por exemplo, o vírus da Bronquite Infecciosa das Galinhas (VBI) ou bactérias, como a *Escherichia coli* (Cook, 2000).

O vírus replica-se no trato respiratório por um período de quatro a seis dias, sendo que os sinais clínicos aparecem após este período (Jones *et al.*, 1986). Além da replicação viral no trato respiratório, ocorre também no epitélio ciliado do trato reprodutivo, o vírus alcança o oviduto através da corrente circulatória depois da replicação primária no trato respiratório (Jones *et al.*, 1988). Os sinais clínicos nas aves ocorrem pelo dano provocado pela multiplicação do vírus no epitélio ciliado, tanto na traquéia como no trato reprodutivo (Williams *et al.*, 1991).

A transmissão ocorre de forma horizontal, por via aérea, através do contato de aves doentes com sadias. A transmissão vertical ainda não foi observada, embora a passagem de anticorpos maternos para os pintinhos tenha sido descrita (Giraud *et al.*, 1986). Williams *et al.* (1991) demonstraram que o vírus pode se disseminar de aves inoculadas experimentalmente para aves suscetíveis, mantidas em contato, cinco dias após a inoculação. Aves silvestres migratórias podem transmitir o vírus para aves suscetíveis, sendo a provável via de entrada do vírus na Europa (Stuart, 1989).

Ambientes com baixa umidade, má ventilação, calor intenso, poeira e clima seco, favorecem a rápida disseminação da doença entre as galinhas criadas em cama (cerca

de 24 horas). No caso de aves criadas em gaiolas, em boxes ou galpões separados, a transmissão da doença é relativamente lenta (cerca de 1 a 2 semanas) podendo mesmo não ocorrer.

O AMPV parece ser capaz de infectar, principalmente, perus e galinhas de diferentes idades. Perus jovens e matrizes pesadas, especialmente na primeira semana de produção, seguido de frangos de corte e poedeiras parecem ser mais suscetíveis a infecção pelo AMPV (Hafez, 1992). Esta enfermidade pode apresentar-se de forma aguda ou subclínica, acometendo normalmente o trato respiratório superior, principalmente os cornetos nasais e traquéia (Jones *et al.*, 1988).

Nos casos de infecção aguda do trato respiratório, os sinais clínicos geralmente são leves, mas a presença de agentes bacterianos secundários pode ser severa e até fatal. A infecção com o vírus em mortalidade de aproximadamente 3% dos casos, com morbidade de até 90%. Frequentemente são observadas perdas de peso em perus e queda de produção de ovos em galinhas (Jones *et al.*, 1988; Shin *et al.*, 2000). Existem relatos da presença do vírus em outras espécies de aves como faisões, galinhas d'Angola, patos e avestruzes (Gough *et al.*, 1988; Cook & Cavanagh, 2002).

Fatores que comprometem a habilidade de reparação epitelial, que aumentem a atividade secretória ou que deprimam as defesas locais, como o stress, poeira, concentração de gases ambientais, doenças intercorrentes respiratórias e imunodepressoras contribuem para a instalação de agentes secundários, principalmente a *Escherichia coli*. Isto leva a um processo inflamatório intenso, principalmente nos condutos naso-lacrimais, onde se pode observar a presença de

secreção muco-catarral, lacrimejamento e blefarite. A persistência de colonização bacteriana leva ao acometimento do tecido subcutâneo da região submandibular, do tecido ósseo do crânio e ao final, das meninges, que é a fase que caracteriza a SCI (Gough, 2003).

Em frangos de corte os sintomas iniciais são coriza nasal, conjuntivite e aumento da glândula lacrimal. Após 12 a 24 horas, observa-se edema periorcular que progride para a face, descendo para o tecido subcutâneo mandibular, com o aparecimento de sinais respiratórios e sinusite (Morley & Thomson, 1984, Arns *et al.*, 2000). As perdas econômicas em frangos de corte devido à SCI ficam em torno de 1 a 3% em condições favoráveis e de 20 a 30% sob condições adversas, isto é, quando ocorrem complicações respiratórias ou infecções secundárias. Os principais agentes bacterianos relacionados ao quadro de SCI são: *Escherichia coli* (*E. coli*), *Haemophilus paragallinarum*, *Pasteurella haemolytica*, *Pasteurella multocida*, *Bordetella avium*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Mycoplasmas* (Cook *et al.*, 1991). Em relação o principal agente relacionado é o vírus da Bronquite Infecciosa (Tanaka *et al.*, 1995).

Em matrizes e poedeiras a mortalidade fica em torno de 1 a 3%, porém ocorrem perdas devido à queda de postura de 1 a 10% durante 2 a 3 semanas e aumento de morte embrionária em incubadoras em torno de 3 a 10% (Morley & Thomson, 1984; O'Brien, 1985; Hafez & Lohren, 1990). Aves matrizes apresentam sinais neurológicos caracterizados por torcicolo e movimentos repentinos da cabeça após 72 horas (Morley & Thomson, 1984). Nestas aves, a doença afeta primariamente aves no pico da postura, ou logo após estas terem entrado em fase de produção. Os sintomas iniciais incluem falhas respiratórias brandas, rinite e conjuntivite, seguidas de torcicolo e

opistótono, edema uni ou bilateral facial que progride para toda a cabeça (Hafez & Lohren, 1990; Arns *et al.*, 1994). Estes sintomas são observados em poedeiras, onde também se observa diminuição na qualidade dos ovos (Hafez, 1992) e redução na produção de ovos de 2 a 3% por 1 a 2 semanas (Hafez & Lohren, 1990; Bell & Alexander, 1990).

A severidade dos sintomas, duração da doença e mortalidade são extremamente variáveis e influenciados por fatores ambientais como: precárias condições de manejo e higiene, alta densidade de aves, ventilação inadequada, alto nível de amônia e pelo tipo de infecção bacteriana associada (Hafez, 1992).

#### **1.4 Diagnóstico**

Não existem sinais clínicos patognomônicos específicos da infecção por AMPV em perus e galinhas. O quadro clínico pode se comportar de maneira variável dependendo das condições ambientais e infecções secundárias, deste modo é fundamental efetuar o diagnóstico através da utilização de ensaios laboratoriais (Gough, 2003).

A confirmação da infecção por AMPV depende da demonstração do vírus no material coletado ou de anticorpos vírus-específico no soro. Em geral, o vírus tem sido muito mais difícil de ser isolado em frangos do que em perus e se tem sugerido que este fato possa ser devido ao curto tempo de replicação do agente no tecido alvo, não

estando mais presente quando do aparecimento dos sinais clínicos mais evidentes (Cook *et al.*, 1991; Lu *et al.*, 1994; Otsuki *et al.*, 1996). O isolamento raramente é bem sucedido em aves com sinais clínicos severos, provavelmente devido à infecção secundária geralmente presente neste momento (Gough, 2003). Quando ocorre o isolamento do vírus não se tem conseguido reproduzir os sinais característicos de SCI em galinhas infectadas experimentalmente, uma vez que as galinhas inoculadas apresentam apenas sinais clínicos leves a moderados (Jones *et al.*, 1988; Buys *et al.*, 1989b; Gough *et al.*, 1994).

O diagnóstico laboratorial do AMPV inclui o isolamento em cultivos primários de embrião de galinha e anéis de traquéia (Picault *et al.*, 1987), inoculação em ovos embrionados e em cultivos celulares, com em células CER (Chicken Embryo Related) conforme Hafez, 1991. É possível demonstrar a presença do vírus usando técnicas imunológicas como a Imunofluorescência (IF), Imunoperoxidase (IP) ou ainda através de técnicas moleculares, como a técnica de PCR (Cook & Cavanagh, 2002). As partículas virais podem ser visualizadas através da microscopia eletrônica e a utilização da imunomarcagem permite efetuar a identificação do isolado (Collins & Gough, 1988; O'Loan *et al.*, 1992).

A detecção dos anticorpos pode ser realizada através de diferentes técnicas de imunodiagnóstico. A utilização de IF e IP foi citada por Baxter *et al.* em 1986, mas atualmente os testes de diagnóstico mais difundidos são Soroneutralização (SN) e os ensaios imunoenzimáticos (ELISA). Os resultados obtidos pelas duas técnicas mostram boa correlação, sendo que o teste de ELISA apresenta uma sensibilidade um pouco maior que o teste de SN (Picault *et al.*, 1987; Cook *et al.*, 1988; Hafez & Loehren, 1990;

Karaca *et al.*, 1992). As técnicas convencionais utilizadas no estudo da relação antigênica entre isolados de diferentes países detectam uma estreita similaridade entre esses isolados. No entanto, estudos empregando testes de SN e ELISA cruzados com soros policlonais e anticorpos monoclonais são capazes de detectar variações entre estes isolados, sendo que o uso de anticorpos monoclonais permite uma diferenciação mais precisa (Cook *et al.*, 1988; Collins *et al.*, 1993; Jones, 1995). O uso de anticorpos monoclonais quer seja no teste de SN como nos ensaios imunoenzimáticos tem se mostrado uma importante ferramenta em estudos epidemiológicos, epizootiológicos e em diagnósticos específicos (Cook *et al.*, 1993; Collins *et al.*, 1993; Karaca *et al.*, 1992; Tanaka *et al.*, 1996).

Para o desenvolvimento e padronização de testes sorológicos rápidos, eficazes e específicos é indispensável o uso de vírus bem identificados e conhecidos. As diferenças antigênicas entre as amostras podem ser detectadas somente através da utilização de anticorpos monoclonais (Collins *et al.*, 1993). Os anticorpos monoclonais têm sido empregados na detecção e caracterização imunoquímica de diversos componentes celulares, em testes diagnósticos como agentes carreadores de drogas terapêuticas, entre outros usos (Milstein, 1980; Cook, *et al.*, 1993; Tanaka *et al.*, 1996).

O desenvolvimento de anticorpos monoclonais permitiu a diferenciação de subtipos de vírus que anteriormente, com a utilização de anticorpos policlonais, eram agrupados em conjunto. No estudo de Collins *et al.* (1993) houve a inclusão de amostras de vírus isoladas na Hungria, Itália e Espanha no grupo onde já se encontravam os Pneumovirus isolados na Inglaterra e França, auxiliando no entendimento da disseminação do vírus na Europa.

Em um experimento utilizando soros policlonais e monoclonais Cook *et al* (1993) obtiveram a diferenciação antigênica entre os isolados de AMPV no teste de neutralização viral. O uso do soro policlonal indicou que poderia haver diferenças antigênicas entre os isolados, o que foi confirmado somente quando do uso dos anticorpos monoclonais.

O trabalho desenvolvido por Obi *et al* (1997) confirma que o desenvolvimento de anticorpos monoclonais específicos para o AMPV isolado em cada país possibilita a análise da antigenicidade do vírus, facilitando o desenvolvimento de testes sorológicos mais específicos. O uso dos anticorpos monoclonais, diferentemente do uso de anticorpos policlonais, facilita estudos epidemiológicos bem mais específicos para identificação de amostras virais circulantes no país.

A produção de anticorpos monoclonais teve um avanço muito importante quando Köhler & Milstein em 1975 descreveram uma técnica de hibridização de células de mieloma e de linfócitos B normais para produzir linhagens celulares contínuas, capazes de secretar anticorpos específicos, para o antígeno usado na imunização do doador dos linfócitos B. Os primeiros experimentos de fusão foram mediados pelo vírus Sendai, e os híbridos foram selecionados pela sua capacidade de multiplicação em meio seletivo de hipoxantina, aminopterina, timidina (HAT) e reatividade com o antígeno. A formação de tumores foi alcançada com estas linhagens celulares, quando injetadas em camundongos e estes tumores passaram a ser conhecidos como hibridomas. Posteriormente várias linhagens de mielomas de camundongos se mostraram apropriadas para uso na fusão celular, para obtenção de hibridomas (Zola, 1995). O vírus Sendai foi substituído pelo polietileno glicol (PEG) na etapa de fusão

celular. Até hoje o procedimento básico de obtenção de hibridomas, com algumas modificações, continua sendo aquele proposto por Köhler & Milstein (1975). A descoberta de que quantidades ilimitadas de anticorpos específicos reconhecendo apenas um sítio antigênico poderiam ser selecionadas, e produzidas trouxe um grande avanço para a ciência.

A primeira etapa para a produção de anticorpos monoclonais é a imunização dos camundongos. Os animais podem produzir anticorpos contra uma variedade de estruturas moleculares, mas tem dificuldade de reconhecer moléculas muito pequenas (haptenos), que devem ser conjugadas com alguma molécula carreadora para induzir resposta imunológica. Para a imunização dos camundongos antígenos na forma agregada são mais imunogênicos que proteínas monoméricas, e antígenos solúveis são considerados bons imunógenos quando associados a um adjuvante, como por exemplo, o adjuvante completo de Freund (Bennet *et al.*, 1992).

O próximo passo após a imunização é a escolha de um método de detecção adequado para selecionar os hibridomas secretores dos anticorpos desejados. A utilização de antígenos puros é imprescindível para evitar que anticorpos produzidos contra impurezas presentes no material de imunização sejam revelados no teste de detecção (Tanaka *et al.*, 1996).

Para obtenção de uma quantidade maior de anticorpos monoclonais uma das técnicas utilizadas em laboratório de pesquisa é através da produção de líquido ascítico em animais injetando os hibridomas por via intraperitoneal (Tung *et al.*, 1976). Após aproximadamente 10 dias depois da injeção cada animal libera ao redor de 3 – 5 mL de

líquido ascítico, contendo cerca de 10 a 40 mg/mL de anticorpo monoclonal. Este procedimento, apesar de muito difundido, apresenta alguns inconvenientes como o desconforto dos animais e o seu posterior sacrifício. Outra alternativa para o cultivo dos hibridomas de interesse é o uso de frascos de cultivo celular, contendo meios de cultura convencionais para células de mamíferos acrescidos de soro fetal bovino. Nesses meios, os hibridomas secretam anticorpos monoclonais em quantidades que variam de 20 µg a 1,0 mg/mL de proteína de anticorpo (Harlow & Lane, 1988).

A escolha do tipo de ELISA empregado para a detecção dos anticorpos monoclonais depende da natureza da amostra a ser analisada, da disponibilidade dos reagentes e da precisão e sensibilidade necessária. Em muitas situações, não é imprescindível ter uma medida exata da concentração da substância de interesse, por exemplo, na detecção de hibridomas secretores do anticorpo de interesse. Nestas circunstâncias pode ser suficiente uma resposta positiva ou negativa. Para outras situações pode existir a necessidade de desenvolvimento de ensaios com alta precisão e sensibilidade (Kemmy, 1991; Collins *et al.*, 1993).

A produção de anticorpos monoclonais para o AMPV foi inicialmente realizada por Cook *et al.* (1993). Neste estudo o grupo obteve anticorpos monoclonais específicos para uma amostra de AMPV e demonstrou que estes eram capazes de neutralizar a amostra de AMPV estudada. Os anticorpos monoclonais produzidos reconheciam a proteína G na superfície do vírus. Também realizaram o teste de neutralização cruzada com outras amostras de AMPV isoladas na Inglaterra, França e África do Sul, demonstrando diferenças entre as amostras isoladas na África do Sul e amostras

isoladas na Inglaterra em 1985 das amostras isoladas na França e amostras isoladas na Inglaterra após 1985.

No mesmo ano Collins *et al.* (1993) desenvolveram um teste de ELISA utilizando soros policlonais e anticorpos monoclonais. Quando foram utilizados soros policlonais não foi possível diferenciar sorotipos do AMPV, o que foi possível quando da utilização dos anticorpos monoclonais. Os pesquisadores demonstraram que existia diferença antigênica entre os isolados da França e da Inglaterra.

