

Anapolino Macedo de Oliveira

**DESENVOLVIMENTO E PADRONIZAÇÃO DE TESTE
IMUNOENZIMÁTICO PARA PESQUISA DE ANTICORPOS
ANTI-PARVOVÍRUS SUÍNO**

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

**Área: Medicina Veterinária Preventiva
Orientador: Prof. Rômulo Cerqueira Leite**

**Belo Horizonte
Escola de Veterinária
1995**

O48d Oliveira, Anapolino Macedo, 1962 -

Desenvolvimento e padronização de teste imunoenzimático para pesquisa de anticorpos anti-parvovirus suíno / Anapolino Macedo de Oliveira - Belo Horizonte: UFMG - Escola de Veterinária, 1995.


66 p. : il.

Dissertação (mestrado)


1. Suínos - Doenças - Teses. 2. Parvovirus - Teses. 3. Técnicas imunoenzimáticas - Teses. 4. Imunoglobulinas - Teses. I Título.


CCD - 636.408 9

Dissertação defendida e aprovada em 02.06.1995, pela Comissão Examinadora constituída por:


Prof. Rômulo Cerqueira Leite


Profa. Aurora Maria Guimarães Gouveia


Prof. Maurício Resende


Dra. Edel Figueiredo Barbosa


Dra. Aurea Valadares Folgueras

Aos meus pais, Luiz e Adalgisa, irmãos e sobrinhos.

AGRADECIMENTOS

- Agradeço especialmente ao Prof. Rômulo Cerqueira Leite pela orientação, ensinamentos e paciência.
- Aos professores Maurício Resende e Aurora Maria Guimarães Gouveia pela co-orientação.
- Aos amigos Olga, Francesca, Henrique, Áurea e Edel pelo apoio imprescindível à conclusão deste trabalho.
- Aos colegas Aládio, Fátima Boechat, Francisco Lobato, Pedro Mota, Ricardo Aurélio, Rosilene, Massami, João Maia e Ronaldo Sanches pelo estímulo e amizade.
- Aos funcionários e amigos do Laboratório de Virologia do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva da UFMG.
- Aos funcionários da Biblioteca da Escola de Veterinária da UFMG.
- Aos colegas do Curso de Pós-Graduação.
- Ao Laboratório de Referência Animal (LARA), na pessoa do seu Diretor, Tomaz de Aquino Porfírio, pela oportunidade concedida.
- Aos amigos Lucília, Angélica e Marconi pela valiosa ajuda e amizade.
- Aos amigos do LARA que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.
- À FINEP - Financiadora de Estudos e Pesquisa - pelo apoio financeiro.
- À INTERAGRO - Integração Agropecuária, município de São José da Lapa/MG e à Fazenda da Barra, município de Pedro Leopoldo/MG, pela concessão das amostras de soros suíno utilizadas neste trabalho.

SUMÁRIO

	Pág.
LISTA DE TABELAS	9
LISTA DE FIGURAS	10
RESUMO	12
1 INTRODUÇÃO	13
2 LITERATURA CONSULTADA	15
2.1 Classificação	15
2.2 Características gerais	15
2.3 Antigenicidade das proteínas virais	16
2.4 Cultivo celular	16
2.5 Infecção das células	17
2.6 Preparação dos antígenos	18
2.7 Pesquisa de anticorpos pela inibição da hemaglutinação	20
2.8 Detecção de anticorpos pelo ELISA	20
3 MATERIAL E MÉTODOS	22
3.1 Animais	22
3.2 Soros	22
3.3 Cultivos celulares	22
3.3.1 Meio de cultivo	23
3.3.1.1 Meio de crescimento celular	23
3.3.1.2 Meio de manutenção	23
3.3.1.3 Garrafas de cultivo	23
3.3.2 Cultivo celular primário de rins de suíno	24
3.3.2.1 Coleta de rins	24
3.3.2.2 Processamento	24
3.3.3 Cultivo de célula de linhagem (SK ₆)	25
3.4 Amostra de vírus	25
3.5 Produção de antígenos	25
3.5.1 Infecção das células	25

3.5.2	Obtenção da suspensão viral	26
3.5.3	Preparo dos antígenos do ELISA	26
3.5.4	Dosagem protéica	27
3.5.5	Eletroforese em gel de poliacrilamida - PAGE	27
3.6	Hemácias	27
3.7	Pesquisa de antígeno hemaglutinante	27
3.8	Pesquisa de anticorpos inibidores da hemaglutinação	28
3.8.1	Tratamento dos soros	28
3.8.2	Teste de inibição da hemaglutinação	28
3.9	Desenvolvimento do teste imunoenzimático	28
3.9.1	Conjugado	28
3.9.2	Titulação em bloco	29
3.9.3	ELISA	29
3.9.3.1	Soros	29
3.9.3.2	Método	29
3.9.3.3	Leitura	30
3.10	Avaliação estatística	30
4	RESULTADOS	31
4.1	Cultivos celulares - CPRS, SK ₆ , controles	31
4.2	Infecção das células	31
4.3	Obtenção da suspensão viral	32
4.4	Preparação dos antígenos	32
4.5	Eletroforese	32
4.6	Dosagem protéica	33
4.7	Pesquisa de anticorpos inibidores da hemaglutinação	33
4.8	Titulação em bloco	33
4.9	Pesquisa de anticorpos pelo ELISA	34
4.10	Comparação dos resultados de HI e ELISA	34
4.11	Análise de correlação	35
5	DISCUSSÃO	36
5.1	Cultivo celular	36
5.2	Infecção das células	37
5.3	Pesquisa de anticorpos pelo método de HI	38
5.4	Purificação do antígeno	38
5.5	Padronização do ELISA	39
5.6	Pesquisa de anticorpos pelo ELISA	40
6	CONCLUSÕES	44
7	SUMMARY	45

4
3

4
4



LISTA DE TABELAS

		Pág.
TABELA 1	Títulos de HI e resultados do ELISA em absorvância, das amostras de soros suíno provenientes de granjas sem vacinação para parvovirose suína.	49
TABELA 2	Títulos de HI e resultados do ELISA em absorvância, das amostras de soros suíno provenientes de granjas com vacinação para parvovirose suína.	51
TABELA 3	Resultados das 104 amostras de soros suínos testadas pelas provas de HI e ELISA.	53
TABELA 4	Multiplicação da amostra de parvovirus suíno NADL-2 em cultivo primário de rins de suíno e avaliação das condições de metabolismo do meio de cultura (após 7 dias).	54
TABELA 5	Multiplicação da amostra de parvovirus suíno NADL-2 em cultivo de SK ₆ e avaliação das condições de metabolismo do meio de cultura (após 8 dias).	55
TABELA 6	Título hemaglutinante das amostras do sobrenadante, colchão e sedimento das suspensões inoculadas com parvovirus suíno NADL-2 e dos controles celulares, após ultracentrifugação.	56

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
FIGURA 1 Distribuição de frequência de títulos dos soros de granjas com vacinação para parvovirose suína pela prova de HI.	57
FIGURA 2 Resultados do ELISA em absorbância, em relação às diluições dos soros positivo e negativo para parvovírus suíno, com 75 ng de antígenos (conjugado 1:5000).	58
FIGURA 3 Resultados do ELISA em absorbância, em relação às diluições dos soros positivo e negativo para parvovírus suíno, com 150 ng de antígenos (conjugado 1:5000).	59
FIGURA 4 Resultados do ELISA em absorbância, em relação às diluições dos soros positivo e negativo para parvovírus suíno, com 300 ng de antígenos (conjugado 1:5000).	60
FIGURA 5 Resultados do ELISA em absorbância, em relação às diluições dos soros positivo e negativo para parvovírus suíno, com 600 ng de antígenos (conjugado 1:5000).	61
FIGURA 6 Distribuição de frequência dos resultados do ELISA em absorbância dos soros negativos pela prova de HI.	62
FIGURA 7 Distribuição de frequência dos resultados do ELISA em absorbância dos soros positivos pela prova de HI.	63
FIGURA 8 Distribuição de frequência dos resultados do ELISA em absorbância dos soros negativos e positivos pela prova de HI.	64

- FIGURA 9 Dispersão dos resultados do ELISA em absorbância, em relação ao título de HI. 65
- FIGURA 10 Dispersão dos resultados do ELISA em absorbância, em relação ao logaritmo do título de HI por amostra. 66

RESUMO

Um ensaio imunoenzimático (ELISA)-indireto foi padronizado para detectar anticorpos anti-parvovírus suíno. Os antígenos foram produzidos em cultivos primário (CPRS) e de linhagem contínua de rins de suíno (SK6), e processados por ultracentrifugação (80.000 x g, 4°C, 18h) em colchão de sacarose 30% (v/v). Um total de cento e quatro amostras de soros suíno, sendo cinquenta e uma provenientes de granjas sem vacinação e histórico da doença, e 53 de granjas que empregavam a vacina em seus programas profiláticos, foram utilizadas na padronização do ELISA. A comparação com a prova de inibição da hemaglutinação (HI), mostrou que ambos os testes foram sensíveis na detecção dos anticorpos. O coeficiente de correlação ($r = 0.93$), indicou uma forte correlação entre os valores individuais de absorbância obtidos no ELISA e os títulos do HI. Concluiu-se que o ELISA foi mais rápido e econômico, além de poder ser totalmente automatizado.

Palavras chave: ELISA, anticorpos, parvovírus, suíno.

Key words: ELISA, antibodies, parvovirus, swine.

1 INTRODUÇÃO

A suinocultura industrial adquiriu em todo o mundo características que envolvem a presença de plantéis com grande número de animais, criados em sistema de confinamento, e que praticam programa de melhoramento genético através da renovação do plantel de matrizes. Conseqüentemente, essas características levaram ao surgimento de condições epidemiológicas que favorecem o aparecimento de problemas de ordem reprodutiva e sanitária.

Muitos agentes têm sido incriminados como determinantes de falhas reprodutivas e entre eles destaca-se o parvovírus suíno (P.V.S.). Este vírus que foi inicialmente associado com problemas reprodutivos, vem se mostrando endêmico na maioria dos países onde é pesquisado.

As manifestações reprodutivas causadas pelo parvovírus suíno dependem da amostra do vírus, da via e idade de infecção, caracterizados por morte embrionária e fetal, mumificação, abortos, fetos natimortos, partos com pequeno número de crias e repetições deaios. Estas alterações ocorrem geralmente em matrizes de primeiro e segundo parto, pois as mesmas não apresentam níveis protetores de anticorpos na época da cobertura. Assim, a avaliação do grau de imunidade das matrizes, especialmente das marrãs que se encontram dentro de plantéis positivos, possibilita maior controle da doença e a escolha das melhores técnicas específicas de manejo.

No Brasil o primeiro estudo relacionado ao parvovírus suíno foi realizado no estado de Minas Gerais onde encontrou-se uma prevalência de 55,3% de animais positivos indicando que o vírus encontrava-se bastante disseminado nos plantéis estudados. A atual situação da doença tem sido pouco pesquisada porém deve-se esperar uma alta taxa de prevalência de anticorpos devido ao emprego de vacinas no programa sanitário das granjas.

O diagnóstico virológico da parvovirose tem sido realizado pela pesquisa de antígenos presentes em órgãos de animais infectados através de imunofluorescência e testes imunoenzimáticos. Em levantamentos sorológicos, o teste de inibição da hemaglutinação (HI) tem sido o mais empregado e apesar de simples execução, este teste

apresenta alguns fatores limitantes, entre eles, a quantidade de antígeno gasto e a necessidade do pré-tratamento das amostras de soro através da adsorção de hemácias de cobaia e caolim, visando respectivamente, a remoção de hemaglutininas naturais e inibidores inespecíficos da hemaglutinação, o que torna o método trabalhoso e demorado.

O "enzyme linked immunosorbent assay" (ELISA) é considerado atualmente importante ferramenta no diagnóstico das doenças. Este teste tem mostrado boa especificidade e sensibilidade quando comparado com outros testes de diagnóstico. Outras vantagens apontadas no uso do ELISA é que ele pode ser automatizado, tornando sua execução mais rápida e econômica, o que possibilita o exame de um grande número de amostras, e seu emprego em levantamentos sorológicos.

O presente trabalho teve como objetivos:

- desenvolvimento e padronização de um teste de ELISA indireto para detecção de anticorpos anti-parvovirus suíno, utilizando soros provenientes de granjas com e sem vacinação para parvovirose suína;
- comparação dos resultados obtidos no teste de ELISA com os encontrados no teste de inibição da hemaglutinação.

2 LITERATURA CONSULTADA

2.1 CLASSIFICAÇÃO

Os parvovírus segundo Berns (1990) pertencem a família Parvoviridae constituída pelos gêneros parvovírus, dependovírus -"adeno associated vírus" e densovírus -"denonucleosis vírus", estando entre os menores vírus DNA dos animais.

2.2 CARACTERÍSTICAS GERAIS

Os parvovírus possuem uma estrutura simples com três proteínas virais (VP's) e DNA linear de fita simples com 5000 bases. As partículas medem de 18 a 26 nm de diâmetro, com simetria icosaédrica, peso molecular de $5,5$ a $6,2 \times 10^6$ daltons, sendo que aproximadamente 80% desta massa é constituída de proteínas e o restante de ácido nucléico. A densidade de bandejamento em gradiente de césio é de 1,39 a 1,42 g/cm^3 e de 1,30 a 1,32 g/cm^3 para as partículas cheias e vazias respectivamente. Por sua simplicidade estrutural, o vírion possui alta resistência à inativação, sendo estável em pH entre 3 e 9 e à temperatura de 56°C por 30 minutos (Berns, 1990).

