

Produção de clones secretores de anticorpos (IgG) contra o vírus da doença infecciosa bursal*

Sandra Yuliet Marín¹, Bernadete Miranda dos Santos²⁺, Joaquin Hérnan Patarroyo³ e Marlene Isabel Vargas Vilorio⁴

ABSTRACT. Marín S.Y., dos Santos B.M., Patarroyo J.H. & Vargas M.I. [Production of clone secretor of antibodies (IgG) against of infection bursal disease virus.] Produção de clones secretores de anticorpos (IgG) contra o vírus da doença infecciosa bursal. *Revista Brasileira de Medicina Veterinária*, 37(2):238-144, 2015. Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Universidade Federal de Viçosa, Avenida PH Rolfs, s/n, Viçosa, MG 36570-000, Brasil. E-mail: bmsantos@ufv.br

Three clones secreting of antibodies (Abs) IgG against infection bursal disease virus IBDV was development. The IBDV was strain S706 (the intermediate vaccine) was replicated in VERO cell and purified by sucrose gradient, for ELISA and mice inoculation. For the immunization of the mice BALB/c using as a saponin adjuvant, that allowed an inflammation reaction which enhanced the antibody response, detectable by ELISA. The fusion of splenic cells of the immunized mice and the mieloma SP2/0 resulted in 2 hybridoma families (2H11 and 5C7). After cloning by limiting dilution, 3 clones secretors of Abs from IgG class were obtained. The 3 obtained Abs were capable to reveal the proteins VPX and VP2 by "western blotting", respectively of 47 kDa and 41 kDa. The definition of the isotypes recognized by obtained Abs must be object of characterization to allow the use of the antibodies in immunodiagnostic tests such as immunofluorescence, immunocytochemistry or capture ELISA, for epidemiologic of the disease researches or to differentiate vaccine's virus of the field virus.

KEY WORDS. Antibodies, Infection bursal disease, immunodiagnostic test.

RESUMO. Três clones secretores de anticorpos IgG contra o vírus da doença infecciosa bursal (IBDV) foram desenvolvidos no presente trabalho, para utilização em testes de imunodiagnóstico do tipo imunofluorescência, imunohistoquímica ou ELISA de captura. Para a produção dos anticorpos (Ac) utilizou-se de um vírus inteiro proveniente de uma vacina comercial, estirpe intermediária (Bur-706), que foi multiplicado em células VERO e purificado

por ultracentrifugação em gradiente de sacarose, sendo utilizado para a imunização dos camundongos BALB/c. O adjuvante escolhido foi a saponina, que permitiu a obtenção de anticorpos policlonais capazes de revelar a enzima por ELISA. A fusão das células esplênicas dos camundongos imunizados e o mieloma SP2/0 resultou na obtenção de 2 famílias de hibridomas (2H11 e 5C7) secretores de anticorpos. Após clonagem por diluição limitante,

* Recebido em 28 de fevereiro de 2013.

Aceito para publicação em 3 de abril de 2014.

¹ Médica-veterinária e Zootecnista, MSc, Programa de Pós-Doutorado em Ciência Animal, Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Av. Antonio Carlos, 6627, Pampulha, Belo Horizonte, MG 31270-901, Brasil.

² Médico Veterinário, DSc, Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Universidade Federal de Viçosa, Avenida PH Rolfs, s/n, Viçosa, 36570-000, MG, Brasil. *Autora para correspondência, E-mail: bmsantos@ufv.br

³ Médico-veterinário, Doutorado em Imunoparasitologia, Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Universidade Federal de Viçosa (UFV), Avenida PH Rolfs, s/n, Viçosa, MG 36570-000. E-mail: jpatarro@ufv.br

⁴ Médica-veterinária, Doutorada em Patologia Geral, Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Universidade Federal de Viçosa (UFV), Avenida PH Rolfs, s/n, Viçosa, MG 36570-000.

foram obtidos 3 clones secretores de Ac da classe IgG. Os três Ac obtidos foram capazes de revelar as proteínas virais VPX e VP2 por "western blotting", reconhecendo a proteína de 47 kDa e 41 kDa e outra proteína não identificada com peso molecular de 66 kDa. As definições dos isótipos reconhecidos pelos Ac obtidos devem ser objeto de investigações, de modo a permitir a utilização dos anticorpos em ensaios imunoenzimáticos para estudos epidemiológicos da doença ou para diferenciar vírus vacinal e de campo.

PALAVRAS-CHAVE. Anticorpos, doença infecciosa bursal, imunodiagnóstico.