O grupo de pesquisa de Tanaka *et al.* (1996) produziram anticorpos monoclonais para as proteínas F<sub>1</sub> (subunidade da proteína F) e M do vírus evidenciando que estes anticorpos monoclonais podem inibir a fusão do vírus à membrana da célula do hospedeiro. Obi *et al.* (1997) utilizaram anticorpos monoclonais e soros policlonais para diferenciar sorogrupos do vírus da Rinotraqueíte dos Perus. Com o uso dos anticorpos monoclonais foi possível diferenciar antígenicamente três sorogrupos, utilizando os testes de neutralização viral. Os pesquisadores conseguiram demonstrar a diferença nas propriedades antigênicas da cepa isolada no Japão daquelas isoladas na Inglaterra.

Os estudos presentes na literatura empregando o uso de anticorpos monoclonais na pesquisa e diagnóstico do AMPV e outras doenças causadas por microorganismos, indicam que estes são instrumentos específicos de identificação de antígenos, demonstrando o seu alto potencial como reagente biológico no estudo das relações parasita-hospedeiro (Tanaka, 1996).

## 1.5 Controle da infecção

Uma vez que a infecção por AMPV não pode ser controlada através de medicação, o uso de vacinas, atenuadas em aves jovens e inativadas em matrizes e poedeiras antes do início da postura, tem sido muito recomendado (Jones, 1996). Atualmente são utilizadas comercialmente vacinas vivas e atenuadas para o AMPV. A escolha do programa de vacinação a ser aplicado depende do tipo de criação comercial, da espécie de ave e da presença do agente na região.

Trabalhos recomendam a utilização de manejo adequado, principalmente em relação à ventilação, e uso de terapia antibacteriana no caso de manifestações mais severas da enfermidade (Morley & Thomson, 1984; Kehra & Jones, 1999). Timms *et al.* (1986) recomendam que os programas de vacinação não devam ser aplicados enquanto o lote esteja apresentando manifestações clínicas de SCI ou durante a fase de recuperação. Stuart (1989) recomenda um controle da ventilação, densidade, controle de higiene passos estes que podem reduzir os efeitos da infecção secundária. Hafez *et al.* (1993) demonstraram uma diminuição na mortalidade com o uso de medicamentos a base de enrofloxacin, para o controle da infecção bacteriana secundária.

As vacinas inicialmente foram desenvolvidas para uso em perus, mas também provaram ser benéficas no controle da infecção por AMPV em galinhas. Cook *et al.* (1995) relataram que o uso de uma cepa atenuada do AMPV foi capaz de proteger aves vacinadas, entre um e onze dias, contra o desafio com uma cepa patogênica até três

semanas depois, sugerindo que a proteção pode ser adquirida dentro de poucos dias após a vacinação. Sugerem que a cepa de AMPV atenuada não penetra no trato respiratório com a mesma intensidade do que uma cepa virulenta, causando um trauma bem menor a nível celular. No mesmo trabalho relataram que o aspecto negativo do uso de uma vacina viva atenuada é que a cepa pode apresentar reversão patogênica, com as repetidas passagens em aves.

A aplicação de uma vacina viva em perus, matrizes e poedeiras protege bem as aves contra as manifestações clínicas (Hafez, 1992). Em galinhas a aplicação de uma vacina, de preferência com vírus homólogo, às 12 semanas, via “spray” ou inoculação ocular e a revacinação com vacina inativada às 16 semanas (poedeiras) ou 20 semanas (matrizes) protege bem estas aves, diminuindo a mortalidade, a queda na produção de ovos e a suscetibilidade das aves as alterações ambientais. Um bom programa de vacinação contra Bronquite Infecciosa (BI), e talvez para *E. coli*, pode ser um auxílio na resposta à vacinação contra AMPV. A vacinação de frangos de corte não tem sido tão eficiente, principalmente porque algumas cepas de campo ou vacinais de BI, em determinadas circunstâncias, inibem a multiplicação da cepa vacinal de AMPV no trato respiratório.

O uso de vacina atenuada em matrizes com uma semana, demonstrou que esta não protege as aves contra a infecção respiratória, mas previne os problemas reprodutivos. A combinação de uma vacina viva na primovacinação, seguida da vacina inativada desenvolveu uma boa proteção contra os sinais respiratórios e contra a queda de postura. A vacina viva sozinha não tem protegido as aves contra os sinais respiratórios (Cook *et al.*, 1996).

Atualmente no Brasil é preconizado o esquema de vacinação para a prevenção e controle do AMPV, sendo que já existem vacinas produzidas a partir de amostras do vírus isolado no Brasil.

## 2. Objetivos

Este trabalho teve por objetivos:

- Estudar a suscetibilidade de diferentes sistemas celulares às amostras virais de Metapneumovirus Aviário subtipo A e B, através da observação da cinética viral nestes sistemas celulares.
- Padronizar a técnica de purificação do antígeno viral para utilização na produção dos anticorpos monoclonais e teste de ELISA.
- Produzir anticorpos monoclonais contra a amostra de Metapneumovirus Aviário isolada no Brasil.
- Avaliar as características de testes de neutralização, inibição da fusão e soroneutralização cruzada utilizando amostras heterólogas do Metapneumovirus Aviário.

### **3. Material e Métodos**

#### **3.1 Vírus**

Foi utilizada para trabalho experimental a amostra de AMPV denominada SHS-BR-121, isolada de aves matrizes com SCI após 16 passagens em células FEG, previamente adaptada de cultura de anel de traquéia, proveniente do Laboratório de Virologia, Departamento de Microbiologia, Instituto de Biologia, UNICAMP, Campinas (SP), Brasil (Arns & Hafez, 1995). Esta amostra foi caracterizada como pertencente ao subtipo A (Dani et al., 1999)

A amostra STG-SHS-1439, isolada de perus com sintomas de rinotraqueíte no Laboratório Estadual de Stuttgart, Alemanha, após 16 passagens em células CER (Hafez, 1993).foi utilizada como amostra do subtipo B do AMPV.

O estoque inicial da amostra viral foi replicado e mantido armazenado congelado a -70° C até o momento da sua utilização.

Para o teste de Soroneutralização Cruzada também foi utilizada a amostra TRT-BR 169: isolada de perus com sintomas de rinotraqueíte após 14 passagens em células CER, no Laboratório de Virologia, Departamento de Microbiologia e Imunologia, Instituto de Biologia, UNICAMP, Campinas, sendo caracterizada como subtipo A (D'Arce *et al.*, 2005).

## **3.2 Adaptação das amostras de AMPV em diferentes sistemas celulares**

### **3.2.1 Cultivo em órgão - Cultivo em Anel de Traquéia**

Para a realização dos cultivos de anel de traquéia foram utilizados embriões de galinha SPF de 18-20 dias (Wilding *et al.*, 1986). Os cortes dos anéis traqueais foram feitos com a ajuda de um micrótomo, com espessura em torno de 1 mm, retirando-se previamente a camada de gordura e o tecido conjuntivo que envolve a traquéia. Em seguida, os anéis foram lavados 2 vezes com PBS pH 7.2 e cerca de 3 a 5 anéis foram colocados em placas de 24 orifícios contendo Meio Mínimo Essencial Eagle (MMEE - Cutilab) com 10% de soro fetal bovino (SFB – Cutilab) e 2% de antibiótico.

As amostras virais foram inoculadas em placas de 24 orifícios contendo 5 anéis por poço, e em seguida incubadas a 37°C durante 7 dias, sendo as leituras para a constatação da perda da atividade ciliar (ciliostase) realizadas diariamente. Após o sétimo dia o sobrenadante era colhido e reinoculado em novos anéis até a constatação da ciliostase.

### **3.2.2 Cultura primária de embrião de galinha**

Foram utilizadas nos experimentos células de fibroblasto obtidas de ovos

embrionados de galinhas SPF, isentos de patógenos, com 9 a 11 dias de incubação provenientes do laboratório BIOVET. As culturas foram preparadas seguindo metodologia usual (Baxter-Jones *et al*, 1989), com algumas modificações como descrito a seguir. Próximo ao bico de Bunsen os ovos embrionados foram desinfetados em solução de álcool 70° e abertos pela câmara de ar. Retirou-se o embrião removendo cabeças, asas e patas colocando o restante em placa de Petri com PBS (NaCl 8g; KCl 0,2 g; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 12g; H<sub>2</sub>O 2,9 g; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,2g ,H<sub>2</sub>O deionizada q.s.p. 1000 mL, pH 7.2). No fluxo laminar o embrião foi lavado duas vezes com PBS e a seguir foi picotado e adicionado em frasco com PBS (e 10% de solução de tripsina (tripsina – EDTA), aquecida a 37°C, mantendo em agitação durante 15 minutos. Posteriormente o conteúdo foi filtrado e adicionado MMEE com 10% de SFB. O filtrado foi centrifugado a 2000 rpm durante 10 minutos sendo o sobrenadante descartado e o sedimento ressuspenso e homogeneizado.

Após a homogeneização do sedimento realizou-se a contagem celular e distribuição das mesmas em garrafas de 25 cm<sup>2</sup> (Corning) com concentração inicial de 5x10<sup>5</sup> células/mL em MMEE acrescido de 10% SFB sem antibióticos, durante 48 horas a 37°C.

Foram realizados dois experimentos em células FEG. No primeiro deles, as duas amostras virais, após três passagens em cultura de anel de traquéia, foram inoculadas em FEG para a adaptação neste tipo de célula. No segundo experimento o material original do isolamento da amostra SHS-BR-121, sem passagem por anel de traquéia, foi inoculado em FEG para realizar o isolamento diretamente nesta célula.

Monocamadas de células de FEG com  $3 \times 10^5$  células/mL foram cultivadas durante 24 horas a 37°C e infectadas com o material original colhido de matrizes com sinais de SCI mantido congelado a -70°C. O meio de crescimento celular foi eliminado e inoculado 100 DICC<sub>50</sub>/mL da amostra. Após uma hora de adsorção viral a 37°C, o inóculo foi eliminado, as monocamadas lavadas com MMEE sem soro fetal e em seguida, adicionado 20 mL de MMEE sem soro fetal por garrafa.

As garrafas contendo as amostras virais adsorvidas foram incubadas a 37°C, sendo as culturas observadas diariamente em microscópio de luz invertida (Axiovert 100, Carl Zeiss Oberkochen, Alemanha) até o aparecimento do ECP. As garrafas que não apresentavam efeito citopático característico foram congeladas cinco dias após a inoculação e reinoculadas em FEG.

Após o aparecimento do ECP, o conteúdo das garrafas foi submetido a um ciclo de congelamento (-70°C), descongelamento, centrifugação (centrífuga GSGR Bekman Instruments) a 3.000 g por 10 minutos e o sobrenadante cuidadosamente retirado, aliquotado, titulado e mantido a -70°C até o momento de uso.

### **3.2.3 Linhagens celulares**

Foram utilizadas cinco linhagens celulares contínuas durante o estudo: CER (Chicken embryo related cells) (D'Arce *et al.*, 2005; Cardoso *et al.*, 2000; Smith *et al.*, 1977); Vero (African green monkey kidney ATCC-CCL 81); MDBK (Madin-Darby bovine kidney, ATCC CCL-22), BHK-21 (Baby hamster kidney cells, clone 21, ATCC-CCL 10),

HEp-2 (Human laryngeal carcinoma ATCC –CCL 23) e ED (Equine dermis ATCC-CRL 6288).

### **3.2.3.1 Produção das amostras virais SHS-BR-121 e STG-SHS-1439 em CER**

Foram realizados dois experimentos em células CER. No primeiro deles, as duas amostras virais, após três passagens em cultura de anel de traquéia, foram inoculadas em CER para a adaptação neste tipo de célula. No segundo experimento as amostras virais foram adaptada em células CER após as passagens em células FEG, quando do aparecimento do ECP característico. O mesmo procedimento descrito acima foi utilizado para a produção de antígeno em CER.

Monocamadas de células contendo  $1,5 \times 10^5$  células/mL foram cultivadas durante 24 horas a 37°C e infectadas com as amostras virais SHS-BR-121 e STG-SHS–1439. Para a amostra SHS-BR-121 foram realizadas 6 passagens cegas até a visualização microscópica do ECP. O meio de crescimento celular foi eliminado e inoculados 100 DICC<sub>50</sub>/mL das amostras. Após uma hora de adsorção viral a 37°C, o inóculo foi eliminado, as monocamadas lavadas com MMEE sem soro fetal e em seguida, adicionado 20 mL de MMEE sem soro fetal por garrafa.

As garrafas contendo as amostras virais adsorvidas foram incubadas a 37°C, sendo as culturas observadas diariamente em microscópio de luz invertida até o aparecimento do ECP.

Após o aparecimento do efeito citopático, o conteúdo das garrafas foi submetido a um ciclo de congelamento (-70°C), descongelamento, centrifugação (centrífuga GSGR Bekman Instruments) a 3.000 g por 10 minutos e o sobrenadante cuidadosamente retirado, aliquotado, titulado e mantido a - 70°C até o momento de uso.

### **3.2.3.2 Suscetibilidade dos sistemas celulares as amostras virais SHS-BR-121 e STG-SHS-1439**

Foi testada a suscetibilidade aos vírus das seguintes células: Vero, MDBK, BHK-21, HEp-2 e ED. Os estoques virais das amostras SHS-BR-121 e STG-SHS-1439 foram produzidos e mantidos em CER.

Monocamadas de células contendo 1 a  $3 \times 10^5$  células/mL foram cultivadas durante 24 horas a 37°C e infectadas com as amostras virais SHS-BR-121 e STG-SHS-1439. Foram realizadas duas a cinco passagens de cada amostra viral nos sistemas celulares, até o aparecimento de ECP. As células que não apresentaram ECP foram congeladas e tituladas da mesma maneira. Em cada passagem foi realizado o teste de Imunofluorescência Indireta para verificação da multiplicação viral.

As garrafas contendo as amostras virais adsorvidas foram incubadas a 37°C, sendo as culturas observadas diariamente em microscópio de luz invertida até o aparecimento do ECP. Posteriormente o conteúdo das garrafas foi submetido a um ciclo de congelamento (-70°C), descongelamento, centrifugação a 3.000 g por 10 minutos e o

sobrenadante cuidadosamente retirado, aliquotado, titulado e mantido a - 70°C até o momento de uso.

### **3.3 Cinética viral**

As características da multiplicação viral das amostras SHS-BR-121 e STG-SHS-1439 foi realizada através de uma curva da cinética viral em células CER, Vero e BHK-21. As garrafas foram inoculadas após 24 horas de crescimento celular, com período de adsorção de 1 hora a 37° C, sendo o inóculo removido, acrescido de MEMM sem soro fetal bovino e as garrafas incubadas por diferentes períodos (0, 6, 12, 18, 24, 30, 36, 42, 48, 52, 58 e 60 horas após a inoculação). Depois da incubação o sobrenadante foi colhido e testado para a presença do vírus. Todo o experimento foi realizado em triplicata. O título foi calculado através do método de Reed & Muench (1938).

### **3.4 Titulação Viral em Célula**

As amostras de vírus mantidas congeladas foram tituladas nas células homólogas e em células CER.

Para a titulação viral foram utilizadas suspensões das células entre 1 a  $5 \times 10^5$  células/mL (dependendo da célula utilizada) obtidas a partir de culturas celulares após 48 horas de incubação a 37°C.