Existem duas "janelas de leitura" (ORF's) no genoma do parvovírus suíno, NADL-2, sendo que o da metade esquerda do DNA codifica uma proteína não estrutural (NS 1) de 662 aminoácidos e peso molecular de 75000 daltons (Vasudevacharya et al., 1990) e segundo Ranz (1989) a da metade direita codifica as proteínas estruturais VP₁, VP₂ e VP₃. A replicação do DNA do parvovírus acontece no núcleo, havendo a necessidade de que a célula se encontre na fase "S", sugerindo uma relação próxima entre a replicação viral e a celular. Nesta fase temos o envolvimento de DNA-polimerases de origem celular principalmente a δ e α . O DNA de fita simples é convertido para a forma replicativa dupla (RF), processo este que é iniciado no "hairpin" 3' da fita parental. Em um segundo estágio temos a replicação das fitas progênie a partir das RF's, que têm início no final direito destas formas replicativas (Berns, 1990).

2.3 ANTIGENICIDADE DAS PROTEÍNAS VIRAIS

Mengeling et al. (1988) estudando o tamanho e relação antigênica das proteínas estruturais dos parvovírus autônomos, encontraram que a VP₁, VP₂ e VP₃ do parvovírus suíno com pesos moleculares de 82500, 65000 e 62000 daltons respectivamente, guardam uma recíproca relação antigênica com as proteínas virais dos parvovírus canino e felino.

Os anticorpos produzidos em coelhos anti-glicoproteínas VP₁, VP₂ e VP₃ do parvovírus foram capazes de reagir com a partícula viral e neutralizar sua infectividade. Estes anticorpos foram qualitativamente semelhantes àqueles presentes nos soros de suínos naturalmente infectados e de coelhos experimentalmente imunizados com a partícula viral completa (Molitor et al., 1983).

2.4 CULTIVO CELULAR

Cartwright & Huck (1967) realizaram 111 isolamentos virais a partir de amostras de órgãos, muco vaginal e sêmen, provenientes de rebanhos com histórico de infertilidade e abortos, utilizando cultivos celulares de rins de suíno. Noventa e seis desses isolamentos pertenciam a amostra FS 59E/63, que foi também isolada em cultivo primário de rins de leitões jovens obtidos de propriedades com evidência sorológica da doença.

O isolamento do parvovírus suíno foi realizado a partir de um lote comercial de tripsina, utilizando-se cultivo de linhagem de testículos de suíno. O sedimento obtido pela centrifugação (80.000 x g por uma hora) de uma solução de tripsina 3,09% em PBS pH 7,2, foi inoculado em tubos de Leighton, e sub-cultivados por três passagens. A observação das lamínulas coradas com conjugado anti-parvovírus suíno mostrou a formação de focos fluorescentes nucleares típicos deste vírus a partir do terceiro dia de incubação, e a avaliação da atividade hemaglutinante pela prova de hemaglutinação (HA), revelou títulos de 32 e 256 nas segunda e terceira passagens, respectivamente (Croghan et al., 1973).

Mengeling (1975), investigando a presença de parvovírus em culturas fetais de rins de suíno, encontrou que três de 49 lotes estavam infectados por este vírus. Estas contaminações foram identificadas nos cultivos secundários por imunofluorescência 72 horas após a incubação, e apontadas como sendo de origem transplacentária.

Gouveia (1982) durante estudos da prevalência de anticorpos anti-parvovírus suíno, utilizou o cultivo celular primário de rim de suíno (CPRS) na produção de semente viral, apontando a necessidade do controle dos cultivos celulares para se evitar a contaminação das mesmas com o parvovírus suíno.

Lobato (1990) utilizou na produção de semente de vírus, cultivo primário de rins de suíno, em garrafas Roux semeadas com suspensões com $1,5 \times 10^6$ células/ml que após 48 horas alcançaram 60 a 80% de confluência. Julgou como desvantagens na utilização deste cultivo para produção de vacinas para parvovírus, a dificuldade de obtenção de doadores e o risco de se trabalhar com células naturalmente infectadas com este e outros vírus.

Quinze culturas de células de sete espécies de mamíferos (suíno, bovino, murídea, equino, canino, cetácea e caprino), foram avaliadas quanto à sensibilidade aos vírus da encefalomielite hemaglutinante e da parvovirose suína. As culturas celulares produzidas a partir de tecidos de suínos, da glândula tireóide de adultos, tecidos de pulmão e rins de embrião e de testículo, foram as mais sensíveis a ambos os vírus. Três linhagens contínuas de rins de suíno denominadas PK₁₅ (pig kidney) - ATCC, PK₁₅ (NADL) e PK₁₅ 2A apresentaram fraca sensibilidade aos vírus em estudo, sendo que os títulos infecciosos foram determinados apenas nas diluições 10^{-1} e 10^{-2} (Pirtle, 1974).

A sensibilidade de três células de linhagem de tecido suíno ST (swine testis), SK₆ (swine kidney), PK₁₅, à duas cepas de parvovírus suíno (NADL-2 e PVS-1) foram avaliadas quanto a presença de efeito citopático e atividade hemaglutinante. Os resultados apontaram a linhagem ST como a mais sensível e a SK₆ sensibilidade média. A linhagem PK₁₅ não evidenciou efeito citopático e nem atividade hemaglutinante durante as quatro passagens realizadas (Miranda, 1992).

Bachmann & Danner (1976) avaliaram a replicação do P.V.S. em cultivos de SK₆ nas temperaturas de 28, 33, 37 e 40°C. A replicação a 40°C determinou o aparecimento de partículas incompletas, enquanto que os cultivos incubados a 37°C apresentaram os melhores títulos infecciosos e hemaglutinantes.

2.5 INFECÇÃO DAS CÉLULAS

A queda do título hemaglutinante da amostra NADL-2, inicialmente de 8, foi observada a partir da segunda passagem em cultivo de rins, indicando que este fato poderia se dever a uma possível contaminação da amostra por partículas incompletas. Foi realizado então, um processo de purificação por diluição em ponto final na tentativa de se eliminar ou diminuir tais partículas, obtendo-se amostras com títulos hemaglutinantes de 512 a 1024. Finalmente, concluiu-se que este processo melhorou o título da semente, porém não foi suficiente para eliminar as partículas defectivas encontradas nas sementes (Lobato, 1990).

Choi et al. (1987) estudaram a influência das partículas vazias na replicação do parvovírus suíno utilizando células de linhagem ST, infectadas com inóculos produzidos com variadas taxas de partículas vazias e cheias (vazias/cheias), e também através da prévia adsorção dos cultivos com inóculos contendo partículas vazias (10^4 a 10^{10} partículas / 0,1 ml), seguidas pela adsorção com partículas cheias. Isto levou no primeiro caso, a diminuição do título de HA de 512 para 4 quando a relação partículas vazias/cheias variaram de 0:1 a 10:1 e a diminuição do número de focos fluorescentes por células de mais de 350 vezes quando as taxas variaram de 0:1 para 50:1. A adição de $2,5 \times 10^5$ partículas vazias/ célula reduziu em 85%, 82% e 100% o número de focos fluorescentes dos cultivos que receberam $2,5 \times 10^5$, $2,5 \times 10^4$ e $2,5 \times 10^3$ partículas cheias respectivamente.

A passagem seriada da amostra de parvovírus H-1 em cultivos de células renais de recém-nascidos humanos, utilizando altas taxas de multiplicidade de infecção gerou o surgimento de partículas defectivas. Muitas dessas partículas necessitaram de um "helper-vírus" para sua replicação e além disso pareceram ser defectivas na síntese de proteínas do capsídeo, VP₁ e VP₂ (Rhode, 1978).

A caracterização genômica das formas replicativas (RF-DNA) das amostras NADL-8 e NADL-2, foram realizadas por Molitor et al. (1984), encontrando que a primeira possui o RF-DNA com aproximadamente 5000 pares de bases e o segundo com dois tipos de RF-DNA; um com 5000 pares de bases e semelhante ao da amostra NADL 8, e outra que possui deleção de trezentos pares de bases na região que codifica as proteínas do capsídeo viral, representando uma variante defectiva.

2.6 PREPARAÇÃO DOS ANTÍGENOS

A purificação do parvovírus suíno a partir de tecidos infectados com a amostra NADL-8, foi feita através de ultracentrifugação em gradiente descontínuo de cloreto de céσιο, apresentou bandas que continham partículas vazias e cheias. Ambas as preparações ao serem submetidas a eletroforese em gel de poliacrilamida, mostraram conter três tipos predominantes de proteínas virais (VP's) VP₁, VP₂, VP₃ com peso molecular de 83, 64 e 60 kd. A distribuição das VP's variou nas partículas cheias e vazias, sendo que as primeiras mostraram maior abundância de VP₃ e as últimas de VP₂. Demonstrou que estas proteínas são semelhantes estruturalmente, e quando inoculadas em coelhos, apresentaram capacidade de gerar resposta imune (Molitor et al., 1983).

Choi et al. (1987) durante os trabalhos de purificação da amostra KRESSE, utilizaram um procedimento modificado com base no de Molitor et al. (1983) encontrando como principal contraste, a presença de apenas duas proteínas virais, VP₁ e VP₂ nas partículas vazias, explicado como resultado da realização de cinco ciclos de purificação em gradiente de cloreto de céσιο.

A amostra H-45 isolada a partir de fezes de uma leitoa com histórico de diarreia, foi purificada por ultracentrifugação em gradiente de cloreto de céσιο, sendo que as bandas obtidas em 1,40 g/ml e 1,30 g/ml foram submetidas a análise eletroforética em gel de poliacrilamida, indicando que as partículas cheias apresentaram quatro proteínas VP₁, VP₂, VP₃ e VP₄ com pesos moleculares de 81, 70, 66 e 62 kd respectivamente (Yasuhara et al., 1989).

Hohdatsu et al. (1988) utilizaram no preparo do antígeno para o desenvolvimento de um teste imunoenzimático, o tratamento da suspensão viral com fluorcarbono seguido por ultracentrifugação em gradiente descontínuo de sacarose, sendo que as bandas formadas foram novamente tratadas com fluorcarbono. O antígeno quando submetido a eletroforese em gel de poliacrilamida, revelou a presença de sete tipos de proteínas, sendo que três delas (83, 64, 60) reagiram com soro positivo para parvovírus no "western immunoblotting".

Westenbrink et al. (1989) utilizaram para concentrar suspensão de parvovírus produzida em cultivo primário de rim de suíno, polietileno glicol (PM 6000) na concentração final de 10%. O sedimento formado foi ressuspensionado com água desmineralizada, dializado contra PBS pH

7,4 e posteriormente ultracentrifugado em colchão de sacarose 30% (v/v).

2.7 PESQUISA DE ANTICORPOS PELA INIBIÇÃO DA HEMAGLUTINAÇÃO

Mengeling (1972), durante a pesquisa da prevalência de anticorpos para a cepa 123T de parvovírus suíno, padronizou um teste de inibição da hemaglutinação utilizando no tratamento dos soros a adsorção com hemácia de cobaia 50% (1:1), e 50 mg de caolim. O sistema foi mantido a temperatura ambiente por 30 minutos e logo após foi adicionada suspensão de hemácia de cobaia 0,5%, sendo consideradas positivas amostras que inibiram a hemaglutinação com títulos > 5.

A remoção das hemaglutininas naturais e de inibidores inespecíficos foi avaliada em um estudo que teve como variáveis, a espécie doadora e a concentração das suspensões de hemácias, o tampão utilizado, e a proporção das suspensões de caolim empregadas no tratamento dos soros. Como resultados encontrou-se uma satisfatória remoção dos inibidores naturais sem a perda de atividade dos anticorpos específicos, quando os soros foram adsorvidos com uma solução de caolim 25% em tampão borato pH 9,0 e das hemaglutininas naturais quando 0,1 ml da papa de hemácias foram adicionadas ao soro tratado com caolim. Além disso, os mais altos títulos foram obtidos após a incubação dos testes por 18 horas a 4°C ou por duas horas a 37°C (Joo et al., 1976).

Vannier et al. (1984) realizaram um estudo sorológico visando avaliar a disseminação do parvovírus suíno, obtendo bons resultados quando foi empregado na pesquisa de anticorpos o método de Mengeling (1972), modificado apenas no período de incubação do sistema (uma noite a 4°C).

Gouveia (1982) utilizou a adsorção das amostras por um período de 30 minutos a temperatura ambiente, com suspensão de hemácia de cobaia a 50% e caolim a 25% nas proporções de 1:1:0,5 respectivamente. Os soros foram diluídos 1:2,5 e os animais com títulos superiores a 80 foram tomados como positivos na prova de inibição da hemaglutinação.

2.8 DETECÇÃO DE ANTICORPOS PELO ELISA

A técnica de ELISA tem sido largamente utilizada em todo o mundo no diagnóstico das enfermidades animais, sendo que na maioria dos testes é empregado o sistema enzima cromogênica-substrato. Deste modo, o

método indireto possui uma relação positiva entre a intensidade de cor produzida e a quantidade de anticorpos ligados (Wright et al., 1993).

Reis (1993), no desenvolvimento de um ELISA indireto para detecção de anticorpos para anemia infecciosa equina, obteve bons resultados no bloqueio dos sítios inespecíficos, com a utilização de uma solução salina fosfatada tamponada (PBS) pH 7,2 acrescida de 5% de leite em pó desnatado.