INTRODUÇÃO

A doença infecciosa bursal (IBD), atualmente, representa um dos principais problemas sanitários em virtude de sua alta contagiosidade e por seu caráter imunodepressor. Estes fatores influem negativamente no rendimento econômico dos planteis de reprodutores, de postura comercial e de frangos de corte (Sharma et al., 2000).

A IBD tem como agente etiológico um vírus membro da família *Birnaviridae* (Dobos et al., 1979), gênero *Avibirnavirus*, sendo um vírus de RNA fita dupla, não envelopado e apresenta dois tipos sorológicos distintos designados sorotipo 1 e sorotipo 2. Ambos infectam naturalmente galinhas e perus, mas a doença ocorre somente em galinhas e apenas o sorotipo 1 é patogênico (Muller et al., 2003).

Os métodos imunológicos para diagnóstico da IBD são atualmente mais utilizados do que o isolamento e identificação viral, por serem mais rápidos na obtenção dos resultados e pela simplicidade de sua execução, possibilitando análise de um maior número de amostras em menor tempo e com menores custos. A monitoria sorológica pressupõe avaliar a eficiência dos programas vacinais, como a vacina utilizada e o manejo de vacinação, além de auxiliar no diagnóstico e traçar um perfil imunológico dos planteis (Di Fabio, 2001).

A biotecnologia é um ramo de conhecimento científico que faz uso de sistemas celulares para o desenvolvimento de processos e produtos de interesse econômico e social. Entre esses sistemas celulares, os hibridomas, secretores de anticorpos contra agentes microbianos são de grande interesse biotecnológico. Os anticorpos monoclonais têm sido amplamente empregados na detecção e caracterização imunológica de diversos componentes celulares, em testes imunodiagnósticos e na identificação de patógenos (Lenaars & Hendriksen, 2005).

O objetivo deste estudo foi a produção de an-

ticorpos de alta afinidade contra o vírus da IBD, para utilização em testes de imunodiagnósticos dos tipos imunofluorescência, imunohistoquímica e ELISA de captura, para detecção e diferenciação do vírus vacinal e de campo e assim permitir um melhor monitoramento de planteis avícolas com relação a essa doença.

MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi conduzido na Unidade de Estudos em Sanidade Avícola (UESA), Laboratório de Virologia do Setor de Medicina Veterinária Preventiva do Departamento de Veterinária (DVT) e Laboratório de Biologia e Controle de Hematozoários e Vetores do BIOAGRO (Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária), da Universidade Federal de Viçosa (UFV).

Foi utilizada uma amostra atenuada do vírus da IBD cepa intermediária (Bur-706), proveniente de uma vacina comercial, apresentada na forma liofilizada para 1000 doses, diluída em 30 mL de solução salina estéril. O vírus utilizado foi cultivado em células VERO (rim de macaco verde africano), gentilmente cedidas pelo Laboratório de Biologia e Controle de Hematozoários e Vetores do BIOAGRO (UFV), de linhagem contínua. Para o crescimento dos cultivos das células VERO foi empregado o meio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, Sigma, Auto-mod®, EUA), suplementado com glutamina, 10% de soro fetal bovino (Cultilab), antibiótico (sulfato de gentamicina, Cultilab) e antimicótico (anfotericina B, Cultilab) pH 7,2.

A infecção das células foi realizada utilizando-se uma estirpe vacinal do IBDV. O volume de 0,2 mL desta solução foi inoculado em garrafas de cultivo celular, contendo monocamada de células, com 70 a 80% de confluência (após 24 horas de incubação aproximadamente). As garrafas foram colocadas sob incubação a 37°C e diariamente foram monitoradas (visualização em microscópio invertido, Olympus IMT2, Japão) para verificação de 70 a 80% de efeito citopático (ECP). Após a completa destruição da monocamada celular (aproximadamente 96 horas) o conteúdo da garrafa de cultivo foi transferido para um tubo com rosca (Corning®, EUA), centrifugado (centrifuga, Jouan BR4, Francia) a 200g por 10 minutos para a sedimentação dos debris celulares e o sobrenadante foi conservado a -20°C. A purificação do vírus foi realizada por ultracentrifugação em gradiente de sacarose, de acordo com a técnica descrita por Collins & Gough (1988). A dosagem de proteínas, do antígeno foi feita pelo método do ácido bicinonínico (Smith et al., 1985). Para esta dosagem foi empregado, como padrão, soro albumina bovina (SAB, Sigma, EUA) a 0,5%.