O teste foi realizado em microplacas de 96 cavidades (Corning). Em cada cavidade adicionou-se 50 µL de MMEE com 2% de SFB, seguido de 50 µL do inóculo diluído (log 10 de  $10^{-1}$  a  $10^{-8}$ ) das amostras de vírus, em oito repetições. Foram realizadas três repetições de cada amostra. Após realizou-se a adição de 100µL de cultura das células homólogas e CER, e as placas incubadas em estufa de atmosfera úmida de CO<sub>2</sub> a 37°C (Forma Scientific) durante 5 dias até o aparecimento do efeito citopático. O título foi calculado pelo método de Reed & Muench (1938).

### **3.5 Teste de Imunofluorescência Indireta**

O teste de Imunofluorescência Indireta (IFI) foi realizado para confirmar a presença do antígeno viral nas placas utilizadas para a titulação com diferentes sistemas celulares de acordo com metodologia descrita por Baxter-Jones *et al.*, 1989 com algumas modificações. Quando foi realizada a inoculação das amostras virais em células CER, o teste de IFI foi realizado com 24, 48, 72 e 96 horas para correlacionar a multiplicação viral e o aparecimento de ECP característico.

Após a leitura da titulação viral foi realizada a fixação com acetona gelada (Merck) durante 5 a 10 minutos a 4°C, sendo adicionado 100 µL soro hiperimune, na diluição de 1:1000 e as placas foram incubadas a 37°C por 1 hora e então lavadas com PBS.

Foi adicionado 100  $\mu\text{L}$  do anticorpo anti-IgG de galinha conjugado com isotiocianato de fluoresceína (F8888 Sigma-Aldrich) diluído 1:32 em PBS, sendo incubado por 1 hora a 37° C. Após o período de incubação as placas foram lavadas com PBS e realizada a leitura em microscópio de imunofluorescência (Carl Zeiss), incluindo sempre um controle negativo e positivo em cada placa.

O soro hiperimune foi produzido em galinhas SPF para cada uma das amostras virais.

### **3.6 Análise Estatística**

Foi utilizado o Teste t de Student para a análise estatística, sendo determinada a diferença significativa ao nível de  $p \leq 0,05$ . Dependendo da situação foi utilizada a análise de variância (ANOVA), teste t de 2 amostras ou teste t emparelhado. Os testes foram realizados no programa estatístico Minitab® 15 Statistical Software for Windows (Minitab Inc., State College, PA, USA).

### 3.7 Purificação Viral

Para a produção dos anticorpos monoclonais e de antígeno para o teste de ELISA a suspensão da amostra viral SHS-BR-121 foi previamente purificada. Foi adotada a metodologia de Gough & Collins (1989) com modificações. Suspensões de células infectadas e não infectadas foram centrifugadas a 30.000 X g durante 60 minutos a 4°C (Centrífuga Beckmann modelo L 2-21). O sedimento foi ressuspenso em cerca de 2% do volume inicial para cada amostra viral em tampão TRIS-CaCl<sub>2</sub> (0,1M pH 7,2). O concentrado viral assim obtido foi suavemente adicionado sobre um gradiente descontínuo de sacarose (Merck). Para o gradiente foram utilizados 7,0 mL de solução de concentração 20% (p/p) e 2,0 mL da solução de concentração 60 % (p/p) de sacarose (preparadas a partir de uma solução de sacarose estoque 66% em tampão Tris-CaCl<sub>2</sub>) .

A seguir, o vírus foi centrifugado a 53.000 g por 90 minutos a 4°C (Ultracentrífuga Beckman modelo L 8-80 M) e em seguida, com o auxílio de uma seringa de 3 mL retirou-se a banda viral localizada na junção com a concentração de 60%. A fração coletada foi novamente centrifugada a 30.000 g por 60 minutos a 4°C, e o sedimento ressuspenso em tampão Tris-Cálcio (aproximadamente em 0,5% do volume inicial) e armazenado a - 70°C em alíquotas de 0,05 mL.

### **3.8 Determinação de concentração proteica**

A concentração proteica das amostras foi determinada através da metodologia de Lowry *et al.* (1951) utilizando a soroalbumina bovina como padrão (Sigma Chemical Company).

### **3.9 Padronização do Teste Enzimático (ELISA) para detecção dos anticorpos no soro dos camundongos**

Após o processo de imunização os soros dos camundongos foram testados através do teste de ELISA. Placas de poliestireno 96 orifícios (MaxiSorp - Nunc™) foram sensibilizadas com uma solução de 2 µg/mL de antígeno viral purificado, dissolvida em tampão carbonato (0,05 M, pH 9,6), em volume de 100 µL/poço. Após um período de incubação a 4<sup>o</sup> C *overnight*, as placas foram lavadas três vezes com uma solução de lavagem PBS-T (PBS + 0,05% de Tween 20) e em seguida bloqueadas com uma solução com 2% de leite em pó desnatado (Molico®) dissolvido em PBS (PBS-Molico), sendo reincubadas por 60 minutos a 37<sup>o</sup> C. Em seguida as placas foram lavadas três vezes com solução de lavagem e a cada orifício foi acrescido 100 µL/poço, em duplicata, de diluições seriadas dos soros a serem testados. Seguiu-se um período de incubação a 37<sup>o</sup> C durante 120 minutos. Após repetição do processo de lavagem, foi adicionado 100 µL/poço do conjugado anticorpo anti-imunoglobulina de camundongo

marcado com fosfatase alcalina (Sigma) na diluição de 1:5000, e novamente incubadas a 37<sup>0</sup> C por 60 minutos. As placas foram submetidas a novo ciclo de lavagem e após adicionou-se o substrato PNP (para-nitrofenil fosfato) na concentração de 1 mg/mL, diluído em tampão substrato dietanolamina, sendo as placas incubadas no escuro, à temperatura ambiente por 60 minutos. A leitura da DO foi efetuada em leitor de ELISA (Labsystems Multiskan Biochromatic® Type 348) a 405 nm. Como branco foram utilizados poços contendo antígeno, PBS-Molico a 2%, anticorpo secundário e substrato cromógeno.

## **4. Resultados**

### **4.1 Inoculação das amostras virais SHS-BR-121 e STG-SHS-1439 em Anel de Traquéia**

Foi avaliada a inoculação das amostras virais em anel de traquéia. Foram realizadas três passagens em anel de traquéia e o material colhido após sete dias após a inoculação. Na terceira passagem foi constatado o efeito ciliostático no quarto dia após a inoculação. O sobrenadante das placas foi colhido, centrifugado e congelado para a utilização nos demais experimentos.

### **4.2 Produção das amostras SHS-BR-121 e STG-SHS-1439 em FEG**

No primeiro experimento realizado as duas amostras, após três passagens em cultura de anel de traquéia, foram inoculadas em FEG para a adaptação neste tipo de célula.

As amostras apresentaram ECP característico em FEG após 4 passagens na célula. A amostra SHS-BR-121 apresentou o ECP em 24 horas enquanto a amostra STG-SHS-1439 apresentou o ECP em 48 horas. A Tabela 1 apresenta os resultados da inoculação dos vírus em FEG em relação ao número de passagens e ao tempo necessário para o aparecimento do ECP. Cada passagem da amostra viral foi testada

também com o teste de Imunofluorescência Indireta

Tabela 1: Número de passagens e horas para a detecção do ECP em FEG e confirmação da multiplicação viral utilizando IFI após inoculação das amostras virais.

<b>Vírus</b>	<b>Número da passagem</b>	<b>Presença de ECP (horas após a inoculação)</b>	<b>Presença do vírus detectada pela IFI<sup>a</sup></b>
<b>SHS-BR-121</b>	1	-	+
	2	60h	+
	3	24h	+
<b>STG-SHS-1439</b>	1	-	+
	2	72h	+
	3	48h	+

<sup>a</sup> O teste de Imunofluorescência Indireta avaliou a presença ou ausência da multiplicação viral em células FEG. + = positivo, - = negativo.

No segundo experimento o material original do isolamento da amostra SHS-BR-121, pool de swab traqueal e homogeneizado de cornetos nasais, sem passagem por anel de traquéia, foi inoculado em FEG para realizar o isolamento diretamente nesta célula. De acordo com a literatura (Cook & Cavanagh, 2002) um dos sistemas

recomendados para o isolamento é a passagem em células fibroblásticas aviárias e nosso objetivo foi verificar se este seria um sistema viável para o isolamento.

Foram realizadas seis passagens cegas do vírus em FEG antes do aparecimento do ECP. Foi acompanhado o tempo para o aparecimento do ECP, comparando com os resultados de Imunofluorescência Indireta, e foi realizado a titulação viral da amostra em FEG sendo os resultados são apresentados na Tabela 2. A amostra viral foi acompanhada diariamente durante 5 dias, antes de ser congelada e reinoculada em FEG até a constatação do ECP. Na sétima passagem o efeito foi detectado com 96 horas, foram realizadas mais três passagens para observar o tempo de aparecimento do ECP, sendo acompanhado pela titulação em cada nova passagem. O aumento do título de acordo com o número de passagens comprova ser este um dos sistemas viáveis para o isolamento do vírus.

Tabela 2: Isolamento da amostra viral SHS-BR-121 em FEG.

<b>Vírus</b>	<b>Número da passagem</b>	<b>Presença de ECP (horas após a inoculação)</b>	<b>Título viral (log<sub>10</sub> DICC<sub>50</sub> mL)</b>	<b>IFI<sup>a</sup></b>
<b>SHS-BR-121</b>	0 – 6	-	-	+ <sup>b</sup>
	7	96h	2,5	+
	8	72h	3,5	+
	9	60h	4,8	+
	10	24h	5,8	+

<sup>a</sup> O teste de Imunofluorescência Indireta avaliou a presença ou ausência da multiplicação viral em células FEG. + = positivo, - = negativo.

<sup>b</sup> Houve a detecção da multiplicação viral a partir da terceira passagem em FEG. Na primeira e segunda passagens não houve detecção de multiplicação viral pela IFI.

### **4.3 Produção das amostras SHS-BR-121 e STG-SHS-1439 em CER**

No primeiro experimento realizado as duas amostras, após três passagens em cultura de anel de traquéia, foram inoculadas em CER para a adaptação neste tipo de célula. As amostras apresentaram ECP característico em CER na segunda na célula. A amostra SHS-BR-121 apresentou o ECP em 60 horas enquanto a amostra STG-SHS-1439 apresentou o ECP em 72 horas. A Tabela 3 apresenta os resultados da inoculação dos vírus em CER em relação ao número de passagens e ao tempo necessário para o aparecimento do ECP. Cada passagem da amostra viral foi testada também com o teste de Imunofluorescência Indireta.

Tabela 3: Número de passagens e horas para a detecção do ECP em CER e confirmação da multiplicação viral utilizando IFI após inoculação das amostras virais.

<b>Vírus</b>	<b>Número da passagem</b>	<b>Presença de ECP (horas após a inoculação)</b>	<b>Presença do vírus detectada pela IFI<sup>a</sup></b>
<b>SHS-BR-121</b>	1	-	+
	2	60h	+
	3	48h	+
	4	24h	+
<b>STG-SHS-1439</b>	1	-	+
	2	72h	+
	3	60h	+
	4	48h	+

<sup>a</sup> O teste de Imunofluorescência Indireta avaliou a presença ou ausência da multiplicação viral em células CER. + = positivo, - = negativo.

No segundo experimento a amostra SHS-BR-121 apresentou ECP característico após a quarta passagem em CER, mas ainda com um título baixo. Foram realizadas

mais cinco passagens onde se pode constatar uma diminuição no tempo necessário para o aparecimento do ECP e um aumento no título viral. Na quarta passagem o ECP foi constatado com 96h após a inoculação e este material ao ser titulado apresentou título de  $10^{5,1}$  DICC<sub>50</sub> mL. Em cada passagem da amostra viram foi realizado o teste de IFI para verificar a presença da multiplicação viral. A Tabela 4 demonstra o número de passagens necessárias para a detecção da presença do ECP, a detecção viral através da IFI e também o título viral obtido após cada passagem nas células para a amostra SHS-BR-121.

Tabela 4: Adaptação da amostra viral SHS-BR-121 em célula CER.

<b>Vírus</b>	<b>Número da passagem</b>	<b>Presença de ECP (horas após a inoculação)</b>	<b>Título viral (log<sub>10</sub> DICC<sub>50</sub> mL)</b>	<b>IFI<sup>a</sup></b>
<b>SHS-BR-121</b>	0 - 3	-	-	+ <sup>b</sup>
	4	96h	5,0	+
	5-6	72h	5,8	+
	7-8	48 -60h	6,4	+
	9	36h	7,0	+

<sup>a</sup> O teste de Imunofluorescência Indireta avaliou a presença ou ausência da multiplicação viral em células CER. + = positivo, - = negativo.

<sup>b</sup> Houve a detecção da multiplicação viral a partir da terceira passagem em CER. Na

primeira e segunda passagens não houve detecção de multiplicação viral pela IFI.

A amostra STG-SHS-1439 apresentou ECP característico já na segunda passagem em célula CER, pois já estava adaptada a este sistema celular. Foram realizadas nove passagens também para uma padronização em relação à amostra SHS-BR-121, e da mesma forma foi acompanhado o aparecimento de ECP e o título da amostra em CER. Os resultados podem ser observados na Tabela 5. Mesmo já estando adaptada em célula CER o número de horas para o aparecimento do ECP é maior para o subtipo B e os títulos obtidos são menores se comparados com o subtipo A.

Tabela 5: Multiplicação da amostra viral STG-SHS-1439 em célula CER.

<b>Vírus</b>	<b>Número da passagem</b>	<b>Presença de ECP (horas após a inoculação)</b>	<b>Título viral (log<sub>10</sub> DICC<sub>50</sub> mL)</b>	<b>IFI<sup>a</sup></b>
<b>STG-SHS- 1439</b>	2 -4	96h	4,2	+ <sup>b</sup>
	5 -6	84h	4,7	+
	7	72h	5,1	+
	8	60h	5,5	+
	9	48h	6,0	+

<sup>a</sup> O teste de Imunofluorescência Indireta avaliou a presença ou ausência da multiplicação viral em células CER. + = positivo, - = negativo.

<sup>b</sup> Houve a detecção da multiplicação viral a partir da segunda passagem em CER.

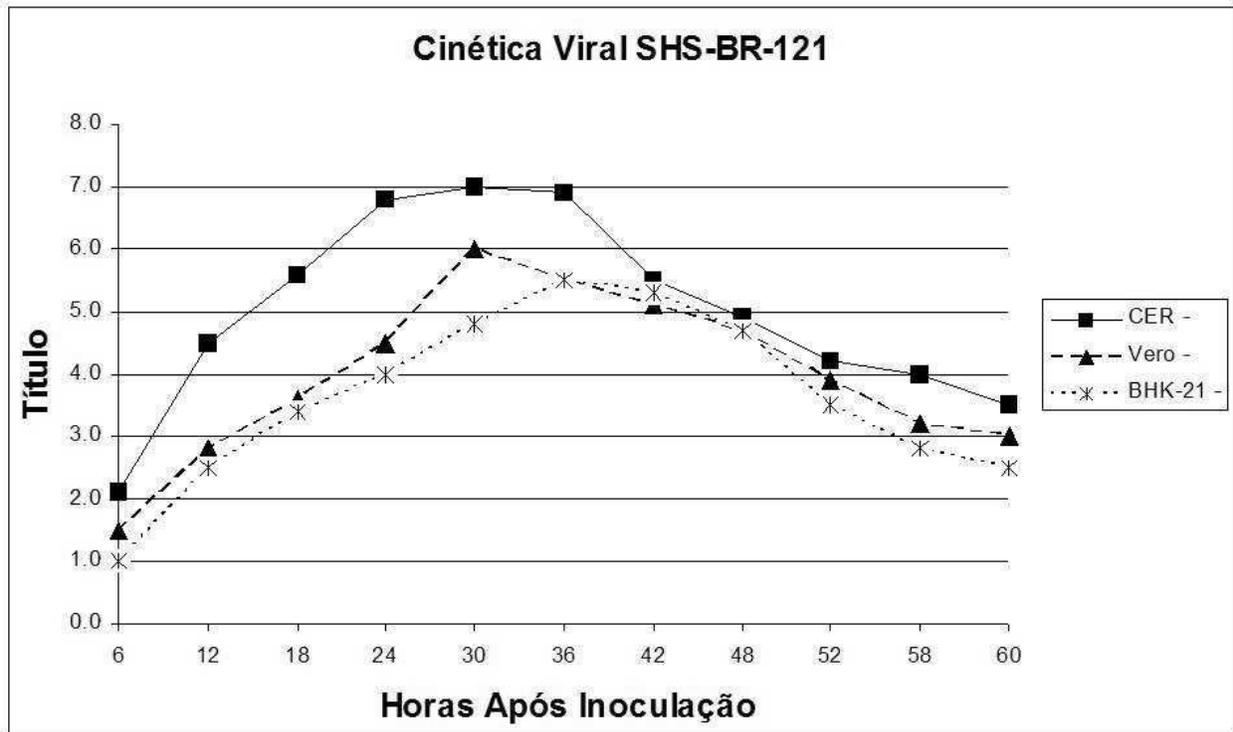
As amostras virais foram aliquotadas e congeladas na nona passagem após a titulação viral para serem utilizadas como estoque de vírus para o estudo de suscetibilidade.