Barbosa (1994) estudando vírus intestinais RNA de fita dupla empregou no desenvolvimento do ELISA solução de bloqueio composta de caseína dois por cento.

Hohdatsu et al. (1988) desenvolveram um ELISA indireto para a pesquisa de anticorpos anti-parvovírus, utilizando um antígeno purificado em gradiente de sacarose e tratado com fluorcarbono. Na padronização da prova foi empregado um micrograma (μg) de antígeno por pocinho e o ponto de corte foi determinado com o uso de três desvios-padrões. Os resultados alcançados na comparação com a prova de HI utilizando 159 amostras de campo, mostraram que este ELISA foi mais sensível, uma vez que 13 amostras negativas no teste de inibição da hemaglutinação, tiveram valores de absorbância positivos. O coeficiente de correlação encontrado ($r = 0,94$) indicou uma alta correlação entre os valores de absorbância alcançados pelo ELISA e os títulos de HI.

Westenbrink et al. (1989) empregaram na pesquisa de anticorpos anti-parvovírus suíno um ensaio de ELISA sanduíche de duplo anticorpo. Esta prova foi comparada com a de inibição da hemaglutinação através da sorologia pareada de 34 amostras, indicando que ambos os testes foram sensíveis na detecção de anticorpos, e além disso, uma alta correlação foi encontrada ($r = 0,91$) entre os títulos de anticorpos obtidos pelos dois testes, a partir da análise de 52 amostras de campo.

Rimmelzwaan et al. (1991), pesquisando a presença de anticorpos anti-parvovírus canino em soros provenientes de populações com e sem história de diarreia aguda empregaram anticorpos monoclonais em dois sistemas de ELISA, um indireto e outro de bloqueio, encontraram que o primeiro sistema foi mais sensível uma vez que foi capaz de detectar sete amostras positivas com títulos baixos, os quais obtiveram resultados negativos no sistema de bloqueio.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 ANIMAIS

Foram utilizados como doadores de rins para a produção de cultivo primário, leitões recém-nascidos com um dia de idade e que não receberam colostro.

3.2 SOROS

Foram examinados um total de 104 amostras de soros suíno, sendo 51 provenientes de granjas que não receberam vacina contra parvovirose e não possuíam histórico da enfermidade, e 53 provenientes de granjas que empregavam a vacina em seu programa de controle sanitário.

3.3 CULTIVOS CELULARES

Na produção do antígeno viral foram empregados cultivo primário de rim de suíno (CPRS) e cultivo de célula de linhagem contínua de rim de suíno - SK₆ (Swine Kidney). Nos trabalhos com cultivos celulares, foram levados em conta as condições de confluência e metabolismo celular, e da esterilidade através da inoculação de amostras dos cultivos em infuso de cérebro coração¹ e caldo sabouraud dextrosado¹.

1 - Biobras - Bioquímica do Brasil - Montes Claros, Minas Gerais (Brasil)

3.3.1 MEIO DE CULTIVO

3.3.1.1 Meio de crescimento celular

Para os crescimentos dos cultivos foi empregado o Meio Essencial Minimum² - MEM - (com sais de Earle's, L-glutamina, sem bicarbonato) suplementado com 10% de soro fetal bovino³ e aliquotados em 400 ml por frasco. Foram adicionados aos frascos segundo Martinez et al. (1983), 5ug de fungisona⁴; 10ug de sulfato de gentamicina⁵ e 80 UI de penicilina G potássica⁶ por mililitro de meio. Durante o processo de produção o pH foi acertado para 7.2 através do borbulhamento de CO₂⁷ super seco (grau 4, 99,99% CO₂, 10 ppm H₂O) diretamente no meio de cultura.

3.3.1.2 Meio de manutenção

O meio de manutenção empregado teve a mesma formulação do meio de crescimento, porém acrescido de apenas 2% de soro fetal bovino.

3.3.1.3 Garrafas de cultivo

Os cultivos foram feitos em garrafas⁸ de poliestireno com 75 cm² de superfície semeadas com volume de 20ml de suspensão celular.

2 - Gibco Laboratories - Grand Island, New York (USA)

3 - Nutricel - Campinas, São Paulo (Brasil)

4 - Squibb - São Paulo - SP (Brasil)

5 - Indústria Química e Farmacêutica Schering S/A - Rio de Janeiro (Brasil).

6 - Fontoura-Wyeth - São Bernardo do Campo, São Paulo (Brasil).

7 - AGA S.A. gases especiais - Belo Horizonte, Minas Gerais (Brasil).

8 - Corning - São Paulo - São Paulo (Brasil)

3.3.2 CULTIVO CELULAR PRIMÁRIO DE RINS DE SUÍNO - CPRS

3.3.2.1 Coleta de rins

Os leitões foram sacrificados por eletrocussão, sendo os rins retirados imediatamente, e colocados em frasco contendo meio de cultura previamente tratado com duas vezes a concentração de antibióticos utilizada no meio de crescimento celular. Os rins foram mantidos a 4°C, e deste modo puderam ser utilizados na produção do cultivo até 24 horas pós-coleta.

3.3.2.2 Processamento

Foi realizado segundo Lobato (1990) com as seguintes modificações: a cápsula fibrosa foi retirada e a córtex renal cortada em fragmentos de dois a três milímetros. A massa de tecido obtida foi lavada de três a quatro vezes com salina fosfatada tamponada pH 7,2 (PBS) tratada com antibiótico de acordo com o item 3.3.2.1. Em seguida foram adicionados 40 a 50 ml de tripsina⁹-EDTA 0,001M (NaCl 0,002 M, KCl 0,004 M, KH₂PO₄ 0,008 M) e o sistema mantido sob agitação a 37°C por 15 minutos. O tecido que ainda não tinha sofrido a ação da tripsina foi decantado e o sobrenadante filtrado em um bequer com gaze, mantido em banho de gelo contendo 15 ml de soro fetal bovino. O processo foi repetido de cinco a seis vezes, e a suspensão celular obtida centrifugada¹⁰ a 500 x g, a 4°C por 10 minutos. O sedimento celular foi ressuspenso em meio de crescimento, diluído na concentração de 2,5 x 10⁵ células por ml e distribuído nas garrafas (20 ml / garrafa). Estas foram mantidas em estufa¹¹ a 37°C com atmosfera de 5% de CO₂ e, após 48 horas o meio de crescimento foi trocado. Ao alcançarem 100% de confluência foram preparadas suspensões celulares que receberam inóculo viral, como descrito no item 3.5.1. Foram colhidas amostras do sobrenadante celular para pesquisa de atividade hemaglutinante pela prova de hemaglutinação e para testes de inocuidade.

9 - Tripsina - Difco Laboratories - Detroit - Michigan (USA)

10 - International Equipment Company - IEC -B 20-A

11 - National Appliance Company - NAPCO 5200 - Oregon (USA).

3.3.3 CULTIVO DE CÉLULA DE LINHAGEM (SK₆)

Garrafas contendo cultivos de células SK₆ foram multiplicadas de acordo com Martínez et al. (1983), semeadas com 1×10^5 células/ml e mantidas a 37°C em estufa com atmosfera de 5% de CO₂. Do mesmo modo que no cultivo primário, as suspensões a serem inoculadas foram preparadas quando as garrafas atingiram 100% de confluência celular, sendo colhidas amostras do sobrenadante para a pesquisa de parvovírus suíno pelo método de hemaglutinação e para testes de inocuidade.

3.4 AMOSTRA DE VÍRUS

Na produção dos antígenos foi empregada a amostra de parvovírus suíno - NADL-2 oriunda do American Type Culture Cell (ATCC), cedida pelo Laboratório de Virologia da Escola de Veterinária da UFMG.

3.5 PRODUÇÃO DE ANTÍGENOS

Foram produzidos os antígenos utilizados no teste de inibição da hemaglutinação e no ELISA, de acordo com Gouveia (1982) e Westenbrink (1989), respectivamente. Antes da primeira passagem do vírus em cultivos primários e de linhagem contínua e durante as passagens subsequentes foram colhidas amostras de sobrenadante das garrafas inoculadas e das não inoculadas para avaliação do título hemaglutinante como descrito no item 3.7.

3.5.1 INFECÇÃO DAS CÉLULAS

O processo de infecção foi constituído de duas etapas: inicialmente a infecção do cultivo primário objetivando a produção de semente com bom título hemaglutinante, visto que a amostra NADL-2 apresentou título inicial de 64. Em seguida a semente obtida, com bom título hemaglutinante no CPRS, foi passada em cultivo de linhagem para obtenção das suspensões a serem purificadas.

Os dois tipos de cultivo foram infectados obedecendo a mesma sequência de etapas. As garrafas foram lavadas uma vez com PBS 7,2 e incubadas a 37°C tripsina-verseno 0,2%. Após o desprendimento das células, a tripsina foi descartada, sendo as mesmas resuspendidas com meio de crescimento, diluídas na concentração de $5,0 \times 10^5$ células/ml para cultivo primário e $2,5 \times 10^5$ para o de linhagem e distribuída em garrafas (19,9 ml/garrafa). A cada garrafa foi adicionado 100 µl de

parvovírus suíno diluído de 10^{-1} a 10^{-5} e, após homogeneização, a suspensão foi subdividida em cinco outras garrafas (4ml/garrafa). O volume de cada garrafa foi completado para 20ml com meio de manutenção. Os cultivos infectados foram mantidos em estufa a 37°C com 5% de CO_2 e observados diariamente sob microscópio ótico¹² para acompanhar o aparecimento de efeito citopático e as condições do meio. Este modelo de infecção forneceu a base para a escolha da diluição de trabalho na produção das suspensões virais. Paralelamente, as garrafas com células não infectadas foram processadas da mesma maneira, e os cultivos obtidos incubados para servirem de controles celulares.

3.5.2 OBTENÇÃO DA SUSPENSÃO VIRAL

Culturas de célula de linhagem inoculadas com a diluição de trabalho que exibiram efeito citopático sofreram três ciclos de congelamento e descongelamento. Em seguida foram centrifugadas¹⁰ a $2000 \times g$ a 4°C por 40 minutos para eliminação de debris celulares e o título hemaglutinante foi estabelecido pelo método da hemaglutinação. Parte da suspensão foi aliqüotada em ampolas criogênicas e estocadas em freezer -80°C ¹³ para serem utilizadas como antígeno da prova sorológica da inibição da hemaglutinação, e a outra processada para produzir o antígeno da prova de ELISA. As culturas controles foram igualmente tratadas, sendo avaliada a presença de títulos hemaglutinantes para parvovírus suíno e processadas para produzirem o antígeno celular da prova de ELISA.

3.5.3 PREPARO DOS ANTÍGENOS DO ELISA

O processamento dos antígenos foi realizado por ultracentrifugação¹⁴ em colchão de sacarose de acordo com o estabelecido por Westenbrink et al. (1988), com as seguintes modificações: o sobrenadante dos cultivos infectados e não infectados foram colocados sobre 5ml de colchão de sacarose 30% (p/v) e centrifugados a $80000 \times g$ a 4°C por 18 horas. O sedimento formado foi ressuspendido com um mililitro de P.B.S. pH 7,2, aliqüotado em ampolas criogênicas e estocadas em freezer -80°C . O título hemaglutinante foi pesquisado em amostras do sobrenadante, do colchão, e do sedimento viral, colhidas após a etapa de ultracentrifugação.

12 - Leitz Diarvet Germany

13 - REVCO - Ultra - Low - Asheville North Caroline - USA

14 Beckman L 50 - rotor SW 27

3.5.4 DOSAGEM PROTÉICA

Do sedimento viral ressuspendido, retirou-se uma alíquota para a dosagem protéica que foi feita pelo método de Lowry (1951), modificado.

3.5.5 ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA - PAGE

A eletroforese foi realizada com o emprego de gel de separação e o de concentração contendo 10 e 3% de poliacrilamida respectivamente. Na fórmula do tampão da amostra foram utilizados 2% (p/v) de dodecil sulfato de sódio (SDS), 2% de beta-mercaptoetanol (v/v), 10% de glicerol (v/v), 0,1% de azul de bromofenol (p/v) e 100mM de tris-HCl pH 6,8 (Hohdatsu et al., 1988).

3.6 HEMÁCIAS

Sangue de cobaias foi coletado em solução de Alsever através de punção cardíaca e mantida sob refrigeração a 4°C. As hemácias foram lavadas quatro vezes com PBS pH 7,2, sendo que na última foi empregado PBS pH 7,2 acrescido de 0,4% de soroalbumina bovina. As hemácias foram diluídas com PBS pH 7,2 com 0,4% de soroalbumina bovina para se obter suspensões de 0,5 e 50%, empregadas nas provas de hemaglutinação e inibição da hemaglutinação.

3.7 PESQUISA DE ANTÍGENO HEMAGLUTINANTE

A pesquisa de hemaglutininas foi feita pela prova de hemaglutinação em microtítulo segundo Gouveia (1982) com as seguintes modificações: - inicialmente foram distribuídos 25 µl de diluente em toda a placa (fundo em "v"). Vinte e cinco microlitros da amostra a ser testada foram colocados no primeiro poço, e a partir deste, realizaram-se diluições duplas utilizando-se pipeta multicanal¹⁵. Por último, foram acrescentados 50 µl de suspensão de hemácia de cobaia a 0,5% e mais 25 µl de diluente (correspondente ao volume do soro no teste inibição da hemaglutinação). O sistema foi agitado mecanicamente¹⁶ e mantido em geladeira a 4° C por duas horas.