Foram utilizados camundongos BALB/c fêmeas (Figura 1), com cerca de 7 semanas de idade. Os animais foram obtidos no Biotério Central do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de Viçosa. A colheita de sangue foi no plexo orbital, com os animais, previamente anestesiados. Os camundongos receberam, por via intraperitoneal, cerca de quatro doses de um inóculo preparado com o IBDV purificado,

com intervalo de 21 dias entre cada aplicação. O antígeno foi emulsionado em adjuvante saponina, usando 40 µg de vírus purificado e 50 µg de saponina (diluída em água MilliQ).

A última imunização foi realizada quatro dias antes da coleta dos baços, sem adjuvante, utilizando-se as vias venosa e intraperitoneal.

Os ELISAS para as detecções do IBDV purificado, de anticorpo dos camundongos e dos Ac dos clones secretores seguiram técnicas descritos por Santos et al. (1996), com algumas modificações. Microplacas de polivinil, contendo 96 poços (Hemobag, Brasil), foram sensibilizadas com 1 µg de antígeno purificado, diluído em 100 µL de tampão carbonato-bicarbonato 0,1M (pH 9,6). A placa foi incubada a 4°C, por uma noite para a adsorção do antígeno. A placa foi lavada três vezes, utilizando-se de NaCl a 0,9% e Tween 20 a 0,05%, pH 7,2 (tampão de lavagem). Em seguida foram adicionados, em cada poço, 100 µL de caseína hidrolisada a 2% em tampão fosfato (PBS, pH 7,6), para bloquear os sítios não utilizados pelo antígeno. A placa foi, então, incubada por uma hora em temperatura ambiente e lavada duas vezes, com tampão de lavagem (NaCl a 0,9% e Tween 20 a 0,05%, pH 7,2). 100 µL de soros negativos e positivos, diluídos 1:100 em tampão de incubação (PBS, caseína a 0,2%, pH 7,2). A placa foi incubada por duas horas e lavada por duas vezes com tampão de lavagem. Foram adicionados 100 µL do conjugado (IgG de cabra anti-IgG de camundongo conjugado com peroxidase (Sigma®, EUA), diluído a 1:30000 nos orifícios da microplaca. A placa foi reincubada por mais duas horas e lavada por duas vezes. Em seguida adicionou-se, a cada poço, 100 µL de substrato (o-phenylenediamine - OPD Sigma®, EUA). A placa foi então incubada por 40 minutos em câmara escura, à temperatura ambiente. Após esse período, a reação foi

interrompida pela adição de 30 µL de ácido sulfúrico 2N (1:20). Foram feitas quatro lavagens por ciclo. Para a leitura das reações foi utilizado leitor de ELISA (Titertek Multiskan Plus, EUA) com filtro de comprimento de onda de 492 nm. Os resultados foram expressos em densidade óptica (DO). Como controle positivo e negativo foram usados soros de camundongos sabidamente positivo e sabidamente negativo.

Foram utilizadas células de mieloma da série plasmocitária não secretoras de imunoglobulinas (SP₂/O) (Shulman et al., 1978), gentilmente cedidas pelo Laboratório de Biologia e Controle de Hematozoários e Vetores do BIOAGRO da UFV, seguindo-se a metodologia descrita por Karaca et al. (1992).

O baço do camundongo hiperimunizado foi coletado e colocado em placa de petri estéril, com 4 mL de meio RPMI-1640 sem soro fetal bovino. Em seguida se macerou com auxílio de um êmbolo de seringa e uma malha de metal. As células de mieloma foram coletadas das garrafas de cultivo e centrifugadas a 300 g por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e o pellet ressuspenso em 10mL meio RPMI incompleto. Procederam-se duas centrifugações, a 400 g por 5 minutos, descartando-se o sobrenadante entre os dois processos. A mistura de células (linfócitos e mielomas) em uma proporção de 10⁸ células de baço para 10⁷ células de mieloma, foi colocada em tubo de centrifuga de 50 mL, sendo seu volume completado com meio RPMI-1640 incompleto e o tubo centrifugado a 400 g por 10 minutos. Com uma pipeta foi adicionado à mistura 1mL de polietilenoglicol (PEG, Sigma, EUA) 50%, pré-aquecido, o intervalo de 1 minuto e fazendo-se movimentos circulares, para que ocorresse a mistura. Acrescentou-se ainda mais 15 mL de meio RPMI-1640 incompleto, agitando-se o tubo por 5 minutos. Os híbridos recém formados foram centrifu-