A análise estatística das médias dos títulos das amostras virais SHS-BR-121 e STG-SHS-1439 multiplicadas em CER, utilizando a análise de variância (ANOVA) apresentou diferença estatisticamente significativa ( $P=0,014$ ) com  $p \leq 0,05$ , e a análise com teste t com duas amostras apresentou  $P=0,025$ , sendo esta uma diferença estatisticamente significativa com  $p \leq 0,05$ . Com isto pode-se afirmar com 95% de certeza que existe diferença entre a amostra do subtipo A e B.

#### **4.4 Cinética Viral**

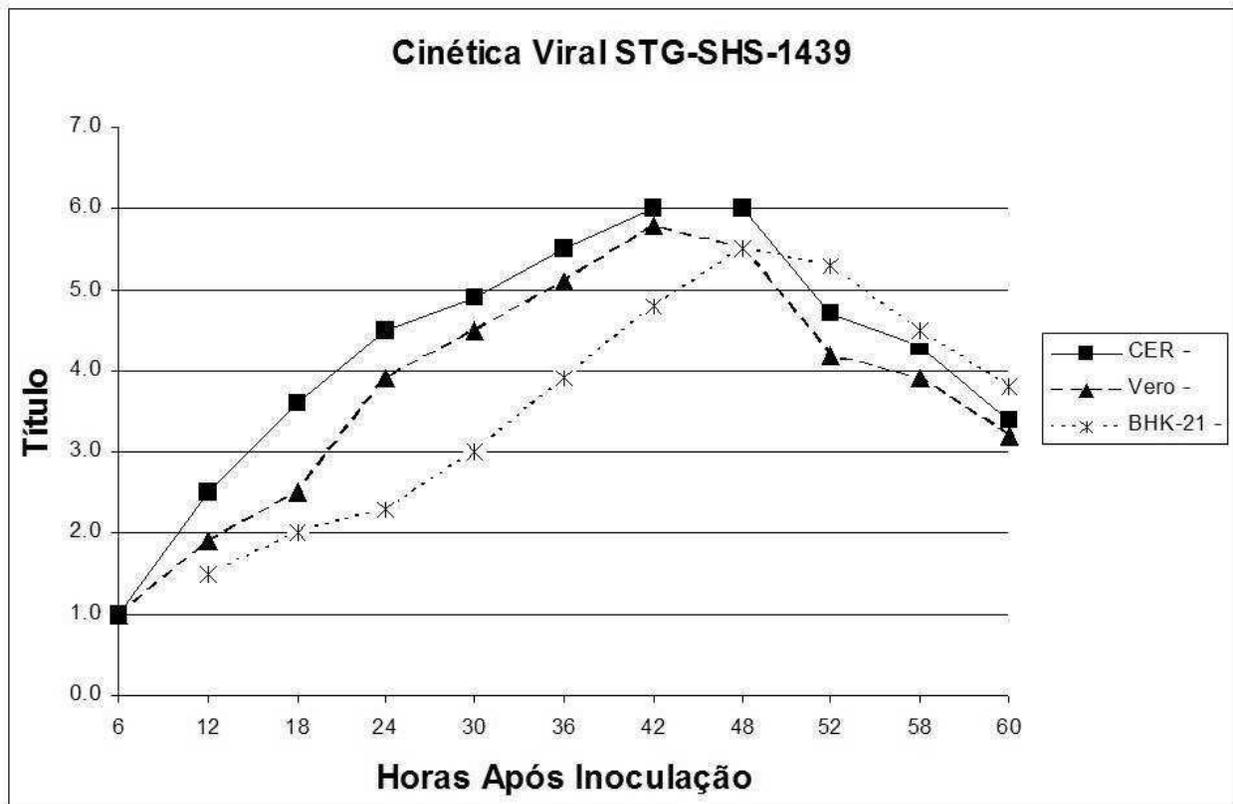
Foi realizado o estudo da cinética viral das amostras SHS-BR-121 e STG-SHS-1439 inoculadas em células CER, Vero e BHK-21. Foi feita a titulação viral 6, 12, 18, 24, 30, 36, 42, 48, 52, 58 e 60 horas após a infecção. O Quadro 2 apresenta o resultado obtido para a amostra SHS-BR-121. O maior título da amostra SHS-BR-121 foi obtido após 30 horas de inoculação em células CER e Vero e após 36 horas em células BHK-21.

Quadro 2: Cinética viral da amostra SHS-BR-121 em células CER, Vero e BHK-21. Os valores correspondem a média de três titulações, em diferentes intervalos de tempo (horas após a infecção)



O Quadro 3 apresenta o resultado obtido para a amostra STG-SHS-1439, sendo o maior título obtido após 42 horas de inoculação em células CER e Vero e 48 horas em células BHK-21. Concordando com a literatura o vírus do subtipo A, aqui representado pela amostra SHS-BR-121 apresenta títulos maiores e necessita menos tempo de inoculação do que o vírus do subtipo B, aqui representado pela amostra STG-SHS-1439.

Quadro 3: Cinética viral da amostra STG-SHS-1439 em células CER, Vero e BHK-21. Os valores correspondem a média de três titulações, em diferentes intervalos de tempo (horas após a infecção).



#### 4.5 Propagação do vírus em diferentes sistemas celulares

Com o objetivo de avaliar a suscetibilidade dos sistemas celulares aos vírus SHS-BR-121 e ao STG SHS 1439 e se houve ou não presença de ECP característico, foram realizadas até cinco passagens dos vírus nos diferentes sistemas. As células que não apresentavam ECP foram congeladas cinco dias após a inoculação e reinoculadas.

As amostras foram colhidas, aliquotadas e tituladas na passagem em que apresentaram o efeito citopático e como comparação todas foram tituladas na quinta passagem. As células que não apresentaram ECP foram tituladas somente na quinta passagem.

Todas as amostras foram tituladas utilizando a célula homóloga, ou seja, na mesma célula onde foram multiplicadas, e em CER uma vez que o estoque do vírus foi produzido nesta célula. Na Tabela 5 são apresentados os resultados referentes ao número de passagens e o título, em célula homóloga, na passagem em que ocorreu a detecção microscópica do ECP em Vero, BHK-21, HEp-2, MDBK, e ED. Nas células Vero e BHK-21 o ECP foi constatado já na segunda passagem, na célula HEp-2 o efeito foi constatado na quinta passagem, na célula MDBK foi constatado pouco efeito somente na última passagem e na célula ED não foi constatado ECP em nenhuma das passagens.

Os resultados apresentados na Tabela 6 demonstram uma diferença nos títulos obtidos na segunda e na quinta passagem das amostras virais nos diferentes sistemas celulares. Quando as amostras virais foram tituladas na célula homóloga, tanto os títulos nas células Vero como em BHK-21 aumentaram. Os títulos na célula MDBK permaneceram os mesmos, pois a titulação anterior já havia sido na quinta passagem.

Tabela 6: Títulos das amostras SHS-BR-121 e STG-SHS-1439 em diferentes sistemas celulares.

<b>Vírus</b>	<b>Tipo de célula</b>	<b>Número da passagem</b>	<b>Título viral (<math>\log_{10}</math>DICC<sub>50</sub>/mL)</b>
SHS-BR-121	Vero	2	5,1
SHS-BR-121	BHK-21	2	4,8
SHS-BR-121	HEp-2	5	4,0
SHS-BR-121	MDBK	5	1,5
SHS-BR-121	ED	-	-
STG-SHS-1439	Vero	2	4,9
STG-SHS-1439	BHK-21	2	4,5
STG-SHS-1439	HEp-2	5	3,8
STG-SHS-1439	MDBK	5	1,3
STG-SHS-1439	ED	-	-

Quando as amostras são tituladas em CER os títulos são maiores do que nas células homólogas, para BHK-21, Vero e MDBK. A diferença constatada na Tabela 6

entre as médias dos títulos do vírus subtipo A, SHS-BR-121, e subtipo B, STG-SHS-1439, pode ser verificada novamente na Tabela 7.

Tabela 7: Títulos das amostras virais SHS-BR-121 e STG-SHS-1439 em células homólogas e em CER.

Tipo de Célula	Log <sub>10</sub> DICC <sub>50</sub> /mL			
	SHS-BR-121		STG-SHS-1439	
	Homóloga	CER	Homóloga	CER
<b>CER</b>	-	7,0	-	6,0
<b>Vero</b>	6,0	6,5	5,5	5,8
<b>BHK-21</b>	5,5	5,8	5,0	5,5
<b>Hep-2</b>	4,5	5,0	4,1	4,9
<b>MDBK</b>	1,5	1,8	1,3	1,5
<b>ED</b>	-	-	-	-

Para avaliar se as diferenças nos resultados encontrados é estatisticamente significativa foram realizados a análise de variância (ANOVA) e o teste t-Student pareado. Nesta análise foram comparados os valores das médias dos títulos obtidos na célula homóloga e o mesmo título correspondente em célula CER.

Quando foram comparadas as médias dos títulos da amostra viral SHS-BR-121 não foi encontrada uma diferença estatisticamente significativa com  $p \leq 0,05$  no teste t-Student. Quando foi feita a mesma análise para a amostra viral STG-SHS-1439 foi encontrada uma diferença estatisticamente significativa na comparação das médias com a titulação em células Vero, BHK-21 e CER ( $p \leq 0,03$ ). Nas análises de variância tanto para SHS-BR-121 como para STG-SHS-1439 encontrou-se um valor de  $p > 0,05$ , portanto pode-se afirmar que as médias não apresentam diferenças estatisticamente significativas.

#### **4.6 Purificação e titulação viral**

O método de purificação utilizou um volume inicial de 2 litros da suspensão viral submetido à purificação resultando em um volume final de 6 mL após a passagem pelo gradiente descontínuo de sacarose. O processo de purificação viral, apesar de efetivo, exige a produção de uma quantidade inicial elevada da amostra viral, pois a concentração protéica do vírus não é alta. O processo de purificação possibilitou que as impurezas presentes no meio fossem eliminadas, principalmente os restos protéicos do tapete celular, resultando na presença de partículas virais concentradas.

O vírus assim concentrado e praticamente livre das impurezas celulares foi utilizado para imunização dos camundongos e para o teste de ELISA.

A amostra viral SHS-BR-121 foi titulada antes e após a purificação para acompanhamento dos títulos, de acordo com Cardoso *et al.* (1996). A concentração protéica das amostras foi determinada através da metodologia de Lowry *et al.* (1951). Os resultados podem ser observados na Tabela 8.

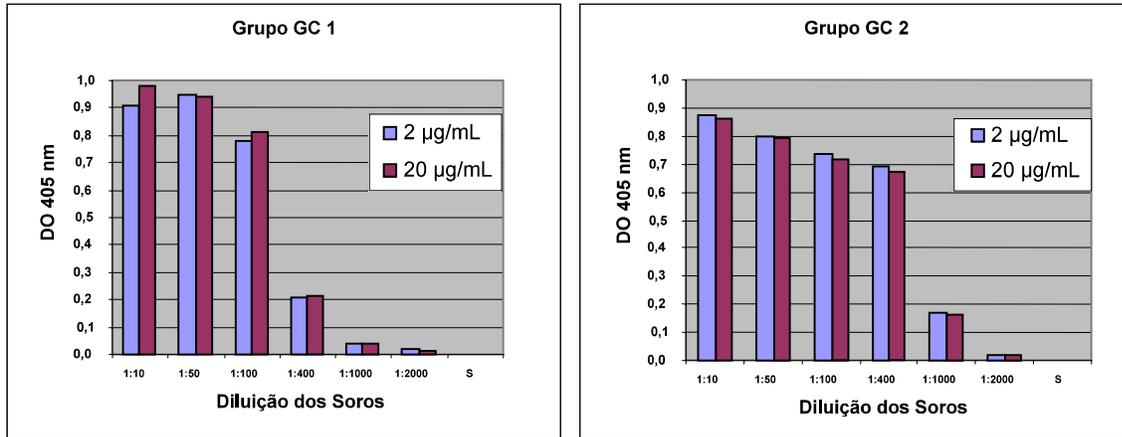
Tabela 8. Títulos e dosagem protéica da amostra viral

AMOSTRA VIRAL SHS-BR-121	Log <sub>10</sub> DICC <sub>50</sub> /mL	CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNA
Antígeno bruto	4,8	134,2 µg/ml
Antígeno colchão descontinuo de sacarose	4,3	41,05 µg/ml

#### **4.7 Padronização do ensaio enzimático (ELISA) para detecção de anticorpos no soro dos camundongos**

Para a detecção dos anticorpos no soro dos camundongos imunizados foi padronizado um ensaio imunoenzimático (ELISA). Os resultados obtidos no teste de ELISA demonstraram que os camundongos responderam ao estímulo antigênico. Foram analisados dois grupos de camundongos imunizados (GC1 e GC2), agrupados em *pool*. Os Gráficos 1 e 2 apresentam os resultados dos soros diluídos a partir de 1:100 até 1:20000. Também foram analisadas as quantidades de 2µg/mL e 20µg/mL de

vírus purificado utilizadas na sensibilização das placas de ELISA. O *cutt off* foi considerado como 4 vezes a DO do soro normal (= 0,030).



**Gráficos 1 e 2:** Testes enzimáticos (ELISA) de soro de camundongo dos grupos GC1 e GC2, com 2 µg/mL e 20 µg/mL de antígeno viral purificado, após 28 dias de imunização.

De acordo com os resultados apresentados não houve diferença entre a utilização de 2µg/mL e 20µg/mL de vírus purificado, sendo que foi utilizada a quantidade de 2µg/mL por ser menor, devido à dificuldade do processo de purificação do vírus.

Em relação a diluição do soro dos camundongos optou-se pela diluição em 1:4000 por ser considerado positivo e permitir a utilização de volumes menores de soro dos camundongos.