15 - Titertek - 5 - 50 ul - 8 canais - Flow Laboratories Finland

16 - Microshaker II Dynatec - Alexandria, Virginia, USA.

O título foi expresso como a recíproca da maior diluição que determinou a hemaglutinação completa, sendo consideradas positivas reações com título igual ou superior a oito.

3.8 PESQUISA DE ANTICORPOS INIBIDORES DA HEMAGLUTINAÇÃO

3.8.1 TRATAMENTO DOS SOROS

Os soros foram tratados segundo Gouveia (1982) com as seguintes modificações: os soros foram inativados pelo calor (banho maria 56°C, 30 minutos).

Uma parte do soro foi adicionada a três partes de uma suspensão de caolim 25%, mantidas a temperatura ambiente por uma hora, sendo o sistema agitado em intervalos de 15 minutos. Após uma centrifugação a 500 x g, a 4°C por 10 minutos, o sobrenadante foi colhido, e adicionado igual volume de hemácias de cobaia a 50%. Os tubos foram retornados a temperatura ambiente por uma hora, agitados a cada 15 minutos e depois centrifugados a 500 x g por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi estocado a -20°C e a amostra original foi diluída a 1:8.

3.8.2 TESTE DE INIBIÇÃO DA HEMAGLUTINAÇÃO

Foi realizado de acordo com o preconizado por Gouveia (1982) com as seguintes modificações: as diluições seriadas com base dois foram realizadas com pipeta multicanal e a suspensão de hemácias empregada foi ajustada a 0,5%.

As amostras de soro foram processadas em duplicata e o título expresso como a recíproca da maior diluição que inibiu completamente a hemaglutinação, sendo consideradas positivas amostras com título igual ou superior a oito.

3.9 DESENVOLVIMENTO DO TESTE IMUNOENZIMÁTICO

3.9.1 CONJUGADO

O conjugado empregado foi cedido pelo Laboratório de Virologia Comparada do Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, produzido em

cabras inoculadas com IgG de suíno, e marcados com peroxidase segundo Wilson & Nakane (1978).

3.9.2 TITULAÇÃO EM BLOCO

Foram realizadas titulações em bloco com o objetivo de se conhecer a diluição de trabalho dos reagentes. As provas foram corridas com quantidades variáveis dos antígenos viral e celular (75, 150, 300 e 600 nanogramas/pocinho) frente a diluições variadas de um soro positivo, um soro negativo (1:50, 1:100, 1:200 e 1:400) e do conjugado (1:2000 de 1:5000, 1:10000, e 1:20000. Após a leitura em espectrofotômetro¹⁷, foi considerada diluição de trabalho a que apresentou a diferença de densidade ótica dos antígenos viral e celular que melhor diferenciou soro positivo do soro negativo.

3.9.3 ELISA

Foi empregado um teste de ELISA-indireto, utilizando-se placas de poliestireno¹⁸ com 96 poçinhos, adsorvidas com antígeno de captura na fase sólida.

3.9.3.1 Soros

Os soros foram previamente inativados pelo calor (como descrito no item 3.8.1) e diluídos em tampão de incubação (PBS-7.6, 0.05% Tween 20, 1% leite em pó desnatado).

3.9.3.2 Método

As microplacas foram adsorvidas, com 100 µl de antígenos por poço diluídos em tampão bicarbonato pH 9,6 (Na₂CO₃ 115mM), e incubados por 18 horas a 4°C. Após este período as placas foram lavadas três vezes com solução de lavagem (NaCl 0,15m; 0,05% (v/v) Tween 20-Inlab, 1% leite em pó-desnatado). Em seguida foram adicionados 150 µl de solução de bloqueio (PBS-pH-7,6; 5% leite em pó) por pocinho. O sistema foi mantido a temperatura ambiente por uma hora e entre todas as etapas subsequentes as placas foram lavadas cinco vezes e secadas em papel toalha. Descartada a solução de bloqueio foram distribuídos em cada poço 100 µl dos soros testes diluídos em tampão de incubação e as placas deixadas em temperatura ambiente por uma

17 - EIA - Multi-well reader- Sigma Diagnostics

18 - Dynatech M 129 B, Hindenburgstrasse - West Germany

hora. Após esta fase, 100 µl de conjugado anti-suíno diluído em tampão de incubação foram adicionados a cada pocinho, e as placas reincubadas à temperatura ambiente. Seguido a última lavagem, cada pocinho recebeu 100 µl de tampão citrato (ácido cítrico 25mm, NaH₂PO₄ 150Mm pH 5,0) contendo 20mg % de 1,2-ortofenilenodiamina (OPD) e 0,06% de peróxido de hidrogênio como substrato. O sistema foi incubado em câmara escura em temperatura ambiente por 15 minutos, e após a reação foi interrompida com 30 µl/pocinho de solução de ácido sulfúrico 4 N.

Em todos os testes foram incluídos os seguintes controles constituídos de suas respectivas etapas:

- a) do conjugado - etapas da adsorção antigênica, de bloqueio, utilização de tampão de incubação no lugar do soro teste, de conjugação, e emprego do substrato;
- b) do substrato - etapas de adsorção antigênica, de bloqueio, utilização de tampão de incubação em substituição ao soro-teste e ao conjugado, e emprego do substrato;
- c) do bloqueio - etapa do bloqueio utilizando soro-teste positivo, de conjugação, e emprego do bloqueio;
- d) controle positivo - incluiu todas as etapas;
- e) controle soro negativo - incluiu todas as etapas.

3.9.3.3 Leitura

A leitura da densidade ótica das reações foi realizada em espectrofotômetro com filtro de 492 nm. Os resultados foram obtidos através da subtração dos valores de absorbância encontradas no pocinho adsorvido com o antígeno celular, dos valores encontrados no pocinho adsorvido com antígeno viral.

3.10 AVALIAÇÃO ESTATÍSTICA

A sensibilidade e especificidade do teste de inibição da hemaglutinação frente ao ELISA, foram determinados segundo o preconizado por Sanchez-Vizcaino & Alvares (1981). Os valores de absorbância encontrados no ELISA foram correlacionados com os logaritmos dos títulos de anticorpos obtidos no teste de inibição da hemaglutinação através da medida do coeficiente de correlação ("Minitab for Windows" - versão 9.0)

4 RESULTADOS

4.1 CULTIVOS CELULARES - CPRS, SK₆, CONTROLES.

O CPRS demonstrou ser um bom sistema principalmente por seu rendimento celular. Em 48 horas de incubação as garrafas apresentavam 40-50% de confluência celular com o meio ainda pouco metabolizado, contendo células mortas e hemácias; após a troca do meio, o que possibilitou a eliminação das mesmas, os cultivos alcançaram 100% de confluência em dois dias, exibindo ótima morfologia celular. Do mesmo modo os cultivos de linhagem tiveram um rendimento celular satisfatório e as garrafas atingiram confluência total em 48 horas exibindo meio acidificado e com poucas células mortas no sobrenadante.

Ambos os cultivos apresentaram resultados negativos na pesquisa de atividade hemaglutinante durante as passagens, avaliados pela prova de hemaglutinação, e também na pesquisa de bactérias e fungos.

4.2 INFECÇÃO DAS CÉLULAS

Cultivos primários inoculados com diluições seriadas de 10^{-1} a 10^{-5} foram observadas até o sexto dia pós-infecção, quando já se mostravam acidificados. O efeito citopático teve início após 72 horas e não foi observado em todas as diluições.

Garrafas inoculadas com as diluições 10^{-1} e 10^{-2} foram as que apresentaram considerável efeito citopático, cerca de 70-80% e 40-50% respectivamente, evidenciado pela presença de células arredondadas e refringentes com posterior descolamento do tapete. As amostras submetidas ao teste de hemaglutinação apresentaram título de 1024 e 512 para estas diluições (TAB. 4).

Os cultivos inoculados com as diluições 10^{-3} , 10^{-4} e 10^{-5} apresentaram discreto efeito citopático e títulos menores que 128. Baseado nestes resultados foram separadas as sementes com o título de 1024 para serem inoculadas nos cultivos de linhagem.

As culturas de linhagem SK₆ inoculadas com as sementes obtidas anteriormente tiveram comportamento semelhante ao cultivo primário e foram congeladas no oitavo dia. Os cultivos apresentaram-se acidificados a partir do terceiro dia, e o efeito citopático só foi observado a partir de 120 horas nas culturas inoculadas de 10⁻¹ e 10⁻². Nestas, os efeitos citopáticos alcançaram de 80-90% e 60-70% e os títulos de 2048 e 1024 respectivamente. As demais diluições tiveram discreto efeito citopático e os títulos menores que 128 (TAB. 5).

As garrafas controles de cultivos primários e das células de linhagem apresentaram-se com os meios acidificados, não exibindo efeito citopático nem atividade hemaglutinante pela prova de hemaglutinação. Não houve crescimento de bactérias e fungos tanto nos cultivos inoculados como nos controles.

4.3 OBTENÇÃO DA SUSPENSÃO VIRAL

A massa viral utilizada na produção do antígeno foi aquela obtida do conjunto as garrafas de cultivo e linhagem que receberam inóculo 10⁻¹ e com o título de 2048 unidades hemaglutinantes por 25 µl de amostra do parvovírus NADL-2.

4.4 PREPARAÇÃO DOS ANTÍGENOS

O sedimento obtido no processo de centrifugação das suspensões virais e dos controles foi ressuspenso com um mililitro de P.B.S. pH 7,4, homogeneizado e aliquotado. Após a centrifugação, amostras do sobrenadante, do colchão de sacarose e do sedimento viral foram submetidas à prova de hemaglutinação, fornecendo, respectivamente os valores 2, 4, 32.784 unidades hemaglutinantes por 25 µl. Não foi observada atividade hemaglutinante (título < 8) nas amostras do sobrenadante, colchão e do sedimento formado nos tubos com suspensões controles (TAB. 6).

4.5 ELETROFORESE

A eletroforese em gel de poliacrilamida realizada de acordo com o item 3.5.5 revelou que a amostra do sedimento viral obtida após a centrifugação em sacarose continha além das bandas protéicas virais, bandas de origem não viral que também se encontravam presentes no gel da amostra controle.

4.6 DOSAGEM PROTÉICA

Após a ultracentrifugação, a dosagem protéica das amostras dos antígenos viral (positivo) e celular (negativo) através do método de Lowry (1951) modificado forneceu as concentrações de 1.970 e 1.647 μg de proteína por mililitro de antígeno, respectivamente.

4.7 PESQUISA DE ANTICORPOS INIBIDORES DA HEMAGLUTINAÇÃO.

Foram examinadas 104 amostras de soro suíno pela prova de inibição da hemaglutinação. O tratamento dos soros com a suspensão de caolim 25% e hemácias de cobaia a 50% determinou a completa remoção dos inibidores inespecíficos e das hemaglutininas naturais. Todas as 51 amostras de soros provenientes de propriedades que não receberam vacinas e não possuíam história da enfermidade, foram consideradas negativas pela prova de inibição da hemaglutinação (título < 8).

As cinquenta e três amostras de soro provenientes de granjas com vacinação para parvovírus suíno apresentaram títulos que variaram de 64 a 8192. A FIG. 1 ilustra a distribuição de frequência destas amostras.

4.8 TITULAÇÃO EM BLOCO

As FIG. 2 e 3 apresentam os valores de absorbância obtidos a partir da titulação em bloco com os antígenos nas concentrações de 75 e 150 ng frente as diluições dos soros positivo e negativo, e o conjugado 1:5000. Os resultados mostraram baixos valores de absorbância quando foi utilizado antígeno na concentração de 75 nanogramas (ng)/pocinho frente às diluições dos soros. Com 150 ng/pocinho os valores de absorbância foram mais altos, mas não diferenciaram bem o soro positivo do negativo.

As concentrações de 300 e 600 ng de antígeno por pocinho confrontadas com as diluições do soro de 1:200 e 1:50, 1:100 respectivamente, constituíram as melhores diluições capazes de diferenciar soro positivo de soro negativo, apesar de não ter havido diferença significativa entre elas. Deste modo ficou estabelecido que nos testes de ELISA os antígenos seriam utilizados com 300 ng/pocinho e os soros diluídos a 1:200. As FIG. 4 e 5, indicam respectivamente os valores de absorbância obtidos a partir da titulação em bloco com os antígenos de 300 e 600 ng frente as diluições dos soros positivo e

negativo, e o conjugado 1:5000. O conjugado diluído a 1:5000 determinou os melhores valores de absorbância frente as diluições dos antígenos e dos soros.

4.9 PESQUISA DE ANTICORPOS PELO ELISA

Após a padronização do teste foram analisadas as 104 amostras de soros, sendo 51 negativos e 53 positivos pela prova de inibição da hemaglutinação. A FIG. 6 mostra a distribuição de frequência dos valores de absorbância obtido pelo ELISA, das 51 amostras negativas pelo teste de inibição da hemaglutinação. A partir destes valores foi calculado o ponto de corte do teste, empregando-se para isto, a média acrescida de dois desvios padrões. Deste modo, soros com a absorbância superiores à 0,093 foram considerados positivos para parvovirose suína no ELISA.

A FIG. 7 mostra a distribuição de frequência dos valores de absorbância obtido pelo ELISA das amostras provenientes de granjas com vacinação para a parvovirose, positivas pela prova de inibição da hemaglutinação.