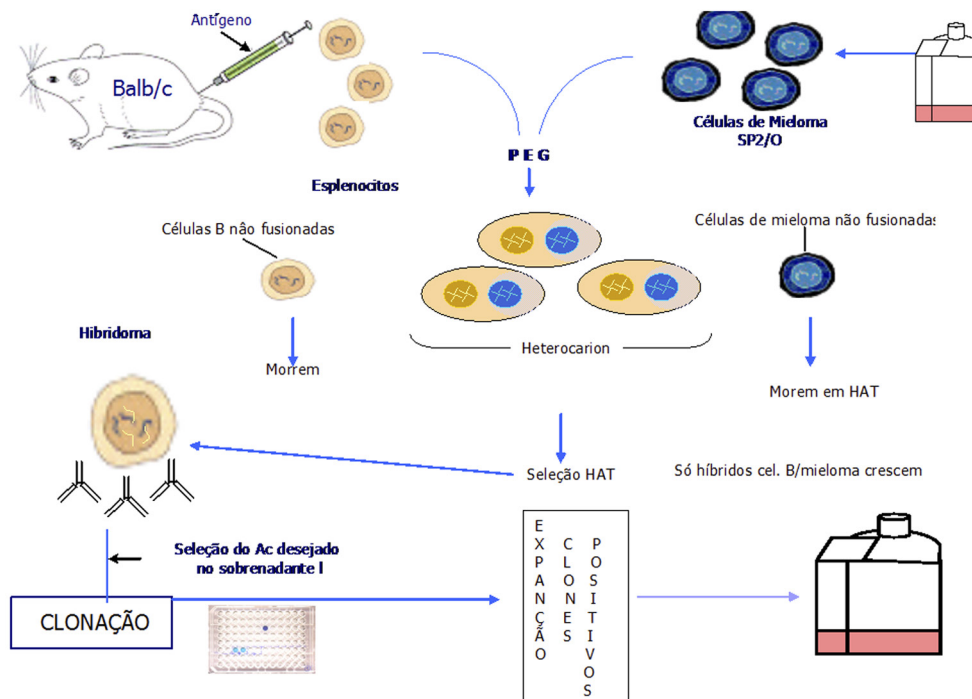


Figura 1. Desenho esquemático da técnica para a produção de hibridomas e clones secretores de anticorpos (IgG).

gados a 400 g e o sobrenadante descartado. O pellet foi ressuspensionado em 10 mL de meio RPMI-1640 com 10% SFB e HAT (hipoxantina aminopteridina tiamidina). Em seguida, foram acrescentados mais 50 mL de meio e distribuídos os híbridos em placas de 96 orifícios (100 µL por pocinho). As placas foram incubadas em estufa, a 37°C, com atmosfera de 5% de CO₂. Após e cada 48 horas foram realimentados os clones com RPMI-1640 complementado com HAT e após 10 dias 50% do volume dos orifícios foi substituído por meio RPMI-1640 complementado com HT (hipoxantina tiamidina) (Figura 1).

As placas foram deixadas na estufa de cultivo por pelo menos 15 dias, para que só então fosse coletado o sobrenadante. Foi retirado 50% do sobrenadante dos orifícios com cuidado de não pegar os hibridomas e, em seguida, armazenado a -20°C até a realização dos testes ELISA para detecção dos anticorpos contra o vírus da IBD.

Os híbridos positivos foram selecionados para a clonagem (por diluição limitante). O crescimento foi acompanhado diariamente, a partir do quinto dia, com troca de meio a cada três dias.

Os orifícios que apresentavam bom crescimento apenas de uma colônia que permaneceram positivas no ELISA foram expandidas em placas de 24 orifícios e garrafas de 75 cm² para a obtenção de sobrenadante de cultura para congelamento a -70°C.

Fragmentos da bolsa de Fabrício fixados em formol de episódios naturais de IBD foram desidratados, diafanizados, infiltrados e incluídos em parafina e submetidas a reação de imunofluorescência utilizando a técnica descrita por Aoki et al. (2010). As lamínulas foram seladas com lamínula e solução de glicerina (1 parte de PBS pH 8,0 e 9 partes de glicerina) e analisadas ao microscópio de fluorescência de luz verde (Nicon Eclipse E-600).

Western blotting para a identificação da especificidade dos Ac contra as proteínas estruturais do vírus da IBD. A eletrotransferência das proteínas virais dos géis de poliácridamida para as membranas de nitrocelulose foi realizada de acordo com metodologia descrita por Laemli et al. (1970) e Pereira et al. (1998) com modificações.