## **5. Artigo**

### **PRODUCTION OF MONOCLONAL ANTIBODIES FOR AVIAN METAPNEUMOVIRUS (SHS-BR-121) ISOLATED IN BRAZIL**

**Lia Treptow Coswig, Dagmar Ruth Stach-Machado, Clarice Weis Arns**

*Artigo aceito para a publicação pela Brazilian Journal of Poultry Science, outubro-  
dezembro 2007*

**Production of monoclonal antibodies for Avian Metapneumovirus  
(SHS-BR-121) isolated in Brazil**

Coswig LT; Stach-Machado DR; Arns CW

Departamento de Microbiologia e Imunologia, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas

**Author for correspondence:**

Clarice Weis Arns

Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP

Caixa Postal: 6109

13083-970. Campinas, SP, Brazil

Phone 55 19 35216258

E-mail: [arns@unicamp.br](mailto:arns@unicamp.br)

---

## ABSTRACT

Avian Metapneumovirus (aMPV), also called Turkey Rhinotracheitis Virus (TRTV), is an upper respiratory tract infection of turkeys, chickens and other avian species. Five monoclonal antibodies (MAbs) were created against the Brazilian isolate (SHS-BR-121) of aMPV, MAbs 1A5B8; 1C1C4; 2C2E9 and 2A4C3 of IgG1 and MAb 1C1F8 of IgG2a. Four Mabs (1A5B8; 1C1C4; 2C2E9 and 2A4C3) showed neutralizing activity and three (1A5B8; 1C1C4 and 2A4C3) inhibited cellular fusion *in vitro*. These MAbs were used to investigate antigenic relationship among three strains (SHS-BR-121, STG 854/88 and TRT 1439/91) of aMPV subtypes A and B using cross-neutralization test. The results confirm that the monoclonal antibodies described can be used as a valuable tool in the epizootiological and serological studies, and also for the specific diagnosis of the subtypes in the infection for Avian Metapneumovirus.

**Keywords:** Avian metapneumovirus, Brazil, monoclonal antibodies, neutralizing epitopes.

---

## INTRODUCTION

Avian Metapneumovirus (aMPV) is member of the genus *Metapneumovirus*, family *Paramyxoviridae* (Pringle, 1998). This virus causes turkey rhinotracheitis (TRT), and it is associated with Swollen Head Syndrome (SHS) in chickens. aMPV was first reported in South Africa in the late 1970s, initially in turkeys, and subsequently also in chickens (Buys & Du Preez, 1980; Buys *et al.*, 1989). The disease is clinically characterized by apathy and swelling of the face and infra-orbital sinuses. While mortality rarely exceeds 2%, morbidity may reach 10% and in breeders, egg production is frequently affected (Cook, 2000).

It was initially believed that there was only one serotype of aMPV, within two subtypes (A and B). Four subtypes (A, B, C and D) are currently known, and present extensive differences in the attachment glycoprotein (G) gene sequences (Cook & Cavanagh, 2002, D'Arce *et al.*, 2005). In Brazil, the isolation of aMPV was accomplished by Arns & Hafez in 1995 from infected broiler breeder flocks of States of Minas Gerais and São Paulo. Serum samples from 43 flocks (broilers, broiler breeders, and layers), collected in different regions of Brazil (States of São Paulo, Minas Gerais, and Santa Catarina), were tested for presence of antibodies against the SHS-BR-121 strain. The results showed that 40.65% flocks were positive for anti-aMPV antibodies (Coswig, 1998), proving the wide distribution of this isolate in the country. In Brazil, the sequence of five aMPVs from chickens and one from turkeys were analyzed (Dani *et al.*, 1999; D'Arce *et al.*, 2005). aMPV subtypes can be differentiated by nucleotide sequence analyses (Juhasz & Eaton, 1994), and using MAbs (maternal antibodies) (Collins *et al.*, 1993; Cook *et al.*, 1993). Different MAbs were produced against aMPV, demonstrating the existence of considerable antigenic variability among strains (Collins *et al.*, 1993; Cook *et al.*, 1993). In Japan, MAbs were used to investigate the antigenic relationship among strains of aMPV. That study demonstrates that the Japanese strains present antigenic differences from British isolates (Tanaka *et al.*, 1996; Obi *et al.*, 1997). In the present study, we produced MAbs against the SHS-BR-121 strain, and used them to compare the SHS-BR-121 strain with two aMPV strains isolated in Germany by cross-neutralization test.

## **MATERIAL AND METHODS**

### **Virus sources**

The SHS-BR-121 strain of aMPV isolated from chickens with SHS in Brazil (Arns & Hafez, 1995) was used. The other aMPV isolates were STG 854/88 and TRT 1439/91, isolated in Germany (Hafez, 1993), belonging to subtypes A and B, respectively. The strains were propagated in chicken-embryo related (CER) cell line (Ferreira *et al.*, 2003). The infected cell culture was maintained at 37°C until extensive

cytopathic effect was observed. The SHS-BR-121 virus was purified by differential ultracentrifugation and by sedimentation through a 20-60% discontinuous sucrose gradient at 53000 X g for 90 min. The virus band was collected and used for immunization of mice and ELISA antigens. The other viruses were purified as described.

### **Production of monoclonal antibodies**

Hybridomas secreting aMPV-specific antibodies were derived from three experiments by fusion of myeloma line cells Sp2/0 with spleen cells of BALB/c mice immunized with SHS-BR-121 according to the standard procedure described by Köhler & Milstein (1975). Five mice were immunized by intraperitoneal inoculation on days 1, 14, and 28, respectively. In the first injection, each mouse was inoculated with 15 mg purified virus, mixed with equal volume of Freund's complete adjuvant (Sigma, St. Louis, Mo, USA). The same amount of virus was mixed with an equal volume of Freund's incomplete adjuvant in the second and third injections. Twelve days after cell fusion, hybridoma colonies were screened for the presence of aMPV-specific antibodies by an indirect antigen-coating plate enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) using microplates coated with the aMPV soluble antigen. Hybridoma colonies presenting positive reaction were transferred to wells of 24-well tissue culture plates, and retested before being submitted to limited dilutions cloning (Cook *et al.*, 1993).

### **Isotypes determination**

The immunoglobulin subclasses secreted by the hybridomas were determined by ELISA using a commercial kit (ImmunoPure<sup>®</sup> Monoclonal Antibody Isotyping Kit II - Pierce).

### **Production of antibodies in ascitic fluid**

Ascitic fluid containing MAbs was produced by injecting 10<sup>5</sup> hybridoma cells into the peritoneal cavity of pristine-primed BALB/c mice. After 10-14 days, ascitic fluid was collected and tested for antibody titers by indirect ELISA. All biological assays were performed using MAb from ascitic fluids.

## **ELISA**

Each of the MAbs used in this study was tested by indirect ELISA on plates coated overnight with aMPV antigen purified from strain SHS-BR-121 grown in CER cultures. Individual microplates wells were coated with viral antigen diluted to give 2 mg of protein per well. The conjugate was goat anti-mouse IgG heavy-chain alkaline phosphatase, and the substrate para-Nitrophenyl Phosphate (pNPP). Incubation times were 1 h at 37 °C, and volumes per cavity were 100 mL. Serum samples with optical densities (OD) of 2 standard deviations above the ODs for the negative controls were considered positive for aMPV antibodies. Each plate contained multiple positive and negative serum samples to serve as controls.

## **Biological activities**

MAbs biological activities were examined using fusion and neutralization-inhibition tests, as described by Beller & van Wyke Coelingh (1989).

### **Fusion inhibition**

The fusion inhibition assay was performed to identify MAbs that inhibit syncytium formation *in vitro*. CER cell monolayers in 96-well plates were infected with 100 TCID<sub>50</sub> of the SHS-BR-121 strain, incubated for 1h at 37°C, the inoculum was removed, and the monolayer was washed twice with MEM to remove unadsorbed virus. Serial twofold dilutions of MAbs were then added to each well. Five days later, monolayers were examined microscopically for cytopathic effects.

### **Viral neutralization**

The test of viral neutralization was performed to analyze the ability of MAbs to neutralize SHS-BR-121 strain infectivity and to prevent syncytium formation *in vitro*. For this, the procedures were described by Beeler & van Wyke Coelingh (1989). Serial twofold dilutions of MAbs were mixed with 100 TCID<sub>50</sub> of strain SHS-BR-121, and incubated for 1 hr at 37°C. Subsequently, virus-antibody mixtures were transferred to

CER monolayers in 96-well plates, incubated for 5 days (37°C / 5% CO<sub>2</sub>), and observed as described for the fusion inhibition assays.

The neutralization and fusion inhibition titers were expressed as the reciprocal of MAbs maximum dilution, which completely inhibited the infection and syncytium formation *in vitro*, respectively.

### **Cross-neutralization test**

The cross-neutralization test with MAbs was used to analyze the antigenic relationships among three aMPV strains (SHS-BR-121, STG 854/88 and TRT 1439/91). Cross-neutralization tests with MAbs were performed using a modification of the procedure described by Collins *et al.* (1993). MAbs were tested against each sample, diluted in base 2. The cross-neutralization test was carried out as described above. The sera that did not present neutralizing activity at 1:64 dilution or below were considered negative.

## **RESULTS AND DISCUSSION**

This paper describes the production of monoclonal antibodies against aMPV (SHS-BR-121) isolated in Brazil (Arns & Hafez, 1995) from broiler breeder flocks in the States of São Paulo and Minas Gerais. Previous studies reported close antigenic relationships among aMPV isolates. Studies of Obi *et al.* (1997) indicated similarities among different aMPV strains using conventional diagnosis techniques. The use of MAbs for the characterization of aMPV strains is helpful in antigenic relationship studies, and enable the recognition of specific epitopes; polyclonal antibodies do not have this capacity (Cook *et al.*, 1993). Therefore, we produced MAbs, and obtained five hybridoma cell lines (1A5B8; 1C1C4; 2C2E9; 1C1F8 and 2A4C3) for the antigen of SHS-BR-121 aMPV strain.

ELISA results are shown in Table 1. The cut-off point for optical densities was determined with normal serum, diluted 1:100, with OD < 0,030.

**Table 1** - Properties of monoclonal antibodies created against the SHS-BR-121 strain of Avian Metapneumovirus.

MAbs	ELISA (OD) <sup>a</sup>	Isotype <sup>b</sup> Subclass	Biological activities	
			Viral Neutralization <sup>c</sup>	Inhibition of cell fusion
1A5B8	0,222	IgG1	256	1024
1C1C4	0,248	IgG1	128	1024
1C1F8	0,216	IgG2a	<2	<2
2C2E9	0,211	IgG1	<2	256
2A4C3	0,266	IgG1	256	128

a.Optical density (OD) of control antigen < 0,030; means of three repetitions. b.Isotype subclass of immunoglobulin was determined using a commercial kit (ImmunoPure<sup>®</sup> Monoclonal Antibody Isotyping Kit II Pierce). c.Reciprocal of dilution ( $\log_2$ ) that neutralized 100 TCID<sub>50</sub> of SHS-BR-121 strain.

Values presented are the mean of three repetitions.

Analyses for the antibody isotypes showed that four belonged to the IgG1 subclass (1A5B8; 1C1C4; 2C2E9 and 2A4C3) and one to IgG2a (1C1F8) (Table 1).

MAbs were also evaluated for their capacity to neutralize viral infectivity and to inhibit syncytium formation *in vitro*. The production of three clones (MAbs 1A5B8, 1C1C4 and 2A4C3) neutralized and inhibited the formation of syncytia by SHS-BR-121 aMPV, as shown in Table 1. These MAbs were efficient SHS-BR-121 inhibitors. Two MAbs (1C1F8 and 2C2E9) did not show neutralizing activity, while one MAb (1C1F8) did not show fusion inhibition activity. Our findings are similar to the results obtained for human respiratory syncytial virus (HRSV) and bovine respiratory syncytial virus (BRSV) in relation to the inhibitory activity for fusion and neutralization (Matheise *et al.*, 1995; Tanaka *et al.*, 1996). Protein F probably plays an important role in this case. It is suggested that the neutralization epitopes are the same as or very similar to the fusion-active site on protein F (Tanaka *et al.*, 1996). The two major antigens of aMPV are the F (fusion) and the G (attachment) proteins. Both form independent projections on the virus surface, which mediate adsorption and fusion of the virus envelope with the cell membranes (Easton & Juhasz, 1994), and these proteins induce neutralizing antibodies (Collins *et al.*, 1993). Two MAbs obtained in this study were not able to neutralize viral infectivity, but inhibited syncytium formation; ICIF8 and 2C2E9 inhibited possible due to

reaction to F protein. The reason may be a consequence of a variation of the epitopes of those proteins (Obi *et al.*, 1997). The aMPV strain SHS-BR-121 isolated in Brazil presents differences some antigenic properties as compared to the two strains isolated in Germany. These results indicate that antigenic divergence between aMPV may occur.

In cross-neutralization tests, all of the MAbs presented neutralizing activity against the homologous virus. As the heterologous viruses TRT 1439/91 and STG 854/88, MAbs C1F8 and 2C2E9 presented positive reaction (Table 2). Studies on antigenic relationships using conventional techniques indicated close similarities between different aMPV isolates (Gough & Collins, 1989). Antigenic variations of F and G proteins in respiratory syncytial virus (RSV) and aMPV (Beeler & van Wyke Coelingh, 1989; Collins *et al.*, 1993) were reported. These results suggest the antigenic variation amongst aMPV strains may be dependent on F and G proteins. Mab 1C1F8 reacted with aMPV subtypes A and B, possibly in a conserved region not related to neutralization. Some Mabs produced by Matheise *et al.* (1995) recognized both a bovine respiratory syncytial virus (BRSV) and human respiratory syncytial virus (HRSV) strains, demonstrating the existence of conserved epitopes in these viruses.

**Table 2** - Cross-neutralization test using MAbs and different aMPV strains.

aMPV <sup>a</sup> Virus strain	MAb				
	1A5B8	1C1C4	1C1F8	2C2E9	2A4C3
SHS-121-BR	1024 <sup>b</sup>	1024	<2	1024	512
TRT 1439/91	-	512	-	128	512
STG 854/88	-	-	-	128	-

a.The different samples were tested against each monoclonal antibody. b.Titers are expressed as the reciprocal of dilution (log<sub>2</sub>) that neutralized 100 TCID<sub>50</sub>.

The relationship between neutralization epitopes and fusion sites of the F protein of aMPV should be further analyzed.

The development assays with these MAbs will constitute important tools for the analyses of the antigenic properties of aMPV, and will aid the characterization of aMPV isolates and strains.

### **Acknowledgments**

The authors thank GF Davi, JRR dos Reis, and JB Camargo for their valuable technical assistance. L. T. C. received a grant of FAPESP (97-13946-5).

### **REFERENCES**

Arns CW, Hafez HM. Isolation and identification of Avian Metapneumovirus from broiler breeder flocks in Brazil. In: Jensen MM, editor. Proceedings of the 44st Western Poultry Diseases Conference; 1995; Sacramento, California,USA; 1995. p.124-125.

Beeler JA, van Wyke Coelingh K. Neutralization epitopes of the F glycoprotein of respiratory syncycial virus: effect of mutation upon fusion function. Journal of Virology, v. 63, p. 2941-2950. 1

Buyes SB, Du Preez JH. A preliminary report on the isolation of a virus causing sinusitis in turkeys in South Africa and attempts to attenuate the virus. *Turkeys* 1980; 28:36-46.

Buyes SB, Du Preez JH, Els HJ. Swollen head syndrome in chickens: a preliminary report on the isolation of a possible aetiological agent. *Journal of South African Veterinary Association* 1989; 60: 221-222.

Collins MS, Gough RE, Alexander DJ. Antigenic differentiation of Avian Metapneumovirus isolates using polyclonal antisera in mouse monoclonal antibodies. *Avian Pathology* 1993; 22:469- 479.

Cook JKA, Cavanagh D. Detection and differentiation of Avian Metapneumoviruses (metapneumoviruses). *Avian Pathology* 2002; 31:117-132.