A FIG. 8 indica a distribuição de frequência dos valores de absorbância obtidas no ELISA de todas as amostras de soros positivas e negativas na prova de inibição da hemaglutinação.

Os resultados do ELISA indicaram que uma amostra negativa no teste de inibição da hemaglutinação foi positiva no ELISA exibindo o valor de 0,095 (TAB. 1). Por outro lado uma amostra positiva na inibição da hemaglutinação com título de 128 foi considerada negativa no ELISA com valor de 0,086 (TAB. 2).

4.10 COMPARAÇÃO DOS RESULTADOS DE H.I. E ELISA

A comparação dos resultados dos testes de inibição de hemaglutinação e do ELISA, foi realizada a partir dos dados contidos na TAB. 3 segundo Sanchez-Vizcaino & Alvarez (1981):

$$\begin{aligned} \text{sensibilidade comparada} &= (a / a+c) \times 100 \\ \text{especificidade comparada} &= (d / d+b) \times 100 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{sensibilidade} &= (52 / 53) \times 100 = 98,1\% \\ \text{especificidade} &= (50 / 51) \times 100 = 98,0\% \end{aligned}$$

4.11 ANÁLISE DE CORRELAÇÃO

A dispersão dos valores de absorbância em relação ao título de inibição da hemaglutinação foi ilustrada por grupo na FIG. 9 e por amostra na FIG. 10, sendo esta última exibida em valores logarítmicos.

A análise de correlação entre os valores de absorbância dos soros testados pelo ELISA e dos logaritmos dos títulos de anticorpos obtidos pela prova de inibição da hemaglutinação determinou um coeficiente de correlação ($r = 0,93$).

5 DISCUSSÃO

5.1 CULTIVO CELULAR

Neste estudo a passagem do parvovírus suíno - NADL 2 em cultivo primário de rins de suíno (CPRS) foi justificado pelos achados de Lobato (1990) e Mengeling (1993 - informação verbal*). Foram obtidos resultados semelhantes aos destes autores e, embora não tenha sido avaliado se o processo de infecção dos cultivos levou à eliminação das partículas incompletas, houve um aumento do título hemaglutinante da amostra, inicialmente de 64.

Os resultados obtidos na pesquisa da atividade hemaglutinante nos controles dos cultivos primários e de linhagem, foram divergentes dos apresentados por Cartwright & Huck (1967), Mengeling (1975) e Croghan et al. (1973) indicando que os animais doadores não sofreram infecção transplacentária e que não houve contaminação da tripsina utilizada nos cultivos pelo parvovírus suíno.

Dados relacionados às condições de confluência celular e metabolismo do meio de cultura indicaram pequenas variações daqueles apresentados por Lobato (1990) que utilizou o CPRS na produção de semente de parvovírus suíno, obtendo inicialmente cultivos com 60 a 80% de confluência e bastante acidificados, os quais de 24 a 48 horas após a troca do meio atingiram confluência total. Tais variações podem ter ocorrido principalmente pela utilização de diferente suporte celular (garafas Roux) e de uma taxa mais elevada de concentração celular ($1,5 \times 10^6$ células/ml).

A produção do CPRS forneceu um ótimo sistema para trabalhos com o parvovírus suíno principalmente por sua fácil execução, porém em face da dificuldade de obtenção de leitões doadores para sua realização optou-se pela utilização de uma linhagem celular na produção dos antígenos.

* MENGELING, W. L. - USDA-ARS, National Animal Disease Center, P.O. Box 70, 2300 Dayton Ave., Ames, IOWA 50010, USA.

Duas linhagens de rins de suíno (SK₆, PK₁₅) foram avaliadas em um pré-experimento quanto à sensibilidade ao parvovírus suíno. Os resultados obtidos com a linhagem PK₁₅ foram semelhantes aos de Pirtle (1974) e Miranda (1992), uma vez que esta linhagem apresentou fraca sensibilidade ao parvovírus. Os trabalhos com a linhagem SK₆ mostraram que este cultivo foi mais sensível, o que concordou com Bachmann & Danner (1976) e Miranda (1992), justificando assim a sua escolha na produção dos antígenos.

5.2 INFECÇÃO DAS CÉLULAS

Em um estudo preliminar na tentativa da produção de semente de parvovírus suíno com bom título, garrafas de cultivos de SK₆ com 70% de confluência foram inoculadas com três ml das diluições decimais 10⁻¹ e 10⁻² da amostra NADL-2, conforme Gouveia (1982). Seguindo as fases de adsorção, realimentação e incubação a 37°C, as garrafas foram acompanhadas por sete dias para observação de efeito citopático e presença de atividade hemaglutinante. Apesar da boa sensibilidade deste cultivo ao parvovírus obteve-se como resultado, cultivos acidificados, ausência de efeito citopático e queda nos títulos hemaglutinantes (< 32). Tais observações concordaram com as de Lobato (1990) que embora tivesse empregado somente CPRS na produção da semente de trabalho, encontrou quedas nos títulos a partir da segunda passagem neste cultivo, indicando tratar-se da presença de partículas incompletas. A suspeita da presença dessas partículas foi reforçada pelos achados de Rhode (1978) e Molitor et al. (1984), uma vez que a amostra NADL-2 sofreu passagens seriadas em cultivos com alta multiplicidade de infecção e, a queda no título hemaglutinante concordou com os estudos de Choi et al. (1987) que mostraram ser a replicação do parvovírus inibida pela presença de partículas vazias.

Neste trabalho os cultivos foram infectados ainda em suspensão com diluições que variaram de 10⁻¹ a 10⁻⁵, na tentativa de eliminar ou diminuir as partículas vazias. Considerando-se que cada garrafa foi infectada na proporção de uma parte do inóculo para 99 partes de suspensão, cada diluição foi então diluída mais cem vezes. Por este processo a amostra com título inicial de 64 quando inoculada em CPRS com as diluições 10⁻¹ e 10⁻² atingiu os valores de 1024 e 512 respectivamente. Os cultivos de linhagem que receberam inóculos diluídos a 10⁻¹ e 10⁻² a partir da semente produzida no CPRS com título de 1024 alcançaram os títulos na prova de hemaglutinação de 2048 e 1024 respectivamente. Estes resultados concordaram parcialmente com os de Lobato (1990) que, apesar de ter conseguido uma semente com

título de 1024, observou sua queda para valores de 256 a 512 durante a produção da suspensão viral.

5.3 PESQUISA DE ANTICORPOS PELO MÉTODO DE INIBIÇÃO DA HEMAGLUTINAÇÃO

A prova de inibição da hemaglutinação empregada na detecção e quantificação de anticorpos para parvovírus suíno, constitui um método de fácil execução mas que tem sofrido variações nas metodologias utilizadas na sua padronização (Joo et al., 1976; Mengeling, 1972; Vannier, 1984).

Neste estudo a utilização do método de Gouveia (1982) apresentou bons resultados, porém em algumas amostras não houve a remoção completa das hemaglutininas naturais principalmente nas diluições mais baixas do soro. Estes resultados estiveram de acordo com Joo et al. (1976) que apontaram que a presença de inibidores inespecíficos da hemaglutinação e de hemaglutininas naturais no soro suíno constituíam fatores interferentes na interpretação dos resultados. Suspensões de caolim e hemácias de cobaia têm sido utilizadas por vários autores visando a remoção dos fatores anteriormente citados.

Em um pré-experimento foram avaliados tratamentos de soro frente a várias proporções de caolim 25% e suspensões de hemácias. A incubação de uma parte do soro com três partes de caolim 25% e posteriormente a adsorção com hemácia de cobaia 50% na proporção de 1:1, foi suficiente para eliminação completa dos inibidores inespecíficos e hemaglutininas naturais. Este tratamento foi semelhante ao de Joo et al. (1976), diferindo apenas na utilização de suspensões de hemácias a 50%, o que determinou uma menor demanda de sangue das cobaias doadoras.

5.4 PREPARAÇÃO DO ANTÍGENO

Os antígenos foram preparados por ultracentrifugação dos sobrenadantes viral e celular em colchão de sacarose conforme descrito no item 3.5.3. Após um ciclo de ultracentrifugação o sedimento viral formado apresentou alta atividade hemaglutinante, sendo que o mesmo não foi encontrado no sedimento do controle celular. A avaliação do antígeno viral através de eletroforese em gel de poliacrilamida - PAGE, revelou a presença de algumas bandas protéicas de origem não viral, indicando deste modo que o antígeno tinha sido parcialmente purificado por este processo. Esses resultados foram também encontrados por Hohdatsu et al. (1988) que utilizaram fluorcarbono no tratamento dos

sobrenadantes antes da etapa de ultracentrifugação em gradiente de sacarose.

Julgou-se importante destacar que foi realizado apenas um ciclo de centrifugação de 18 horas e apesar da purificação parcial, o antígeno apresentou bons resultados na etapa de padronização do ELISA. Outros autores utilizaram gradiente de cloreto de cézio em trabalhos de caracterização de novas amostras (Choi et al., 1987; Yasuhara et al., 1988), e estudos de propriedades antigênicas e estruturais do parvovírus (Molitor et al., 1983), obtendo-se preparações altamente purificadas mas que envolveram vários ciclos de ultracentrifugação, com baixo rendimento de massa antigênica.

5.5 PADRONIZAÇÃO DO ELISA

O ELISA indireto é largamente usado na detecção e mensuração de anticorpos, existindo uma relação direta entre a intensidade de cor e a quantidade de anticorpos ligados (Wright et al., 1993).

Na padronização, várias concentrações antigênicas foram testadas, sendo que as de 300 e 600 ng mostraram os melhores resultados. Não houve no entanto, diferença significativa entre elas, e a concentração de 300 ng/pocinho foi a escolhida como a de trabalho. Este antígeno apresentou um rendimento melhor do que o de Hohdatsu et al. (1988) uma vez que a concentração foi inferior aquela utilizada durante trabalhos preliminares com a amostra de parvovírus 90-HS encontrando os maiores valores de absorbância quando foram empregadas as concentrações de 1 e 2 µg/pocinho.

Neste trabalho foi empregada com bons resultados uma solução de bloqueio constituída de P.B.S. pH 7,6 acrescida de cinco por cento de leite em pó desnatado, estando de acordo com Reis (1993), sendo diferente do método empregado por Barbosa (1994) que utilizou para este fim, solução de caseína a dois por cento.

As FIG. 4 e 5 mostram que os soros-teste diluídos a (1:50 e 1:100), e (1:200), quando confrontados respectivamente com 600 e 300 ng de antígeno, determinaram os melhores valores de absorbância que diferenciaram os soros positivo e negativo. Porém pelo fato da utilização de um antígeno semi-purificado e um anticorpo revelador policlonal, optamos pelo emprego da diluição de 1:200. Deste modo a diluição de trabalho dos reagentes (300 µg de antígeno e soro diluído 1:200) diferenciaram dos utilizados por Hohdatsu et al. (1988), (1 µg de antígeno e soro 1:100).

O emprego do conjugado diluído 1:5000 foi justificado, pois esta diluição determinou valores de absorbância capazes de diferenciar o soro positivo do negativo, além de não determinar reações inespecíficas tanto com o soro negativo quanto com o controle do conjugado.

5.6 PESQUISA DE ANTICORPOS PELO ELISA

Na escolha de uma prova diagnóstica devemos levar em conta as características da sensibilidade e especificidade e para qual objetivo o teste será empregado. O ideal é que se obtenha um teste sensível, específico, simples e econômico, mas, o que em geral não acontece. O contrabalanço da sensibilidade e especificidade em uma prova de diagnóstico através da escolha de um ponto de corte, conduz a variações nos valores destas características, que em geral ocorrem em ordem inversa, ou seja, o aumento de uma leva à diminuição de outra.

Nos trabalhos com testes imunoenzimáticos, o ponto de corte é determinado por um valor obtido através da média das absorbâncias encontradas pelos soros negativos, acrescidos de dois a cinco desvios padrões (Reis, 1993).

O ponto de corte empregado neste estudo foi de 0,093, resultado alcançado pela média 0,046 acrescidos de dois desvios. Assim os soros com valores de absorbância igual ou superior a 0,094 foram considerados como positivos no ELISA.

Este ponto de corte possui um valor inferior ao obtido por Hohdatsu et al. (1988), de 0,197. Esta diferença pode ser explicada com base na quantidade de antígeno utilizado que foi de 1 µg/pocinho e também pelo fato de que este autor estabeleceu o ponto de corte utilizando a média dos soros negativos acrescido de três desvios padrões.