A transferência para a membrana de nitrocelulose foi realizada à 4°C por 18 horas a 40 volts. A membrana foi lavada em água destilada e cortada em tiras de aproximadamente 0,5 cm de largura. O bloqueio dos sítios inespecíficos foi feito com tampão de bloqueio durante 30 minutos. Após o bloqueio, as tiras foram lavadas três vezes em PBS-Tween 80 a 0,05%, durante 15 minutos, e incubadas por duas horas com as imunoglobulinas dos sobrenadantes de culturas, contendo os anticorpos. Como controles positivos foram utilizados soros policlonais de camundongo imunizados e, como controles negativos, utilizaram-se soro de camundongo não imunizado. As tiras de nitrocelulose foram lavadas três vezes em PBS-Tween 80 (Sigma, EUA) e incubadas por duas horas com anti-IgG de camundongo conjugada com peroxidase (Sigma, EUA) na diluição de 1:2000 em PBS-Tween 80 a 0,05% e após este tempo foram lavadas novamente duas vezes em PBS-Tween 80 e uma vez com PBS. Em seguida, foram reveladas em substrato

para peroxidase. A revelação foi interrompida com água destilada. Toda a reação foi realizada à temperatura ambiente e sob agitação.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A dosagem de proteína do vírus purificado foi feita através de leitura em espectrofotômetro (Smartspectm 3000, BIO-RAD, EUA) a 562 nm, obtendo-se 1623,22 µg/mL. A quantidade de proteína viral obtida foi suficiente para o desenvolvimento de todo o experimento.

A partir dos soros obtidos com as sangrias dos camundongos, que eram realizadas a cada duas semanas após imunização, foram efetuados testes ELISA indireto, para mensuração dos níveis de anticorpos (Tabela 1).

Dos oito camundongos imunizados, todos desenvolveram resposta imune humoral, sendo observado o maior título a partir da terceira inoculação (Figura 2). O uso de saponina como adjuvante mostrou uma boa resposta humoral em termos de produção de IgG, garantindo sua eficácia e coincidindo com os resultados relatados por Sales-Junior et al. (2005), que usou como modelo experimental camundongos. Os autores verificaram que o adjuvante saponina tem a habilidade de estimular a resposta mediada por células, assim como de aumentar a produção de anticorpos.

Tabela 1. Média de absorvância (492nm), obtidas do ELISA indireto de acordo com a semana e com o número do camundongo.

Semana	Número do camundongo							
	1	2	3	4	5	6	7	8
0	0,097	0,1	0,135	0,159	0,102	0,22	0,103	0,103
2	0,367	0,407	0,406	0,37	0,309	0,38	0,407	0,365
5	0,346	0,336	0,384	0,353	0,344	0,384	0,362	0,347
8	0,634	0,637	0,634	0,644	0,615	0,643	0,621	0,634
11	0,355	0,368	0,435	0,385	0,361	0,354	0,415	0,363
12	0,593	0,57	0,587	0,614	0,582	0,593	0,613	0,563

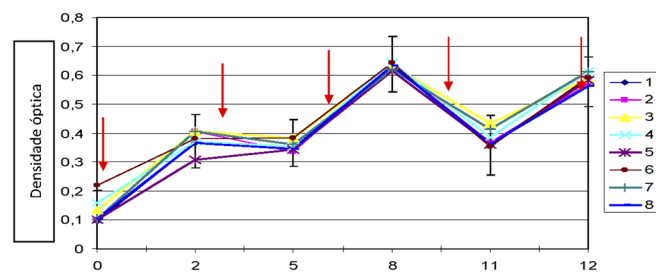


Figura 2. Médias de absorvância óptica (492nm) obtidas no ELISA indireto dos soros dos camundongos testados por ELISA antes de serem imunizados; 2 semanas após cada imunização, os camundongos foram inoculados com intervalos de 3 semanas. Foram feitas 4 inoculações nos camundongos e as setas no gráfico indicam o dia da imunização, a 5 e última imunização quatro dias antes da fusão.