Cook JKA. Avian Metapneumovirus infections of turkeys and chickens. *The Veterinary Journal* 2000; 160:118-125.

Cook JKA, Jones BV, Ellis MM, Jing L, Cavanagh D. Antigenic differentiation of strains of turkey rhinotracheitis virus using monoclonal antibodies. *Avian Pathology* 1993; 22:257-273.

Coswig LT. Presença de anticorpos contra Pneumovírus Aviário nas regiões Sul e Sudeste do Brasil [dissertação]. Pelotas (RS): Universidade Federal de Pelotas; 82 p. 1998.

D'Arce RCF, Coswig LT, *et al.* Subtyping of new Brazilian avian metapneumovirus isolates from chickens and turkeys by reverse transcriptase-nested-polymerase chain reaction. *Avian Pathology*, v. 34, p. 133-136. 2005

Dani MA, Durigon EL, Arns CW. Molecular characterization of Brazilian Avian Metapneumovirus isolates: comparison between immunochemiluminescent Southern blot and nested PCR. *Journal of Virological Methods*, v. 79, p. 237-241. 1999

Ferreira HL, Pilz D *et al.* Infectious bronchitis virus replication in the chicken embryo related cell line. *Avian Pathology*, v. 32, p. 413-417. 2003

Gough RE & Collins MS. Antigenic relationships of three turkey rhinotracheitis viruses. *Avian Pathology*, v. 18, p. 227-238. 1989

Hafez HM. The role of pneumovirus in the swollen head syndrome of chickens. *Review für Archiv Geflügelkunde*, v. 57, p. 181-185. 1993

Juhász K & Easton AJ. Extensive sequence variation in the attachment (G) protein gene of Avian Metapneumovirus: evidence for two distinct subtypes. *Journal of General Virology*, v. 75, p. 2873-2880. 1994

Köhler G & Milstein C. Derivation of specific anti-body producing tissue culture and tumor lines by cell fusion. *European Journal Immunology*, v. 6, p. 511-519. 1975

Matheise JP, Walravens K, *et al.* Antigenic analyses of the F protein of the bovine respiratory syncytial virus: identification of two distinct antigenic sites involved in fusion inhibition. *Archives of Virology*, v. 140, p. 993-1005. 1995

Obi T, Kokumai A, Takuma H, Tanaka M. Antigenic differentiation of virus of Turkey Rhinotracheitis strain using monoclonal antibodies and polyclonal antisera. *Journal Veterinary Medical Science* 1997; 59:795-799.

Pringle CR. Virus taxonomy . *Archives of Virology* 1998; 143: 1449-1459.

Tanaka M, Obi T, Takamuma H, Kokumai N, Higashihara R, Hiramatsu K, Shimizu Y. Inhibition of cell fusion by neutralising monoclonal antibodies to F<sub>1</sub> protein of Turkey Rhinotracheitis Virus. *Journal Veterinary Medical Science* 1996; 58:581-582.

## 6. Discussão

O Metapneumovírus Aviário (AMPV), agente viral envolvido no quadro de Síndrome da Cabeça Inchada (SCI), tem sido amplamente estudado em grande parte do mundo devido aos prejuízos econômicos que causa em criações de perus e galinhas. No Brasil o AMPV acomete produções comerciais de frangos e corte, matrizes e aves de postura e também está presente em criações de perus (D'Arce *et al.*, 2005). O vírus já foi isolado tanto de galinhas como de perus e foi realizado seu diagnóstico sorológico nas mesmas criações.

O Brasil ocupa lugar de destaque na produção avícola mundial, sendo atualmente o maior exportador mundial, produzindo 8,49 milhões de toneladas de carne de frango e 23,9 bilhões de ovos. O desempenho do frango de corte deu à avicultura destaque ainda maior na economia brasileira, possibilitando que a população consumisse um produto protéico de alta qualidade, sanidade e baixo custo e, mediante as exportações, uma expressiva receita cambial.

Entre as enfermidades que preocupam o setor avícola mundial a SCI é uma das apresentam importância, sendo caracterizada por uma infecção do trato aéreo superior e infecção do aparelho reprodutivo, determinando diminuição na produção de ovos. A infecção viral inicial geralmente é complicada pela infecção bacteriana secundária, determinando uma alta morbidade e mortalidade (Naylor & Jones, 1993; Cook & Cavanagh, 2002).

Desde que foi relatada pela primeira vez em 1984 na África do Sul, vem ocorrendo em outros países (Cook & Cavanagh, 2002). A dificuldade do diagnóstico baseado somente nos sinais clínicos levou ao desenvolvimento de trabalhos no sentido de adaptar o AMPV em culturas celulares, com o objetivo de utilizá-las nos testes sorológicos de Soroneutralização (SN), ELISA e Imunofluorescência (IF) para a detecção de anticorpos (Jones, 1996). O uso de anticorpos monoclonais e de técnicas moleculares permitiu a diferenciação entre os subtipos do vírus (Collins, *et al.*, 1993; Cook *et al.*, 1993, Cook & Cavanagh, 2002).

Métodos de diagnóstico do AMPV incluem a detecção ou isolamento do vírus, demonstração de anticorpos específicos e técnicas moleculares. O isolamento deste tipo de vírus a partir de amostras de campo não é fácil, e por motivos não explicados, o isolamento de amostras a partir de frangos parece ser mais difícil (Cook & Cavanagh, 2002). Para o isolamento inicial a partir de amostras de campo, tanto de perus como frangos, utiliza-se inoculação no saco vitelínico de ovos embrionados (Patnayak, *et al.*, 2006), ou cultura de anéis de traquéia de embriões de peru ou frango (Cook, 2000).

O diagnóstico laboratorial que inclui o isolamento viral e a propagação do vírus apresenta uma maior possibilidade de identificação de novos subtipos do vírus. Se a técnica de PCR falha e a microscopia eletrônica e/ou técnicas de sorológicas indicam a presença do AMPV pode-se desenvolver um outro teste de PCR (Jirjis, *et al.*, 2000).

O uso de cultura de anel de traquéia para o isolamento do AMPV tem sido usado por vários laboratórios. Em nosso estudo o efeito ciliostático foi observado após a terceira passagem das amostras virais em cultura de anel de traquéia (TOC). Cook &

Cavanagh (2002) citam que a observação da ciliostase pode ser feita entre 5 a 7 dias após a inoculação do material, sendo necessárias de 3 a 5 passagens cegas. Cook (2000) produziu o vírus utilizado para desafio de teste de vacina em cultura de anel de traquéia. Baxter-Jones *et al.* (1989) e Zande *et al.* (1999) também utilizaram este sistema celular para o isolamento do AMPV a partir de amostras de campo.

Mesmo sendo um sistema bastante utilizado até hoje, nem todos os AMPVs apresentam a característica de causar ciliostase. Cook & Cavanagh (2002) relatam que o AMPV isolado nos Estados Unidos da América não causa ciliostase, sendo que seu isolamento foi realizado utilizando ovos embrionados. Como não existem estudos comparando o isolamento do AMPV em cultura de anel de traquéia e em ovos embrionados, a escolha do método depende de uma decisão de cada laboratório.

A utilização de fibroblasto de embrião de galinha (FEG) normalmente é realizada após o isolamento em cultura de anel de traquéia ou ovos embrionados. É um sistema celular bastante sensível e a adaptação do AMPV ocorre rapidamente. Após a passagem em TOC, quando da observação da ciliostase, foi realizada a passagem das amostras virais em FEG, sendo detectado o efeito citopático (ECP) na quarta passagem neste sistema celular. Em 1989 Baxter-Jones *et al.* fizeram a produção de antígeno vacinal após a adaptação do AMPV em FEG. Eles observaram o ECP entre 24 e 72 horas após a inoculação.

Além da adaptação do vírus após isolamento em outro sistema celular, foi realizado o isolamento do AMPV diretamente em FEG. Após seis passagens cegas, do material de campo, em FEG observou-se o aparecimento do ECP e após dez

passagens o título viral aumentou consideravelmente. Patanayak *et al.* (2002) realizaram o isolamento do subtipo C do AMPV após sete passagens cegas em FEG, e após o vírus foi adaptado em células Vero para produção de antígeno vacinal. Goyal *et al.* (2002) conseguiram realizar o isolamento do AMPV a partir de material de campo diretamente em FEG, mas não conseguiram isolar o vírus em células Vero. Observaram que após o isolamento o vírus pode ser adaptado com sucesso nesta célula. O aparecimento do ECP característico em FEG foi detectado após a segunda passagem.

A utilização de cultura de anel de traquéia, ovos embrionados e mesmo FEG exigem que o laboratório possua um fornecimento constante de ovos embrionados ou pintos de um dia SPF. Estes são sistemas celulares mais onerosos, pois as células precisam ser preparadas a cada novo uso, ou cada nova passagem do material, exigindo mão de obra qualificada e ovos e pintos disponíveis. Além do fator custo, a sociedade vem solicitando que o uso de seres vivos para pesquisas e produção de vacinas seja mais racional, e somente quando não houver outro sistema disponível que ofereça o mesmo resultado.

O uso de sistemas celulares a partir de linhagens já estabelecidas tem sido demonstrado em vários trabalhos de pesquisa. Tanaka *et al.* (1997), Goya *et al.* (2000) e Abiko *et al.* (2007) são exemplos, onde foram realizados os isolamentos virais em linhagens celulares como Vero, QT-35, HEp-2 entre outras, demonstrando a possibilidade de isolamento e produção viral.

Para a multiplicação e titulação da amostra das amostras virais SHS-BR-121 e STG-SHS-1439 utilizou-se a linhagem celular CER (chicken embryo related). Esta

linhagem celular é utilizada para multiplicação do AMPV (Hafez e Weiland, 1990), vírus rábico (Smith *et al.*, 1977) e vírus da bronquite infecciosa (Ferreira *et al.*, 2003). Esta célula é usada como rotina no Laboratório de Virologia Animal/DMI/IB/Unicamp. Foi realizada a multiplicação das amostras virais SHS-BR-121 e STG-SHS-1439, sendo que a primeira amostra apresentou ECP na quarta passagem e a segunda amostra já apresentou efeito na segunda passagem. Após a observação do efeito citopático foi realizada a titulação para acompanhamento. Além da titulação, a cada passagem foi realizado o teste de imunofluorescência Indireto (IFI). O uso de IFI permite a detecção do antígeno viral antes da presença do ECP, que pode requerer de 4 a 5 passagens para ser observado dependendo do vírus e da célula. Jirjis *et al.* (2002) demonstraram que após 24 horas após a inoculação já é possível verificar a presença do AMPV em células Vero inoculadas, sendo que o efeito citopático ainda não era visível.

A análise estatística realizada, avaliando os títulos das amostras virais SHS-BR-121 e STG-SHS-1439 multiplicadas em CER demonstrou que houve diferença estatisticamente significativa entre os títulos do subtipo A e B. Em todo o nosso estudo pudemos comprovar estatisticamente que houve diferença significativa entre os títulos obtidos para o subtipo A e B. Estes dados concordam com aqueles encontrados por Zande *et al.* (1999) que demonstraram que o título viral e a porcentagem de células imunofluorescentes foram menores para o subtipo B. O estudo demonstrou uma diferença entre os subtipos A e B de até 1  $\log_{10}$ . Os pesquisadores verificaram que somente o subtipo A tem capacidade de invadir o trato respiratório inferior e infecta mais células epiteliais em todo o trato respiratório superior em relação ao subtipo B.

A cinética da multiplicação viral para as duas amostras de AMPV estudadas foi realizada para um melhor conhecimento do ciclo do vírus em diferentes linhagens celulares. As duas amostras virais foram inoculadas em três linhagens celulares: CER, Vero e BHK-21, conforme pode ser observado nos Quadros 2 e 3. Pode-se constatar que as amostras virais estão bem adaptadas em células CER, pois o pico dos títulos ocorreu em células CER, e também pode-se observar que a amostra SHS-BR-121 apresenta os maiores títulos em um período de tempo inferior ao da amostra STG-SHS-1439. Estes dados concordam o que foi encontrado anteriormente na análise estatística em relação ao subtipo A e B.

A literatura cita diversas linhagens celulares que são utilizadas para o isolamento e propagação do AMPV. No Laboratório de Virologia Animal/DMI/IB/Unicamp existem várias linhagens celulares que são utilizadas rotineiramente ou não para diversos vírus, então buscou-se avaliar a suscetibilidades de seis sistemas celulares (CER, Vero, BHK-21, HEp-2, MDBK e ED) para a multiplicação das duas amostras virais. As células CER e Vero são utilizadas na multiplicação do AMPV, as células ED são utilizadas para o Herpesvírus Eqüino, as células MDBK são utilizadas eventualmente para o Vírus Respiratório Sincicial Bovino e as células HEp-2 são utilizadas para o Metapneumovírus Humano. As células BHK-21 foram incluídas no estudo por estarem disponíveis no laboratório e por serem citadas na literatura como sendo viáveis para a multiplicação do AMPV.

O resultado da avaliação da suscetibilidade é apresentado nas Tabelas 5 e 6. As amostras foram inoculadas por cinco passagens, observando a presença de ECP característico. O estoque viral foi produzido em células CER. Nas células Vero e BHK-21 o

ECP foi constatado na segunda passagem, na célula HEp-2 na quinta passagem, na célula MDBK pouco efeito na quinta passagem e na célula ED não foi constatado ECP em nenhuma passagem. Foi realizada a titulação viral na segunda e quinta passagem, conforme o aparecimento do ECP. Também foi realizado um estudo comparativo de titulação viral. A última passagem das amostras virais nas seis linhagens celulares foi congelada e titulada. Foi feita a titulação na célula homóloga, onde o vírus foi produzido, e em CER, célula onde foi realizada a multiplicação do vírus para a formação do estoque viral. Provavelmente o efeito citopático não tem relação direta com o aumento do título viral, pois a visualização do ECP pode demorar, dependendo da célula, até 72 horas enquanto que a presença do AMPV pode ser detectada em 24 horas pela IFI.

Kong *et al.* (2006) observaram que os títulos de AMPV multiplicados cultivo primário de células aviárias comparados com células Vero são menores. O trabalho demonstra que o AMPV multiplicou-se em células FEG e QT-35 com baixos títulos, enquanto que as células Vero apresentaram um título viral maior. Estas diferenças não podem ser demonstradas na quantificação das proteínas N e P, provavelmente são codificadas por outros genes do AMPV responsáveis pela adsorção e multiplicação viral.

Em 2006 Tiwari *et al.* testaram a permissividade do AMPV em dezessete sistemas celulares, sendo o estoque viral produzido em células Vero. As células BHK-21 apresentaram um título viral maior que células Vero, enquanto que nas células MDBK e ED não foram constatadas multiplicação viral. Os resultados encontrados no nosso trabalho confirmam as informações da literatura, pois encontramos títulos em células BHK-21 que não diferiram estatisticamente daqueles encontrados em CER. Nas células MDBK e ED inoculadas com as amostras virais, foi observado pouca presença de ECP na

primeira e nenhum ECP na segunda célula, sendo o título viral bastante baixo para a primeira célula e nenhum para a segunda. Patnayak *et al.* (2005) também utilizaram diferentes sistemas celulares para o estudo e demonstraram que os títulos virais obtidos não foram estatisticamente diferentes quando comparados entre a titulação em células homólogas e em Vero. Perini *et al* (2007) utilizaram células HEp-2 com sucesso para isolamento do Metapneumovírus humano, com aparecimento do ECP entre dois a três dias após a inoculação. Em nosso estudo pudemos constatar que esta célula também pode ser utilizada como substrato para a multiplicação de amostras de AMPV.