A análise da distribuição de frequência da FIG. 6 mostrou um soro negativo na prova de inibição da hemaglutinação com valor de absorbância acima do ponto de corte (0,095) e os dados de distribuição da FIG. 7 apontaram que um dos dois soros do intervalo de classe de 0,080 a 0,099 positivo pela prova de inibição da hemaglutinação, obteve valor inferior ao do ponto de corte (0,086), indicando se tratar de uma amostra falso-positiva e uma falso-negativa respectivamente. Os resultados apresentados na TAB. 3 indicam que ambos os testes foram sensíveis na detecção de anticorpos, não concordando com Hohdatsu et al. (1988) que demonstraram ser o ELISA mais sensível uma vez que de 33 amostras negativas pelo teste de inibição da hemaglutinação

treze foram positivas pelo ELISA. O número de soros falso-positivos no presente estudo foi menor que os obtidos por Westenbrink et al. (1989), encontrando que o ELISA indireto determinou vários destes resultados e justificando que estes poderiam ser determinados por atividade anti-célula de rins de suíno presente no soro de animais que receberam vacinas virais produzidas em cultivos de células deste tecido. Para contornar este problema, este autor desenvolveu um ensaio imunoenzimático de sanduíche duplo, utilizando um anticorpo de captura na fase sólida, obtendo em uma sorologia pareada de 34 amostras de soros, resultados igualmente sensíveis na detecção de anticorpos, quando comparado com a prova de inibição da hemaglutinação. Por outro lado a comparação das duas provas quando foram utilizadas 52 amostras de campo com títulos menores que 8192, indicou a presença de seis amostras que foram negativas no ELISA com títulos positivos no teste de inibição de hemaglutinação. No entanto achamos que se faz necessário a avaliação de dois fatores a partir dos resultados contidos na TAB. 3. Primeiramente, variações no ponto de corte para valores inferiores a 0,093 levaria ao surgimento de amostras positivas no ELISA que possuem resultados negativos no teste de inibição da hemaglutinação, e deste modo os resultados entrariam em concordância com os de Westenbrink et al. (1988) uma vez que esses seriam considerados falso-positivos. Por outro lado, a utilização de três desvios padrões conforme Hohdatsu et al. (1988) elevaria o ponto de corte para 0,116, determinando o surgimento de soros negativos no ELISA que possuem títulos positivos em testes de inibição da hemaglutinação e como consequência teríamos uma diminuição da especificidade do teste.

A segunda consideração diz respeito ao fato de que não foram testadas amostras com títulos baixos no teste de inibição da hemaglutinação, pois o menor valor encontrado nos soros provenientes das granjas com vacinação para parvovírus suíno foi de 64. Este fator foi também apontado por Westenbrink et al. (1989), que sustentaram que a maioria das amostras de soro de campo possuem título superior a 8192. Assim, não foi possível avaliar neste estudo se amostras com títulos ≤ 32 alcançariam valores de absorbância superiores ou inferiores ao ponto de corte escolhido. Ponderamos que os valores de sensibilidade e especificidade alcançados neste teste, poderiam ter sofrido alterações com base no que foi discutido anteriormente.

A análise da dispersão dos valores de absorbância dos soros obtidos no ELISA e os títulos encontrados na prova de inibição da hemaglutinação expressados por grupo, FIG. 9 e em escala logarítmica, FIG. 10, indicou forte correlação entre os valores, sendo que o coeficiente de correlação

foi de 0,93. Esses resultados estão de acordo com os de Westenbrink et al. (1988) e Hohdatsu et al. (1988).

Julgamos importante avaliar alguns fatores que poderiam implicar na melhoria do método de ELISA em estudo, como a produção dos meios empregados nos cultivos celulares, a escolha do ponto de corte e as características dos antígenos.

De acordo com o item 5.1, o acerto do pH dos meios foi realizado com a utilização de CO₂ super-seco, que demonstrou pouco poder de tamponamento devido as condições de acidez dos meios quando da obtenção das suspensões virais. Assim seria oportuno, durante o processo de produção dos meios, o emprego e avaliação de outros agentes com maior poder tamponante na faixa de pH entre 7,2 a 7,6, como o HEPES (N-2 hidroxietilpiperazina-N-2 ácido etanosulfônico - PM = 283,3) (Martinez, 1983), uma vez que foi exigido das culturas celulares após a infecção, longos períodos de incubação para a observação do aparecimento de efeito citopático.

Na escolha do ponto de corte foram empregadas amostras de soros de animais adultos provenientes de granjas que não empregavam vacina contra parvovirose suína em seu programa profilático e não possuíam história da enfermidade no plantel, sendo que o valor de 0,093 foi tido como satisfatório pelos resultados obtidos neste estudo. Porém, a utilização de soros de animais que não receberam colostro obtidos quando do corte do cordão umbilical, poderia levar a diminuição do valor do ponto de corte e conseqüentemente aumentar a sensibilidade do teste.

Os antígenos do teste de ELISA obtidos pela ultracentrifugação dos sobrenadantes viral e celular em colchão de sacarose, foram considerados apenas parcialmente purificados. Embora tenham fornecido bons resultados na padronização e desenvolvimento do teste frente os soros analisados, ponderou-se, que no ELISA-indireto, o emprego de um antígeno de captura purificado na fase sólida, conduziria a melhoria da especificidade da prova, e para este fim, apesar de envolverem longos ciclos de ultracentrifugação com baixo rendimento de massa antigênica, seria recomendado sua produção de acordo com Molitor et al. (1983) ou Choi et al. (1987). Estes antígenos poderiam ainda ser utilizados na produção de anticorpos específicos anti-parvovírus suíno, para um futuro desenvolvimento e padronização de um ELISA sanduíche de duplo anticorpo.

Por último, consideramos que seria importante o desenvolvimento e padronização de outros sistemas de ELISA, como os empregados por Westenbrink et al. (1988) ou Rimmelzwaan (1991), com o objetivo da produção de um teste com melhor perfil de especificidade e sensibilidade.

6 CONCLUSÕES

- A concentração protéica de 300 ng de antígeno/pocinho, frente a diluição de 1:200 dos soros-teste, determinou os melhores valores de absorbância capazes de diferenciar a amostra de soro positiva da negativa.
- A utilização de dois desvios padrão foi considerada satisfatória na determinação do ponto de corte do teste de ELISA.
- Os valores de absorbância encontrados pelo ELISA indicaram que o teste teve uma boa sensibilidade e especificidade (98,1 e 98,0% respectivamente) quando comparado ao da inibição da hemaglutinação.
- Os testes foram considerados igualmente sensíveis na pesquisa de anticorpos anti-parvovírus suíno na amostragem estudada, mas o ELISA mostrou ser um teste mais rápido e econômico, uma vez que um menor número de pessoas e quantidade de reagentes foram empregados na sua execução, quando comparados a da inibição da hemaglutinação.

7 SUMMARY

An indirect enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was standardized for the detection of antibodies to swine parvovirus. The antigens were produced in cultures of primary and continuous cell line (SK₆) of swine kidney, and processed by centrifugation (80.000 x g, 4°C, 18 h) through a 30% (v/v) sucrose bed. One hundred and four pig serum samples were used for ELISA standartization; among them, fifty-one were collected in herds which ones did not use vaccine against swine parvovirus and without any history of this disease. The other fifty-three were collected in herds which used vaccine against swine parvovirus in their preventive programs. The results obtained from ELISA and hemagglutination inhibition test (HI) were sensitive to detect antibodies to swine parvovirus. A strong correlation ($r = 0,93$) was found between individuals values of absorbance obtained from ELISA test and HI titers. It was concluded that ELISA test was faster and economic; besides it can be completely automatized.

Key words: ELISA, antibodies, parvovirus, swine.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BACHMANN, P.A., DANNER K. Porcine parvovirus infection in vitro: a study model for the replication of parvoviruses. *Zbl. Vet. Med. B*, v.23, n.5/6, p.355-363, 1976.
- BARBOSA, E.F. *Vírus intestinais RNA de fita dupla em frangos de corte no sudoeste catarinense: isolamento, caracterização e biologia molecular*. Belo Horizonte, 1994. 113p. Tese de doutorado. Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária.
- BERNS, I.K. Parvoviridae and their replication. In: BERNARD N. FIELDS, DAVID M. KNIPE. *Virology* (ed.), 2.ed. New York: Raven Press, 1990. p.1743-1763.
- CARTWRIGHT, S.F., HUCK, R.A. Viruses isolated in association with herd infertility, abortions and stillbirths in pigs. *The Veterinary Record* v.81, n.8, p.196-197, 1967.
- CHOI, C.S., MOLITOR, T.W., JOO, H.S. Inhibition of porcine parvovirus replication by empty virus particles. *Archives of Virology*, v.96, p.75-87, 1987.
- CROGHAN, D.L., MATCHETT, A., KOSKI, T.A. Isolation of porcine parvovirus from commercial tripsin. *Appl. Microbiol.*, v.26, p.431-433, 1973.
- GOUVEIA, A.M.G. *Alterações reprodutivas e prevalência de anticorpos inibidores de hemaglutinação para o parvovírus suíno no Estado de Minas Gerais*. Belo Horizonte, 1982. 58p. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária.
- HOHDATSU, T., BABA, K., IDE, S. et al. Detection of antibodies against porcine parvovirus in swine sera by enzyme-linked immunosorbent assay. *Veterinary Microbiology*, v.17, n.1 p.11-19, 1988.
- JOO, H.S., DONALDSON-WOOD, C.R., JOHNSON R.H. A standardised haemagglutination inhibition test for porcine parvovirus antibody. *Australian Veterinary Journal*, v.52, n.9, p.422-424, 1976.

- LOBATO, Z. I. P. *Avaliação da resposta sorológica de suínos imunizados contra o parvovírus suíno com uma vacina inativada experimental e pelo método de "feedback" (retroinfecção)*. Belo Horizonte, 1990. 90p. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária.
- LOWRY, O.H. et al. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, v.193, p.265-275, 1951.
- MARTINEZ, C. H. *Técnicas básicas de cultura celular*. Instituto Butantã/ Instituto Adolfo Lutz. São Paulo, 1983. 133p.
- MENGELING, W.L. Porcine parvovirus: properties and prevalence of a strain isolated in the United States. *Am. J. Vet. Res.*, v.33, n.11, p. 2239-2248, 1972.
- MENGELING, W. L. Porcine parvovirus: frequency of naturally occurring transplacental infection and viral contamination of fetal porcine kidney cell cultures. *Am. J. Res.*, v.36, n.1, p.41-44, 1975.
- MENGELING, W. L., RIDPATH, J. F., VORWALD, A. C.. Size and antigenic comparisons among the structural proteins of selected autonomous parvoviruses. *J. Gen. Virol.*, v.69, p.825- 837, 1988.
- MIRANDA, A.C.C. *Avaliação da sensibilidade das linhagens celulares ST, PK₁₅ e SK₆, ao parvovírus suíno*. Belo Horizonte, 1992. 49p. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária.
- MOLITOR, T.W., JOO, H.S. & COLLETT, M.S. Porcine parvovirus: virus purification and structural and antigenic properties of virion polypeptides. *Journal of Virology*, v.45, p.842-854, 1983.
- MOLITOR, T.W., JOO, H.S. & COLLETT, M.S. Porcine parvovirus DNA: characterization of the genomic and replicative form DNA of to virus isolates. *Virology*, v.55, p.554-559, 1984.
- PIRTLE, E.C. Titration of two porcine respiratory viruses in mammalian cell cultures by direct fluorescent antibody staining. *Am. J. Vet. Res.*, v.35, n.2, p. 249-250, 1974.
- RANZ, A.I. Porcine parvovirus: DNA sequence and genome organization. *J. Gen. Virol.*, v.70, p.2541-2553, 1989.

- REIS, J.K.P. *Desenvolvimento de um teste imunoenzimático (ELISA) para diagnóstico da anemia infecciosa equina*. Belo Horizonte, 1993. 54p. Dissertação de mestrado. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas.
- RHODE, S.L. Defective interfering particles of parvovirus H-1. *Journal of Virology*, v.27, p.347-356, 1978.
- RIMMELZWAAN, G.F. GROEN, J., EGBERINK, H. et al. The use of enzyme linked immunosorbent assay systems for serology and antigen detection in parvovirus and rotavirus infections in dogs in the Netherlands. *Vet. Microbiol.*, v.26, p.25-40, 1991.
- SANCHEZ-VIZCAINO, J.M. & ALVAREZ, M.C. Técnicas imunoenzimáticas em patologia animal e vegetal. *Instituto Nacional de Investigaciones Agrarias*. Madrid, 1981.
- VANNIER, P., VANNIER, P., TILLON, J.P. et. al. A seroepizootiological study of parvovirus in pig herds. *Zbl. Vet. Med. B*, v.31, n.1, p.36-45, 1984.
- VASUDEVACHARYA, J. BASAK, S., SRINIVAS, R.V. et al. The complete nucleotide sequence of an infectious clone of porcine parvovirus, strain NADL-2. *Virology*, v.178, p.611-616, 1990.
- WESTENBRINK, F. VELDHUIS, M.A., BRINKHOF, J.M.A. An enzyme-linked immunosorbent assay for detection of antibodies to porcine parvovirus. *Journal of Virological Methods*, v.23, p.169-178, 1989.
- WILSON, M.B., NAKANE, P.K. Conjugation of immunoglobulins with HRP by periodate oxidation. In: *Immunofluorescence and related and staining techniques*. KNAPP, W.; HOLUBAR, K., WICK, G. (ed) Elsevier. Amsterdam. p.215-232, 1978.
- WRIGHT, P.F. NILSSON, E., VANROOIJ, E.M.A. et al. Standardisation and validation of enzyme-linked immunosorbent assay techniques for the detection of antibody in infectious disease diagnosis. *Rev. Sci. Tech. Off. int. Epiz.*, v.12, n.2, p.435-450, 1993.
- YASUHARA, H., MATSUI, O., HIRAHARA, T. et al. Characterization of a parvovirus isolated from the diarrheic feces of a pig. *Jpn. J. Vet. Sci.*, v.51, n.2, p.337-344, 1989.

TABELA 1 - Títulos de H.I. e resultados do ELISA em absorvância, das amostras de soros suíno provenientes de granjas sem vacinação para parvovirose suína.