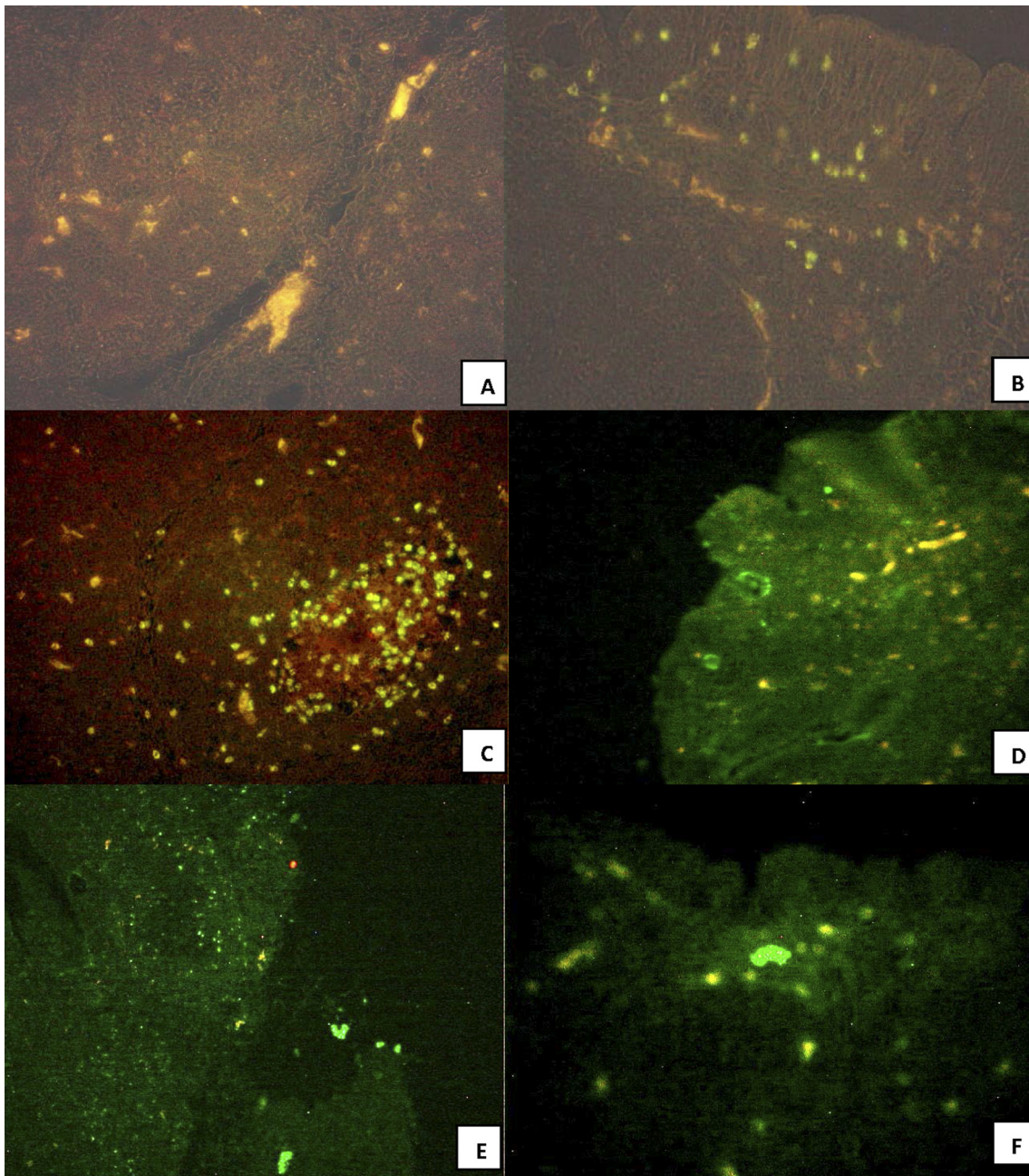


Figura 3. Reação de imunofluorescência indireta dos anticorpos monoclonais frente a cortes histológicos de bolsas de Fabrício positivas para o IBDV por infecção natural. A. Controle policlonal negativo, soro de camundongo sem imunizar. B. Controle policlonal positivo, soro de camundongo imunizado. C. sobrenadante de hibridomas clone H8. D. sobrenadante de hibridomas clone D8. E e F. sobrenadante de hibridomas clone F9. Diluição 1:40, 400X.

Foram selecionados três clones (D8, F9 e H8) por serem positivos frente ao ELISA e por mostrarem bom crescimento. Portanto, foram expandidos em placas de 24 orifícios, previamente revestidas por uma monocamada de macrófagos.

Em relação à reatividade dos anticorpos IgG anti-IBDV pelo teste ELISA, foram observados diferentes intensidades de absorvância de 0,617 a 0,923, permitindo distinguir claramente os clones positivos dos negativos (considerando-se um *cut off* de 4 vezes a D.O. do soro normal 0,187).

Os hibridomas positivos, que mostraram bom crescimento, foram transferidos para placas de 24 orifícios para estimular seu crescimento e a produção dos anticorpos. Foram testados em ELISA e RIFI para verificar sua produção.

Os anticorpos oriundos dos clones D8, F9, H8, ao serem submetidos à RIFI frente a cortes histológicos de bolsas de Fabrício diagnosticadas como positivas para o IBDV apresentaram fluorescência, apresentaram diferenças com respeito à diluição usada para identificação do vírus na RIFI. Em ge-

ral, o sobrenadante dos cultivos apresentou reação positiva na diluição de 1:160 para F9; 1:160 para D8 e de 1:320 H8 (Fig. 3). Todos os clones positivos em ELISA se mostraram positivos em RIFI o título de reação de cada anticorpo foi determinado testando-se diferentes diluições do sobrenadante de cultivo como anticorpo primário nas técnicas de RIFI, apresentando reação positiva na diluição de 1:160 para os clones denominados F9 e D8 e de 1:320 para H8.