Como um dos fatores importantes hoje na produção de antígenos para os testes sorológicos e para a produção de vacinas é o custo, o ideal é que se tenha uma multiplicação com altos títulos em linhagens celulares.

Para a purificação da amostra viral foi utilizada a técnica de gradiente descontínuo de sacarose, que apresentou bons resultados. Dentre as técnicas de purificação citadas na literatura foi utilizada a descrita por Gough & Collins (1989), com modificações. A purificação viral é citada por diversos autores, tanto para obtenção de uma amostra com menos resíduos celulares para a visualização na microscopia eletrônica como também para a produção dos anticorpos monoclonais. Nesta etapa utilizou-se um gradiente de sacarose de 20 e 60% (p/p), sendo que os resultados encontrados concordam com aqueles obtidos por Tanaka *et al.* (1996) e Obi *et al.* (1997), que também realizaram a purificação do vírus antes da imunização dos camundongos.

A purificação viral antes da imunização dos camundongos tem sido utilizada por outros autores, sendo que em 1989 Beeler & van Wyke Coelingh, utilizaram gradiente de sacarose de 30 e 60% para purificar a amostra do Vírus Respiratório Sincicial (RSV) e Matheise *et al.* (1995) utilizaram um gradiente de 20 e 70% para produção dos anticorpos monoclonais para o Vírus Respiratório Sincicial Bovino (BRSV). Veits *et al.* (2003) utilizou a técnica de purificação para o vírus da Laringotraqueíte Infecciosa das aves para a produção de anticorpos monoclonais. O vírus passou por um ciclo de ultracentrifugação a 22000 X g, e centrifugação em gradiente descontínuo de sacarose 30, 40 e 50% (p/p), sendo o vírus retirado da interface de 40 – 50% e ressuspenso em PBS.

De acordo com os objetivos do nosso trabalho, foram produzidos anticorpos monoclonais contra o AMPV através dos processos de fusão de um *pool* de células esplênicas dos camundongos imunizados e células de mieloma Sp2/0-Ag-14. Após a clonagem foram selecionados cinco hibridomas que permaneceram secretores de anticorpos (1A5B8, 1C1C4, 1C1F8, 2C2E9 e 2A4C3) para os testes de neutralização viral e inibição da fusão,

Para a detecção de anticorpos para o AMPV, tanto no soro de galinhas como de perus utiliza-se o teste imunoenzimático ELISA e autores que trabalham na produção de anticorpos monoclonais para os mais variados patógenos o escolhem por ser rápido, sensível e relativamente barato (Heckert *et al.*, 1994).

Para sensibilização das placas de ELISA o antígeno pode ser preparado em diferentes substratos, incluindo cultura de anéis de traquéia, fibroblasto de embrião de

galinha, células Vero e CER (Matheise *et al*, 1995; Cook & Cavanagh, 2002), podendo ser purificado ou não, e isto depende das condições do laboratório e do tipo de patógeno utilizado.

Chettle & Wyeth (1988), utilizaram placas sensibilizadas com 2µg/poço de antígeno viral purificado para detecção de anticorpos para AMPV, enquanto Tanaka *et al*. (1996) utilizaram 1µg/poço de antígeno viral purificado para sensibilizar as placas de ELISA. Em nosso experimento foram utilizadas 2µg/poço, uma vez que foram testadas as concentrações de 2 e 20µg/poço, de acordo com os Gráficos 1 e 2. Como o processo de purificação do vírus é trabalhoso e não houve diferença significativa nos resultados, optamos por utilizar a quantidade menor de antígeno purificado, concordando assim com o que foi encontrado por Chettle & Wyeth (1988).

Os anticorpos monoclonais podem ser utilizados em testes de ELISA para detectar antígeno e podem ter utilidade para testes de ELISA indiretos e ELISA de bloqueio, de maneira similar aos testes aplicados para diagnóstico sorológico para rinotraqueíte bovina, peste suína clássica e Newcastle (Veits *et al*, 2003). Em nosso trabalho, para detecção de anticorpos nos camundongos imunizados e também para seleção dos clones produtores de anticorpos para a amostra SHS-BR-121 e verificação dos anticorpos no fluido ascítico produzido em camundongos, foi escolhido o teste de ELISA indireto, que se mostrou bastante sensível.

Czifra *et al* (1996) usaram ELISA indireto para seleção dos hibridomas produzidos para o vírus de Newcastle (VNC), e posteriormente utilizaram os anticorpos monoclonais, em um ELISA de bloqueio, para diferenciação dos sorogrupos do vírus de

NC ou para monitorar a disseminação do vírus na população aviária. Para os autores o uso de anticorpos monoclonais no teste de ELISA tem apresentado melhores resultados que o teste de hemaglutinação.

Na caracterização dos anticorpos monoclonais realizada através da isotipagem, todos os anticorpos puderam ser isotipados. A vantagem do kit utilizado é a facilidade no manuseio aliado à rapidez dos resultados. Diversos autores utilizam kits comerciais em seus experimentos (Beeler & van Wyke Coelingh, 1989; Tanaka *et al.*, 1996; Karaca *et al.*, 1992; Veits *et al.*, 2003). Em nosso experimento obtivemos resultados de isotipagem semelhantes àqueles encontrados por Tanaka *et al.* (1996) e Obi *et al.* (1997), que também encontraram os isotipos IgG1 e IgG2a e IgG2b, utilizando amostras de AMPV.

Para a obtenção de uma quantidade maior de anticorpos podemos utilizar o cultivo *in vitro* ou então através da indução de fluido ascítico na cavidade peritoneal de animais experimentais (Obi *et al.*, 1997).

O fluido ascítico foi obtido após inoculação dos hibridomas 1A5B8 e 1A4C3 em camundongos previamente estimulados com Nujol (óleo mineral). Esta substância induz um processo inflamatório na cavidade peritoneal promovendo a secreção de um fluido denominado ascite. Foram obtidos respectivamente um total de 10 e 13,5 mL dos camundongos induzidos. Outra substância que pode ser utilizada na indução do ascite é o pristane, utilizado por Beeler & Coelingh, (1989). A escolha do óleo mineral, utilizado como estimulante em nosso experimento, concorda com os resultados obtidos por Ashour *et al* (1990) e Obi *et al* (1997), sendo este mais barato e de fácil obtenção

comercial. O fluido ascítico, após ser coletado e antes de ser armazenado foi testado pelo teste de ELISA apresentando resultado positivo. Ashour *et al.* (1990) utilizou o teste de ELISA para testar o fluido ascítico anti Rotavírus Bovino.

Estudo de relação antigênica, com técnicas convencionais, tem indicado diversas similaridades entre amostras de AMPV. Variações antigênicas das proteínas F e G do vírus Respiratório Sincicial Bovino (BRSV) e o AMPV tem sido descritas. A glicoproteína G é conhecida por ser a mais variável do HRSV, o protótipo do gênero Pneumovírus (Johnson *et al.* 1987). As proteínas N e F apresentam-se altamente conservadas entre os diferentes isolados de AMPV entre pneumovírus distintos.

Segundo Matheise *et al.* (1995) a análise da reatividade dos anticorpos monoclonais produzidos para o BRSV demonstra que estes anticorpos reconhecem epítomos da proteína F de cepas de HRSV, Estes resultados confirmam que os epítomos da proteína F são conservados entre cepas de HRSV e BRSV.

Dos cinco anticorpos monoclonais testados para inibição da fusão e neutralização viral dois não foram capazes de inibir a fusão e apenas um não apresentou habilidade para neutralizar a ação do vírus.

Trabalhos de Matheise *et al.* (1995) e Obi *et al.* (1997) apresentaram resultados semelhantes, onde também foi encontrada correlação entre a inibição da fusão e a neutralização viral. No trabalho de Matheise *et al.* (1995) dois dos quatro anticorpos monoclonais foram capazes de neutralizar a atividade viral e inibir a formação de sincício, sendo que a inibição da fusão foi dependente da concentração dos anticorpos monoclonais. Os dois anticorpos monoclonais que inibiram a fusão tinham títulos de 20

– 50 vezes maiores que os outros. O presente trabalho sugere que os epítomos neutralizantes tem relação próxima com os sítios de fusão da proteína F, tentando fazer uma correlação entre a fusão na célula e a infecção no animal.

Czifra *et al* (1996) demonstraram a habilidade dos anticorpos monoclonais inibirem a infectividade de um dos isolados. No entanto nove falharam em demonstrar alguma redução na infectividade quando comparados com o controle. Um dos anticorpos apresentou alguma neutralização mas a diluição utilizada (1:20) não foi capaz de reduzir em 50%. Dois anticorpos monoclonais apresentaram 50% na redução da infectividade com títulos de 1/368 e 1/2080 respectivamente.

De acordo com Beeler & van Wyke Coelingh (1989) foi realizado o teste de neutralização viral com os anticorpos monoclonais e com o fluido ascítico. O teste de inibição da fusão foi realizado somente com os anticorpos monoclonais, sendo o título neutralizante e o título da inibição da fusão expressos como a recíproca da maior diluição dos anticorpos monoclonais que inibiram 95% do efeito citopático.

Os estudos de neutralização cruzada foram utilizados para avaliar a variação antigênica dos epítomos para a proteína F que ocorre na natureza (variações antigênicas demonstradas pelo uso de AcM).

## 7. Conclusões

- O isolamento viral do Metapneumovírus Aviário pode ser realizado em células FEG e CER a partir de material de campo.
- As amostras virais SHS-BR-121 e STG-SHS-1439 podem ser propagadas em células FEG, CER, Vero e BHK-21, sendo os maiores títulos encontrados em células CER.
- As células HEp-2, MDBK e ED não são sistemas celulares adequados para a replicação das amostras virais do Metapneumovírus Aviário.
- O Metapneumovírus Aviário do subtipo A tem um tempo de multiplicação nos sistemas celular avaliado menor e um título maior se comparado com o subtipo B.
- Após as fusões celulares foram produzidos cinco anticorpos monoclonais, denominados 1A5B8, 1C1C4, 1C1F8, 2C2E9 e 2A4C3.
- Dos cinco anticorpos monoclonais, três possuíam atividade soroneutralizante e apresentaram inibição da fusão.
- Os cinco hibridomas apresentaram resultados positivos ao teste de Soroneutralização cruzada contra o vírus homólogo.

## 8. Referências Bibliográficas

- Abiko, C, Mizuta K, *et al.* Outbreak of Human Metapneumovirus Detected by Use of the Vero E6 Cell Line in Isolates Collected in Yamagata, Japan, in 2004 and 2005 Journal Clinical Microbiology, v. 45, p. 1912–1919. 2007
- Arns, CW & Hafez, HM Isolation and identification of Avian Pneumovirus from broiler breeder flocks in Brazil. In M.M. Jensen (Ed) Proceedings of the 44st Western Poultry Diseases Conference p. 124-125. Sacramento, California. 1995.
- Arns, CW & Hafez, HM Swollen head syndrome in poultry flocks in Brazil. In M.M. Jensen (Ed) Proceedings of the 41st Western Poultry Diseases Conference, p. 81-84. Sacramento, California. 1992
- Arns, CW; Coswig, LT & Monteiro, MCGB Pneumovirose Aviária. In: Berchiere Jr., A & Macari, M (Eds.) Doenças das Aves, p. 359-362. FACTA, Campinas. 2000
- Ashour AA, Fernandez, FM, Resende, M & Tavares, CA Preparation and characterization of monoclonal antibodies for Bovine Rotavirus. Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia, v. 42, p. 499-509. 1990
- Barth, OM Estudos sobre a contrastação negativa de suspensões virais. Revista Brasileira Biologia, v. 44, n.1, p. 71-80. 1984
- Baxter-Jones, C; Cook, JKA, Frazier JA, Grant, M, Jones RC, Mockett APA & Wilding, GP Close relationships between TRT virus isolates. Veterinary Record, v. 119, p. 600-601. 1987
- Baxter-Jones, C; Wilding, GP & Grant, M Immunofluorescence as a potential diagnostic method for turkey rhinotracheitis. Veterinary Record, v.120, p. 562. 1989
- Bäyon-Auboyer, MH, Arnould, C, Toquin, D.& Eterradossi, N. Nucleotide sequences of the F, L and G protein genes of two non-A/non-B avian pneumoviruses (APV) reveal a novel APV subgroup. Journal of General Virology, v. 81, p. 2723-2733. 2000
- Beeler, J A & van Wyke Coelingh, K Neutralization epitopes of the F glycoprotein of Respiratory Sincicial Virus: effect of mutation upon fusion function. Journal of Virology, v. 63, p. 2941-2950. 1989
- Bell, IG & Alexander, DJ Failure to detect antibodies to turkey rhinotracheitis virus in Australian poultry flocks. Australian Veterinary Journal, v. 67, p. 232-233. 1990

- Brenner, S & Horne, RW A negative staining method for high resolution electron microscopy of viruses. Biochemical Biophysical Acta, v. 34, p. 103-107. 1959
- Buyts, SB & Du Preez, JH A preliminary report on the isolation of a virus causing sinusitis in turkeys in South Africa and attempts to attenuate the virus. Turkeys, v. 28, p. 36-46. 1980
- Buyts, SB, Du Preez, JH & Els, HJ The isolation and attenuation of a virus causing rinotracheitis in turkeys in South Africa. Odurstepoort Journal of Veterinary Research, v. 56, p. 87-98. 1989a
- Buyts, SB; Du Preez, JH & Els, HJ Swollen head syndrome in chickens: a preliminary report on the isolation of a possible aetiological agent. Journal of South African Veterinary Association, v. 60, p. 221-222. 1989b
- Cardoso, TC, Rahal P, Pilz D, Teixeira MCB, Arns CW. Replication of classical infectious bursal disease virus in the chicken embryo related cell line. Avian Pathology, v. 29, p. 213-217. 2000
- Cardoso, TC; Montassier, HJ; Galletti, MCM & Pinto, AA Development and application of Sandwich ELISA for monitoring antibodies against bronchitis virus infectious. Virus, Reviews & Research, v. 1, p. 75-80. 1996
- Cavanagh, D & Barrett, T Pneumovirus-like characteristics of the mRNA and proteins of turkeys rhinotracheitis virus. Virus Research, v.11, p. 241-256. 1988
- Chettle, NJ & Wyeth, PJ Turkey Rhinotracheitis: detection of antibodies using an ELISA test. British Veterinary Journal, v. 144, p. 282-287. 1988
- Collins, MS & Gough, RE Characterisation of a virus associated with turkey rhinotracheitis. Journal General Virology, v. 69, p. 909-916. 1988
- Collins, MS, Gough, RE & Alexander, DJ Antigenic differentiation of avian Pneumovirus isolates using polyclonal antisera in mouse monoclonal antibodies. Avian Pathology, v. 22, p. 469- 479. 1993
- Collins, MS, McIntosh, K & Chanock, RM Respiratory syncytial virus In B.N. Fields, D.M. Knipe, P.M. Howley (Eds), Fields Virology, 3 ed. (pp. 1313-1351) Philadelphia, Lippincott-Raven. 1996
- Collins, MS; Gough, RE; Lister, SA; Chettle, N & Eddy, R Further characterisation of a virus associated with turkey rhinotracheitis. Veterinary Record, v.119, p. 606. 1989