SORO	TÍTULO DE H.I.	ELISA
1.	< 8	0,0620
2.	< 8	0,0400
3.	< 8	0,0575
4.	< 8	0,0175
5.	< 8	0,0355
6.	< 8	0,0370
7.	< 8	0,0150
8.	< 8	0,0450
9.	< 8	0,0195
10.	< 8	0,0290
11.	< 8	0,0540
12.	< 8	0,0530
13.	< 8	0,0220
14.	< 8	0,0200
15.	< 8	0,0180
16.	< 8	0,0610
17.	< 8	0,0530
18.	< 8	0,0590
19.	< 8	0,0145
20.	< 8	0,0255
21.	< 8	0,0150
22.	< 8	0,0365
23.	< 8	0,0135
24.	< 8	0,0270
25.	< 8	0,0420
26.	< 8	0,0120
27.	< 8	0,0350
28.	< 8	0,0530
29.	< 8	0,0600
30.	< 8	0,0115
31.	< 8	0,0175
32.	< 8	0,0130
33.	< 8	0,0730
34.	< 8	0,0140
35.	< 8	0,0650
36.	< 8	0,0820
37.	< 8	0,0520
38.	< 8	0,0805

TABELA 1 - Títulos de H.I. resultados do ELISA em absorbância, das amostras de soros suíno provenientes de granjas sem vacinação para parvovirose suína (continuação).

SORO	TÍTULO DE H.I.	ELISA
39.	< 8	0,0670
40.	< 8	0,0950
41.	< 8	0,0770
42.	< 8	0,0365
43.	< 8	0,0690
44.	< 8	0,0740
45.	< 8	0,0730
46.	< 8	0,0660
47.	< 8	0,0850
48.	< 8	0,0665
49.	< 8	0,0785
50.	< 8	0,0660
51.	< 8	0,0530

Número de amostras: 51

Média: 0,0460

Desvio padrão: 0,0238

TABELA 2 - Títulos de H.I. e resultados do ELISA em absorvância, das amostras de soros suíno provenientes de granjas com vacinação para parvovirose suína.

SORO	TÍTULO DE H.I.	ELISA
1.	2048	0,1740
2.	4096	0,2040
3.	8192	0,2530
4.	8192	0,2265
5.	4096	0,2395
6.	512	0,1470
7.	8192	0,1845
8.	8192	0,2145
9.	8192	0,2340
10.	8192	0,2290
11.	8192	0,2515
12.	4096	0,2190
13.	2048	0,2120
14.	4096	0,2048
15.	4096	0,1630
16.	2048	0,2155
17.	2048	0,1525
18.	8192	0,1730
19.	4096	0,1420
20.	8192	0,2280
21.	128	0,1130
22.	4096	0,1770
23.	512	0,1878
24.	256	0,1450
25.	8192	0,2230
26.	64	0,1170
27.	8192	0,1560
28.	256	0,1945
29.	1024	0,2040
30.	1024	0,2600
31.	2048	0,2290
32.	2048	0,1540
33.	4096	0,2275
34.	2048	0,1960
35.	8192	0,2380
36.	4096	0,3030
37.	4096	0,2750
38.	64	0,1080
39.	512	0,1725

TABELA 2 - Títulos de H.I. e resultados do ELISA em absorbância, das amostras de soros suíno provenientes de granjas com vacinação para parvovirose suína (continuação).

SORO	TÍTULO DE HI	ELISA
40.	512	0,1725
41.	512	0,1700
42.	128	0,1260
43.	4096	0,2405
44.	128	0,1250
45.	256	0,1170
46.	128	0,1065
47.	128	0,0965
48.	4096	0,2255
49.	4096	0,2350
50.	256	0,1225
51.	128	0,0860
52.	2048	0,1925
53.	2048	0,2385

Número de amostras: 53

Média: 0,190

Desvio padrão: 0,0518

TABELA 3 - Resultados das 104 amostras de soros suíno testadas pelo HI e ELISA.

ELISA \ HI	POSITIVO	NEGATIVO
POSITIVO	52 (a)	01 (b)
NEGATIVO	01 (c)	50 (d)

- a) verdadeiro positivo
- b) falso-positivo
- c) falso-negativo
- d) verdadeiro negativo

Sensibilidade = $a/(a+c) = 98,1\%$

Especificidade = $d/(d+b) = 98,0\%$

TABELA 4 - Multiplicação da amostra de parvovírus suíno NADL-2 em cultivo primário de rins de suíno e avaliação das condições de metabolismo do meio de cultura (após 7 dias)

DILUIÇÃO	ECP*	TÍTULO	MEIO
10^{-1}	70-80%	1024	acidificado
10^{-2}	40-50%	512	acidificado
10^{-3}	discreto	< 128	acidificado
10^{-4}	discreto	< 128	acidificado
10^{-5}	discreto	< 128	acidificado

* Efeito citopático

TABELA 5 - Multiplicação da amostra de parvovírus suíno NADL-2 em cultivo de SK₆ e avaliação das condições de metabolismo do meio de cultura (após 8 dias).

DILUIÇÃO	ECP*	TÍTULO	MEIO
10 ⁻¹	80-90%	2048	acidificado
10 ⁻²	60-70%	1024	acidificado
10 ⁻³	discreto	< 128	acidificado
10 ⁻⁴	discreto	< 128	acidificado
10 ⁻⁵	discreto	< 128	acidificado

* Efeito citopático

TABELA 6 - Título hemaglutinante das amostras do sobrenadante, colchão e sedimentos das suspensões inoculadas com parvovírus suíno NADL-2 e dos controles celulares, após ultracentrifugação.

AMOSTRA	SUSPENSÃO VIRAL	SUSPENSÃO CONTROLE
Sobrenadante	2	< 8
Colchão	4	< 8
Sedimento	32.784	< 8

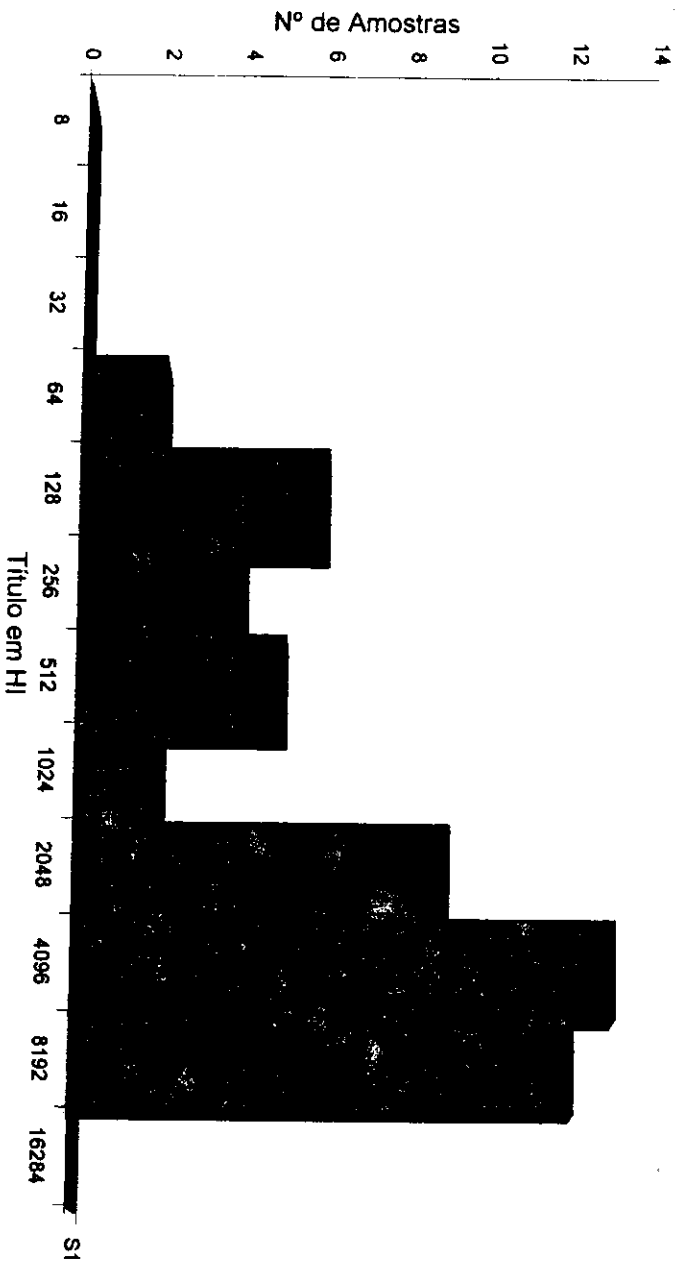


FIGURA 1 - Distribuição de frequência de títulos dos soros de granjas com vacinação para parvovirose suína pela prova de HI

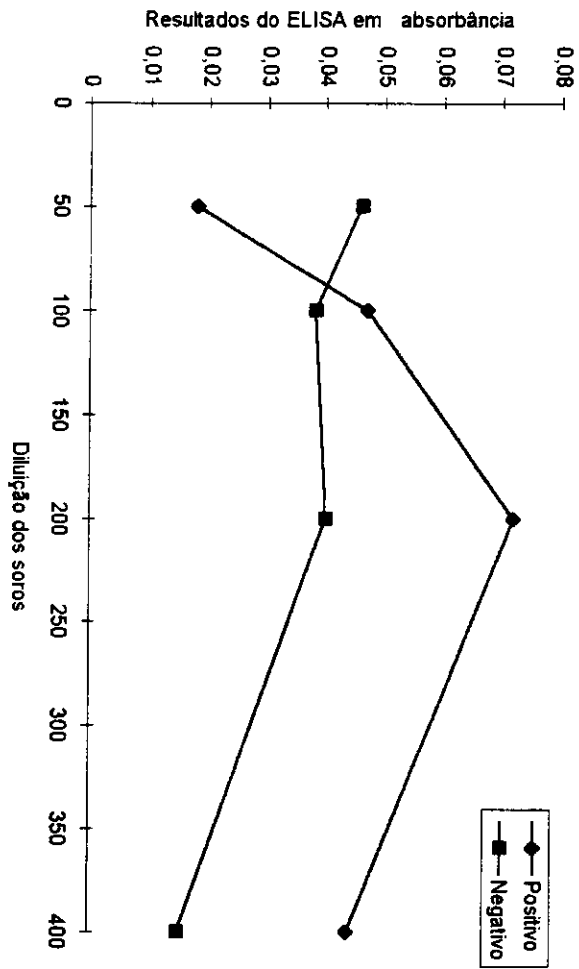


FIGURA 2 - Resultados do ELISA em absorbância, em relação às diluições dos soros positivo e negativo para parvovirus suíno com 75 ng de antígenos (conjugado 1:5000)

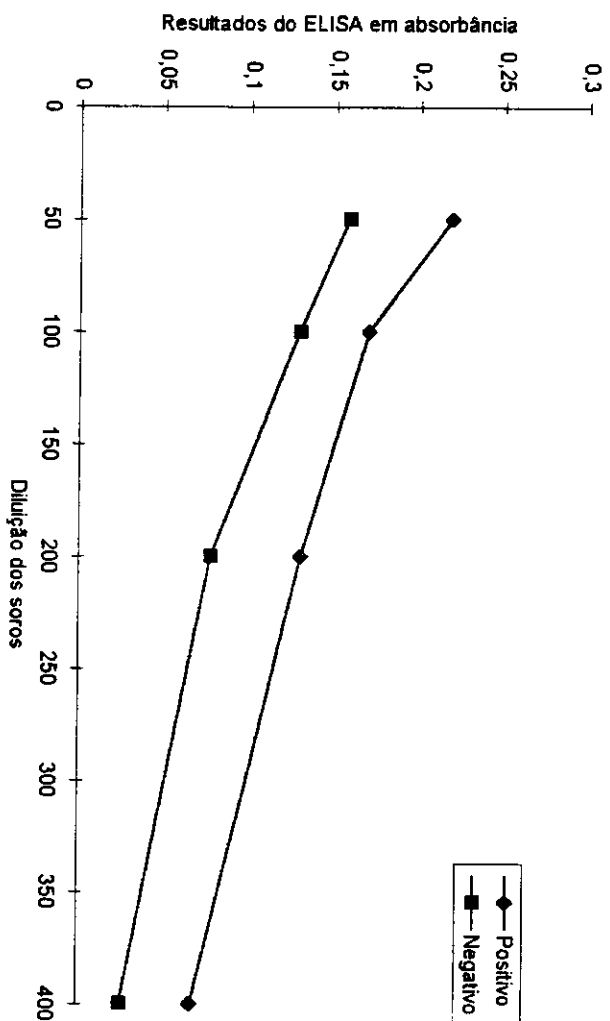


FIGURA 3 - Resultados do ELISA em absorbância, em relação às diluições dos soros positivo e negativo para parvovirus suino, com 150 ng de antígenos (conjugado 1:5000)