As bandas protéicas reconhecidas pelos anticorpos monoclonais apresentavam pesos moleculares entre 66 e 41 kDa, sendo que todos os anticorpos IgG reconheceu mais de uma banda nessa faixa de peso molecular (Figura 4).

Dobos (1979), trabalhando com amostras purificadas do vírus da IBD encontraram as seguintes proteínas virais com seus respectivos pesos moleculares: VP1 (90kDa), VP2 (41kDa), VP3 (35kDa), VP4 (28kDa) e VPX (47kDa). Este mesmo autor designou de VPX a proteína viral precursora da VP2, com peso molecular de 47kDa. A proteína denominada de VP2, principal indutora de proteção ao hospedeiro conforme Azad *et al.* (1987), é descrita por vários autores com pesos moleculares entre 37 e 42kDa. A VP2, localizada no capsídeo externo do vírus, está relacionada com a antigenicidade, ou seja, expressão de epítomos que induzem uma resposta de anticorpos. Por essa razão, essa proteína é conhecida como epítomo de neutralização, ou seja,

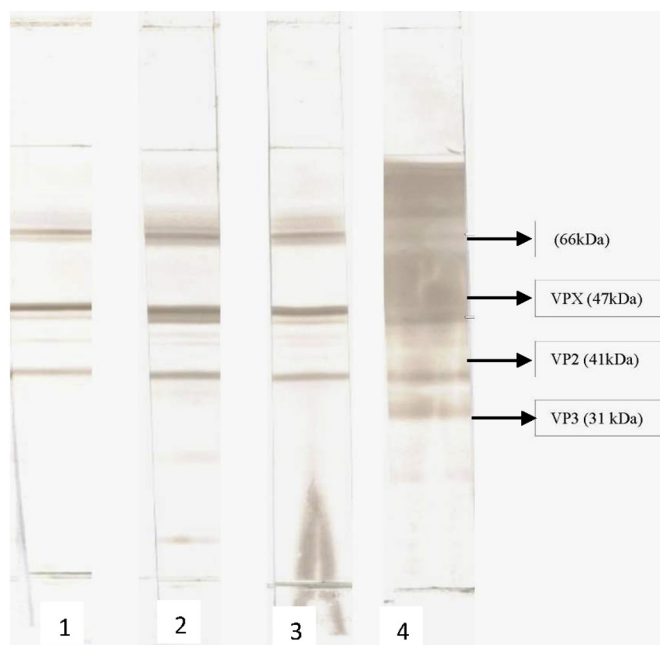


Figura 4. Western Blotting com os anticorpos monoclonais frente ao vírus da IBD. Pesos moleculares (kDa) indicados à esquerda. 1.Clone H8, 2.Clone F9, 3.Clone D8 4.Controle policlonal positivo: soro de camundongo anti-vírus da IBD.

anticorpos gerados por ela permitem efetuar a diferenciação dos sorotipos e subtipos virais. A VP3 está no capsídeo interno e é a principal responsável pela conformação estrutural do vírus tendo relação com antígenos grupos específicos. Induz resposta de anticorpos, porém são fracamente neutralizantes. A VP4 é uma protease viral que não é incorporada na partícula madura do vírus. A VP5 tem sido demonstrada na célula infectada, não está presente no vírus maduro e suspeita-se que tenha papel na regulação do ciclo viral ou na liberação do vírus da célula infectada (Ito *et al.*, 2001).

As diferenças nos pesos moleculares encontrados nesta pesquisa podem ser devidas à metodologia empregada. Outra possível razão para estas variações pode ser a variação na clivagem dos sítios das proteínas precursoras, quando diferentes sistemas são empregados na replicação viral. Assim, Müller & Becht (1982) e Rodriguez-Chavez *et al.* (2002) relataram mudanças nos epítomos associadas ao método usado para propagação do vírus.

Neste estudo, a VPX e a VP2 reagiram com o mesmo anticorpo monoclonal em *wetern blotting*, esta observação pode ser explicada porque a VP2 é um produto da clivagem de VPX (Fahey *et al.*, 1985).

CONCLUSÕES

A técnica empregada neste estudo não difere das descritas por outros autores, entretanto, certos aspectos devem ser ressaltados, como a imunização dos camundongos, a seleção dos híbridos e a clonagem.

Estes anticorpos IgG poderão ser usados no desenvolvimento de testes mais sensíveis nos estudos epidemiológicos do vírus da IBD ou podem ser usados na identificação de proteínas relevantes.