- Cook, JKA & Cavanagh, D Detection and differentiation of avian pneumoviruses (metapneumoviruses). Avian Pathology, v.31, p. 117-132. 2002
- Cook, JKA Avian pneumovirus infections of turkeys and chickens. The Veterinary Journal, v.160, p. 118-125. 2000
- Cook, JKA, Dolby, CA, *et al.* Demonstration of antibodies to turkey rhinotracheitis virus in serum from commercially reared chickens. Avian Pathology, v.17, p.403-410. 1988
- Cook, JKA, Ellis, MM & Huggins, MB The pathogenesis of turkey rhinotracheitis virus in turkeys poultlets inoculated with the virus alone or together with two strains of bacteria. Avian Pathology, v. 20, p. 155-166. 1991
- Cook, JKA, Huggins, MB, *et al.* Protection provide by a commercially available vaccine against different strains of turkey rhinotracheitis virus. Veterinary Record, v. 136, p. 392-393. 1995
- Cook, JKA, Jones, BV, *et al.* Antigenic differentiation of strains of turkey rhinotracheitis virus using monoclonal antibodies. Avian Pathology, v. 22, p. 257-273. 1993
- Cook, JKA, Orthell, F, *et al.* An experimental turkey rhinotracheitis (TRT) infection in breeding turkeys and prevention of its clinical effects using live-attenuated and inactivated TRT vaccines. Avian Pathology, v. 25, p. 231-243. 1996
- Coswig, LT Presença de anticorpos contra Metapneumovírus Aviário nas regiões Sul e Sudeste do Brasil. *Dissertação de Mestrado*. Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS, Brasil, 82p. 1998
- Czifra, G, Nilsson M, *et al.* Detection of PMV-1 specific antibodies with a monoclonal antibody blocking enzyme-linked immunosorbent assay. Avian Pathology, v. 25, p. 691-703. 1996
- D'Arce, RCF, Coswig, LT, *et al.* Subtyping of new Brazilian avian metapneumovirus isolates from chickens and turkeys by reverse transcriptase-nested-polymerase chain reaction. Avian Pathology, v. 34, p. 133-136. 2005
- Dani, M.A., Durigon, E.L. & Arns, C.W. Molecular characterization of Brazilian avian pneumovirus isolates: comparison between immunochemiluminescent Southern blot and nested PCR. Journal of Virological Methods, v. 79, p. 237-241. 1999

- Decanini, EL, Miranda, EC & Le Gros, FX Swollen head syndrome in heavy breeders in Mexico. In: Proceedings 40th Western Poultry Conference, Acapulco, México, p. 158-161. 1991
- Diaz de Espada, E & Perona, ME Etiología del síndrome de cabeza hinchada. Revista de la Sección Española de la Asociación Mundial de Avicultura Científica, v. 40, p. 36-42. 1984
- Drouin, P, Toux, JY & Picault, JP Le Syndrome infectueux de la grosse tête chez l'espèce poule. L'Aviculteur, v. 460, p. 93-96. 1985
- Easton, A.J. & Juhasz, K. Extensive sequence variation in the attachment (G) protein gene of avian pneumovirus :evidence for two distinct subgroups. Journal of General Virology, v. 75, p. 2873-2880. 1994
- El Houadfi, M, Jones, RC, *et al.* The isolation and characterisation of six avian infectious bronchitis viruses isolated in Morocco. Avian Pathology, v. 15, p. 93-105. 1986
- Fenner, FJ, Gibbs, EPJ, Murphy, FA, Rott, R, Studdert, MJ & White, DO Paramyxoviridae. In: F. Fenner, (ed.) Veterinary Virology (p. 471 – 478). 2ed. San Diego, Academic Press. 1993
- Ferreira, H; Pilz, D *et al.* Infection bronchitis virus replication in the chicken embryo related cell line. Avian pathology, v.31, p. 413-417. 2003
- Giraud, P, Bennejean, G, *et al.* Turkey rhinotracheitis in France: preliminary investigations on a ciliostatic virus. Veterinary Record, v. 119, p. 606-607. 1986
- Gough, RE & Collins, MS Antigenic relationships of three turkey rhinotracheitis viruses. Avian Pathology, v. 18, p. 227-238. 1989
- Gough, RE Avian Pneumoviroses In: Saif, YM; Barnes, HJ; Glisson, JR; Fadly, AM, McDougald, LR & Swayne, DE eds. *Diseases of Poultry* 11ed. Iowa States University Press, p. 92 – 101. 2003
- Gough, RE, Collins, MS, *et al.* Experimental infection of turkeys, chickens, ducks, geese, guinea fowl, pheasants and pigeons with turkey rhinotracheitis virus. Veterinary Record, v. 123, p. 58-59. 1988
- Gough, RE, Manvell RJ *et al.* Isolation of an avian pneumovirus from broiler chickens. Veterinary Record, v. 134, p. 353-354. 1994

- Goyal, SM; Chiang, SJ *et al.* Isolation of avian pneumovirus from an outbreak of respiratory illness in Minnesota turkeys. Journal Veterinary Diagnostic Investigation, v.11, p. 166-168. 2000
- Grant, M, Baxter-Jones, C & Wilding, GP An enzyme-linked immunosorbent assay for the serodiagnosis of turkey rhinotracheitis infection. Veterinary Record, v. 21, p. 279-280. 1987
- Hafez, HM & Loehren, U Swollen head syndrome: clinical observations and serology in West Germany. Deutsch. Tieraerztl. Umschau, v. 97, p. 322-324. 1990
- Hafez, HM & Weiland, F Preliminary studies of a virus associated with turkey rhinotracheitis in West Germany. Tieraerztl. Umschau, v. 45, p. 103-111. 1990
- Hafez, HM The role of pneumovirus in the swollen head syndrome of chickens. Review fuer Archiv Gefluogelkunde, v. 57, p. 181-185. 1993
- Hafez, HM, Hess, M, *et al.* Presence of avian pneumovirus type A in Continental Europe during the 1980s. Journal of Veterinary Medicine B, v. 47, p. 629– 633. 2000
- Hall, CB Respiratory Syncytial Virus and Parainfluenza Virus. New England Journal Medical, v. 344, p. 1917-1928. 2001
- Harlow E & Lane D *Antibodies: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory, 123 pp. 1988
- Heckert, R, Afshar, A, *et al.* Development and evaluation of an enzyme-linked-immunoabsorbent assay for the detection of antibodies to avian Pneumovirus. Avian Diseases, v. 38, p. 694-700. 1994
- Heckert, RA & Myers, DJ Absence of antibodies to avian pneumovirus in Canadian poultry. Veterinary Record, v. 132, p.172. 1993
- Jirjis, FF, Noll, SL *et al.* Rapid detection of avian pneumovirus in tissue culture by microindirect immunofluorescent test. Journal Veterinary Diagnostic Investigation, v.14, p. 172-175. 2002
- Jones, RC Avian pneumovirus infection: questions still unanswered. Avian Pathology, v. 25, p. 639-648. 1996
- Jones, RC, Baxter-Jones, C, *et al.* Demonstration of a candidate virus for turkey rhinotracheitis in experimentally inoculated turkeys. Veterinary Record, v. 119, p. 599-600. 1988

- Jones, RC, Baxter-Jones, C, *et al.* Experimental infection of laying turkeys with rhinotracheitis virus: distribution of virus in the tissues and serological response. Avian Pathology, v. 17, p. 841-850. 1988
- Jones, RC, Naylor, JC, *et al.* Isolation of a turkey rhinotracheitis-like virus from broiler breeder chickens in England. Veterinary Record, v. 129, p. 509-510. 1991
- Karaca, K, Naqi, S & Gelb, J Production and characterization of monoclonal antibodies to three infectious bronchitis virus serotypes. Avian Diseases, v. 36, p. 903-915. 1992
- Kehra, RS & Jones RC *In vitro* and *In vivo* studies on the pathogenicity of avian pneumovirus for the chicken oviduct. Avian Pathology, v. 28, p. 257-262. 1999
- Köhler G & Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. Nature, v. 256, p. 495-497. 1975
- Kong, BW; Foster, LK & Foster, DN Comparison of avian cell substrates for propagating subtype C avian metapneumovirus. Virus Research, v.116, p. 58-68. 2006
- Lamb, RA, Collins, PL, *et al.* Paramyxoviridae. In MHV Regenmortel, CM Fauquet, DHL Bishop, EB Carstens, MK Estes, SM Lemon, J Maniloff, MA Mayo, DJ McGeoch, CR Pringle & RB Wiekner (Eds.), Virus Taxonomy, p. 835-849. New York: Academic Press. 2000
- Ling, R & Pringle, CR Turkey rhinotracheitis virus: in vivo and in vitro polypeptide synthesis. Journal General Virology, v. 69, p. 917-923. 1988
- Lowry, DH, Rosebrough, NJ, *et al.* Proteins measurement with the Folin reagent. Journal Biology Chemistry, v. 193, p. 265-275. 1951
- Lu, YS, Shien, YS, *et al.* Swollen head syndrome in Taiwan - isolation of an avian pneumovirus and serological survey. Avian Pathology, v. 23, p. 169-174. 1994
- Matheise, JP, Walravens, K, *et al.* Antigenic analysis of the F protein of the bovine respiratory syncytial virus: identification of two distinct antigenic sites involved in fusion inhibition. Archives of Virology, v. 140, p. 993-1005. 1995
- McDougall, JS & Cook, JKA Turkey rhinotracheitis: Preliminary investigations. Veterinary Record, v. 118, p. 206-207. 1986
- Milstein C Monoclonal antibodies. Scientific American, v. 243, p. 56-64. 1980

- Morley, AJ & Thomson, DK Swollen head syndrome in broiler chickens. Avian Diseases, v. 28, p. 338-343. 1984
- Naylor, CJ & Jones, RC Turkey rhinotracheitis virus: a review. Veterinary Bulletin, v. 63, p. 439-449. 1993
- Naylor, CJ, Brown, PA, *et al.* Development of a reverse-genetics system for Avian Pneumovirus demonstrates that the small hydrophobic (SH) and attachment (G) genes are not essential for virus viability. Journal of General Virology, v. 85, p. 3219-3227. 2004
- O'Loan, CJ, Curran, WL & McNulty, MS Immunogold labelling of turkey rhinotracheitis virus. Zentralblatt fur Veterinarmedizin Reihe B, v. 39, p. 459-466. 1992
- Obi, T, Kokumai, A, *et al.* Antigenic differentiation of virus of turkey rhinotracheitis strain using monoclonal antibodies and polyclonal antisera. Journal Veterinary Medical Science, v. 59, p. 795-799. 1997
- O'brien, JD Swollen head syndrome in broiler breeders. Veterinary Record, v. 117, p. 619-620. 1985
- Otsuki, K, Hirai, N, *et al.* Demonstration of serum-neutralising antibody to turkey rhinotracheitis virus in serum from chicken flocks in Japan. Journal Veterinary Medicine Science, v. 58, p. 869-874. 1996
- Pages Manté, A Resumen del trabajo de investigación llevado a cabo sobre el problema de cabeza hinchada en aves. Revista de la Sección Española de la Asociación Mundial de Avicultura Científica, v. 40, p. 43. 1984
- Panigrahy, B, Senne, DA, *et al.* Experimental and serologic observations on avian pneumovirus (APV/turkey/Colorado/97) infection in turkeys. Avian Diseases, v. 44, p. 17-22. 2000
- Patnayak, DP, Tiwari, A & Goyal, SM Growth of vaccine strains of avian pneumovirus in different cell lines Avian Pathology, v. 34, p. 123-126. 2005
- Pattison, M, Chett, N, *et al.* Observations on swollen head syndrome in broiler and broiler breeder chickens. Veterinary Record, v. 125, p. 229-231. 1989
- Perelman, B, Meroz, M & Samberg, Y. Swollen Head-Syndrome in broiler breeders in Israel. Veterinary Record, v. 123, p. 444. 1988

- Perini, AP, Barbosa, ML *et al.* Comparison of HeLa-I, Hep-2 and NCI-H292 cell lines for the isolation of human respiratory syncytial virus (HRSV). Journal of Virological Methods, v.146, p. 368-371. 2007
- Picault, JP Isolation of a TRT-like virus from chickens with swollen head syndrome. Veterinary Record, v. 121, p. 135. 1987
- Pringle, CR Virus taxonomy - San Diego 1998. Archives of Virology, v. 143, p. 1449-1459. 1998
- Reed, JL & Muench, HA A simple method for estimating fifty percent endpoints. American Journal Hygiene, v. 27, p. 493. 1938
- Seal, B, Sellers, HS, Meinersmann, RJ. Fusion protein predict amino acid sequence of the first US avian pneumovirus isolate and lack of heterogeneity among US isolates. Virus Research, v. 66, p. 139-147. 2000
- Seal, B. Matrix protein gene nucleotide and predicted amino acid sequence demonstrate that the first US avian pneumovirus isolate is distinct from European strains. Virus Research, v. 58, p. 45-52. 1998
- Shin, HJ, McComb, B, *et al.* Susceptibility of broilers chicks to infection by Avian Pneumovirus of turkey origin. Avian Diseases, v. 44, p. 797-802. 2000
- Smith, AL; Tignor, GH *et al.* Isolation and assay of rabies serogroup viruses in CER cells. Intervirology, v.8, p. 92-99. 1977
- Tanaka, M, Obi, T, *et al.* Inhibition of cell fusion by neutralising monoclonal antibodies to F<sub>1</sub> protein of Turkey Rhinotracheitis Virus. Journal Veterinary Medical Science, v. 58, p. 581-582. 1996
- Tanaka, M, Takuma, H, *et al.* Turkey Rhinotracheitis Virus isolated from broiler chicken with swollen head syndrome in Japan. Journal of Veterinary Medical Science, v. 57, p. 939-941. 1995
- Tiwari, A, Patnayak, DP *et al.* Permissibility of different cell types for the growth of avian metapneumovirus. Journal of Virological Methods, v.138, p. 80-84. 2006
- Toquin, D, Eterradosi, N, & Guittet, M. Use of related ELISA antigen for efficient Turkey Rhinotracheitis virus serological testing following live vaccination. Veterinary Record, v. 139, p. 71-72. 1996

- Tung, AS, Ju, S, *et al.* Production of large amounts of antibodies in individual mice. *Journal Immunology*, v. 116, p. 676-681. 1976
- UBA - União Brasileira de Avicultura. Relatório Anual 2006-2007. Design by CyberDesigner. Disponível na página eletrônica <<http://www.uba.org.br/>>. Acesso em 15/06/2008.
- Van de Zande, S, Nauwynck, H *et al.* Comparative pathogenesis of a subtype A with a subtype B avian pneumovirus in turkeys. *Avian Pathology*, v.28, p. 239-244. 1999
- Van den Hoogen, BG, de Jong, JC, *et al.* A newly discovered human pneumovirus isolated from young children with respiratory tract disease. *Nature Medicine*, v. 7, p. 719–724. 2001
- Veits, J, Köllner, B *et al.* Isolation and Characterization of monoclonal antibodies against structural proteins of Infectious Laryngotracheitis Virus. *Avian Diseases*, v. 47, p. 330-342. 2003
- Wilding GP, Baxter-Jones C & Grant M Ciliostatic agent found in rhinotracheitis. *Veterinary Record*, v. 118, p. 735. 1986
- Williams, RA; Savage, CE & Jones, RC Development of a live attenuated vaccine against turkey rhinotracheitis. *Avian Pathology*, v. 20, p. 45-55. 1991
- Wyeth, PI; Chettle, NI *et al.* Antibodies to TRT in chickens with swollen head syndrome. *Veterinary Record*, v. 120, p. 286-287. 1987
- Wyeth, PJ; Gough, RE *et al.* Preliminary observation on a virus associated with turkey rhinotracheitis. *Veterinary Record*, v.119, p. 139. 1986
- Zola H. Introduction. In: ZOLA, H. Monoclonal Antibodies: The Second Generation. Oxford: BIOS Scientific Publication, p. 205. 1995