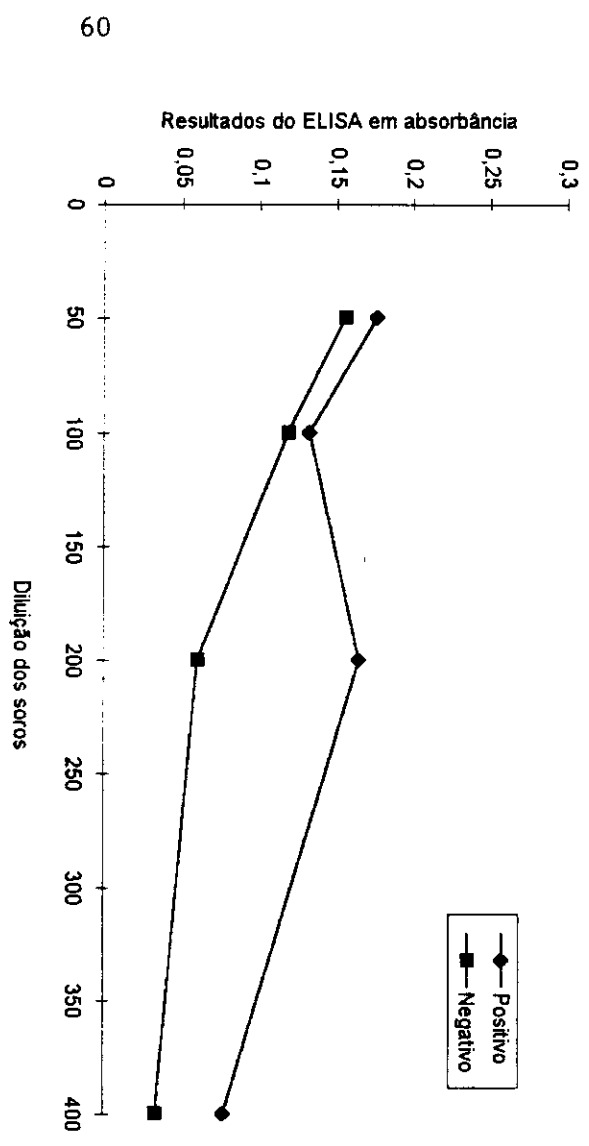


FIGURA 4 - Resultados do ELISA em absorvância, em relação às diluições dos soros positivo e negativo para parvovirus suíno, com 300 ng de antígenos (conjugado 1:5000)

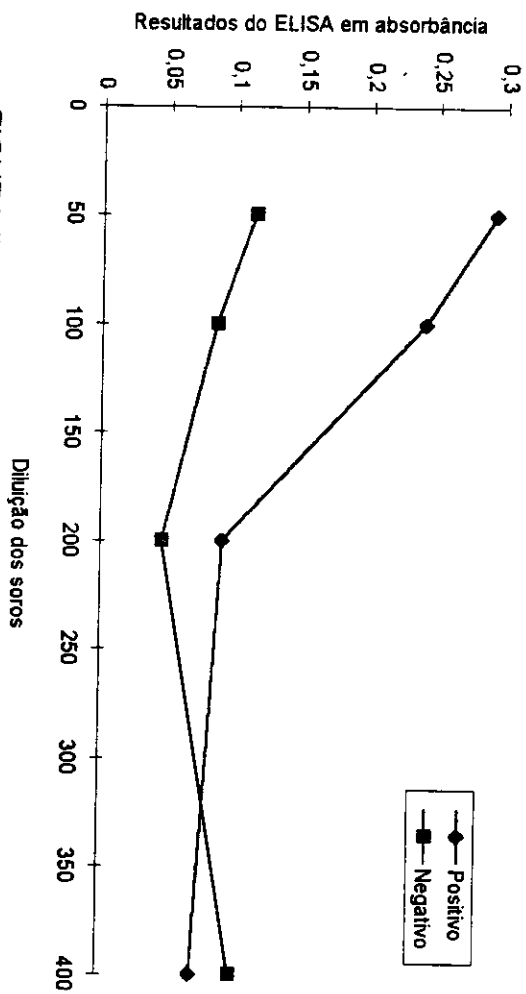


FIGURA 5 - Resultados do ELISA em absorbância, em relação às diluições dos soros positivo e negativo para parvovirus suíno, com 600 ng de antígenos (conjugado 1:5000)

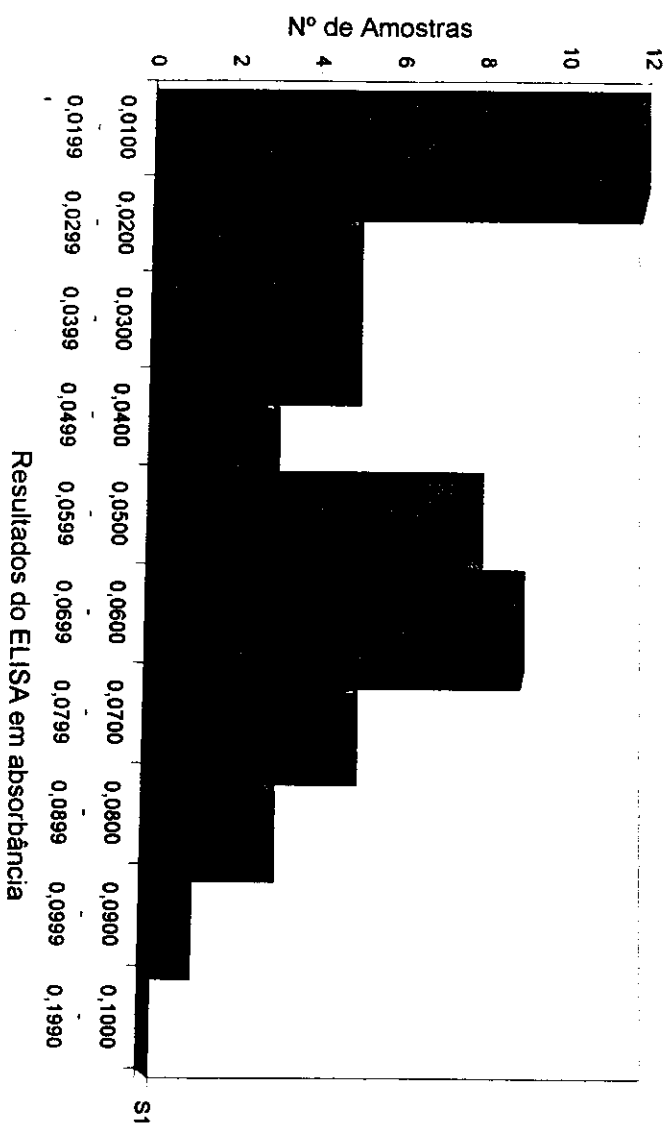


FIGURA 6 - Distribuição de frequência dos resultados de ELISA em absorvância dos soros negativos pela prova de HI

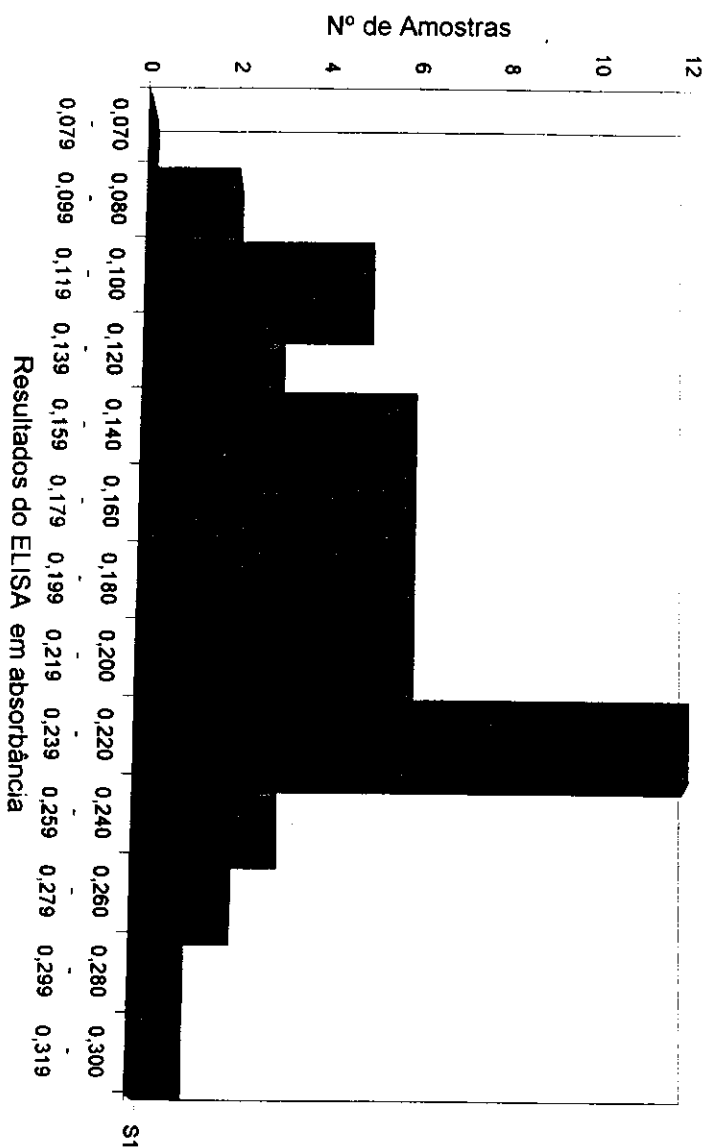


FIGURA 7 - Distribuição de frequência dos resultados do ELISA em absorvância dos soros positivos pela prova de HI

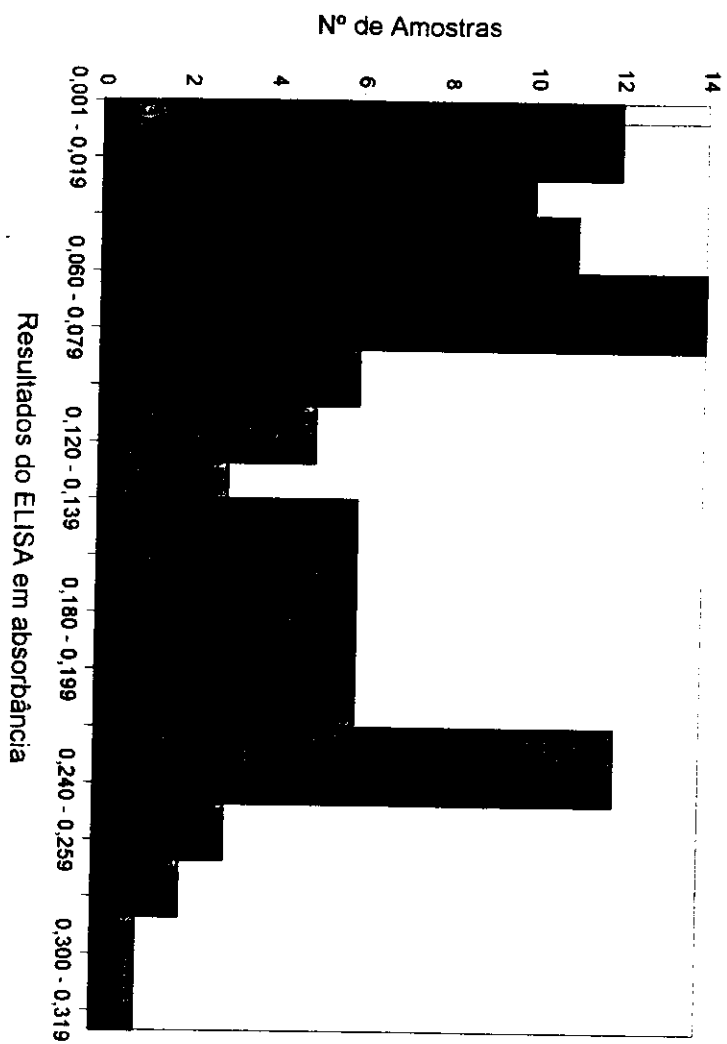


FIGURA 8 - Distribuição de frequência dos resultados do ELISA em absorbância dos soros negativos e positivos pela prova de HI

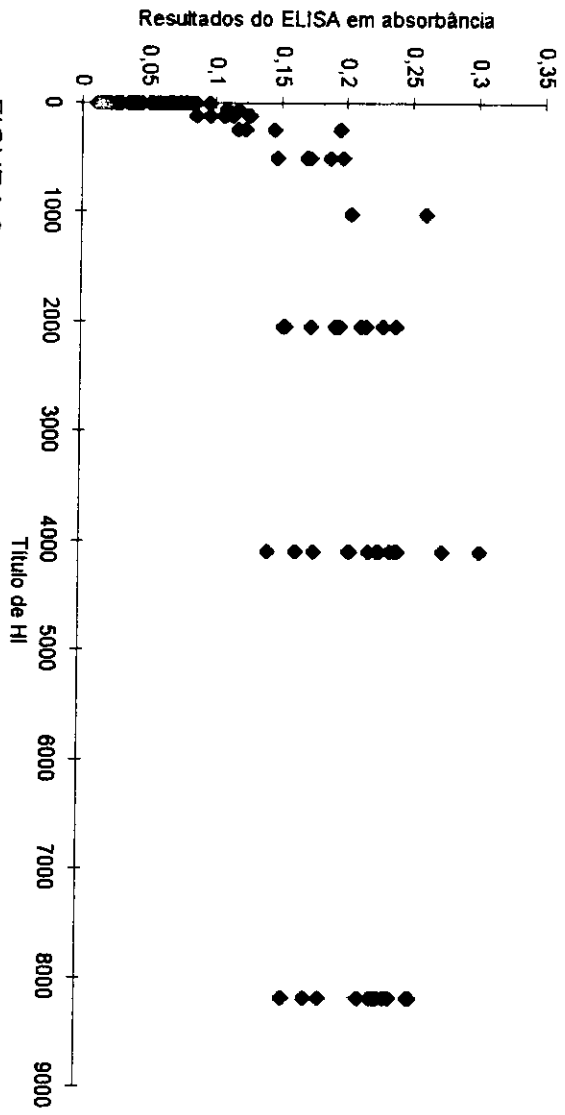


FIGURA 9 - Dispersão dos resultados do ELISA em absorbância, em relação ao título de HI