Podem ser propostos os seguintes estudos empregando os Ac: imunohistoquímica para diagnóstico "in situ" da infecção por vírus IBD; estudo de amostras em surtos de doença quanto ao tropismo tecidual e persistência viral; e avaliação da situação atual do IBVDV no campo, comparando a ocorrência de episódios clínicos atuais com a doença em anos anteriores.

REFERÊNCIAS

- Aoki V., Souza J.X., Fukumori L.M.I., Périgo A.M., Freitas E.L. & Oliveira Z.N.P. Imunofluorescência direta e indireta. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, 85:490-500, 2010.
- Azad A.A., Jagadish M.N. & Brown M.A. Deletion mapping and expression in *Escherichia coli* of the large genomic segment of a birnavirus. *Virology*, 161: 145-152, 1987.
- Collins M.S. & Gough R.E. Characterization of a virus associated with turkey rinotracheitis. *J. Gen. Virol.*, 69:909-916, 1988.

- Di Fabio J. Diagnóstico sorológico da doença de Gumboro, In: II Simpósio da Doença de Gumboro, FACTA. Campinas SP. Brasil, 2001, p.79-91.
- Dobos P. Peptide map comparison of the proteins of Infectious Bursal Disease Virus. *J. Virol.*, 32:1046-1050, 1979.
- Dobos P., Hill B.J., Hallett R., Kells D.T., Becht H. & Teninges D. Biophysical and biochemical characterization of five animal viruses with bisegmented dsRNA genomes. *J. Virol.*, 32:593-605, 1979.
- Fahey K.J., O'Donnell I.J. & Azad A.A. Characterization by western blotting of the immunogens of infectious bursal disease virus. *J. Gen. Virol.*, 66:1479-1488, 1985.
- Ito N.M.K., Miyajil C.I., Lima E.A. & Okabayshi S. Doença de Gumboro: Revisão de literatura avanços em biotecnologia e novos conhecimentos. Elanco Saúde Animal, 2001. 76p.
- Karaca K., Naqi S. & Gelb J. Production and characterization of monoclonal antibodies to three infections bronchitis virus serotypes. *Avian Diseases*, 36:903-915, 1992.
- Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227:680-685, 1970.
- Leenaars M. & Hendriksen F.M. Critical steps in the production of polyclonal and monoclonal antibodies: evaluation and recommendations. *ILAR Journal*, 46:269-279, 2005.
- Muller H. & Beht H. Biosynthesis of virus-specific proteins in cells infected with infectious bursal disease virus ad their significance as structural elements for infectious virus and incomplete particles. *J. Virol.*, 44:384-392, 1982.
- Muller H., Islam R. & Raue R. Research on infectious bursal disease -the past, the present and the future. *Vet. Microbiol.*, 97:153-165, 2003.
- Pereira S.R.F.G., Travassos C.E.P.F., Huguenim A., Guimarães A.C.C., Silva A.G. & Guimarães M.A.A.M. Western blot detection of infectious bursal disease virus infection. Short Communication. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, 31:671-674, 1998.
- Rodriguez-Chavez I.R., Rosenberger J.K. & Cloud S.S. Characterization of the antigenic, immunogenic, and pathogenic variation of infectious bursal disease virus due to propagation in different host systems (bursa, embryo, and cell culture). II. Antigenicity at the epitope level. *Avian Pathol.*, 31:473-483, 2002.
- Santos B.M., Martins N.R.S., Resende M. & Gouveia A.M.G. Resposta imune conferida pelas amostras La Sota e VG/GA do vírus da doença de Newcastle. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, 48:645-656, 1996.
- Sales-Junior P.A., Guzman F., Vargas M.I., Sossai S., Patarroyo V.A.M., Gonzales C.Z.L. & Patarroyo J.H. Use of biodegradable PLGA microspheres as a slow release delivery system for the *Boophilus microplus* synthetic vaccine SBm7462. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 107:281-290, 2005.
- Sharma J.M., Kim I.J., Rautenschlein S. & Yeh H.Y. Infectious bursal disease virus of chickens: pathogenesis and immunosuppression. *Dev. Comp. Immuno.*, 24:223-235, 2000.
- Shulman M., Wilde C.D. & Kohler G. A better cell line for making hybridomas secreting antibodies. *Nature*, 276:269-270, 1978.
- Smith P.K., Krohn R.L., Hermanson G.T., Mallia A.K., Gartner F.H., Provenzano M.D., Fugimoto E.K., Goeke N.M., Olson B.J. & Klenk D.C. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytical Biochemistry*, 150:76-85, 1985.