

Universidade Federal de Minas Gerais
Conselho de Pós-Graduação
Escola de Veterinária

DESENVOLVIMENTO DE UM TESTE DE ELISA COM ANTICORPOS
MONOCLONAIS PARA O DIAGNÓSTICO DA ROTAVIROSE BOVINA

Fernando María Fernández

Belo Horizonte
Minas Gerais
1986

Fernando Maria Fernández

DESENVOLVIMENTO DE UM TESTE DE ELISA COM ANTICORPOS
MONOCLONAIS PARA O DIAGNÓSTICO DA ROTAVIROSE BOVINA

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

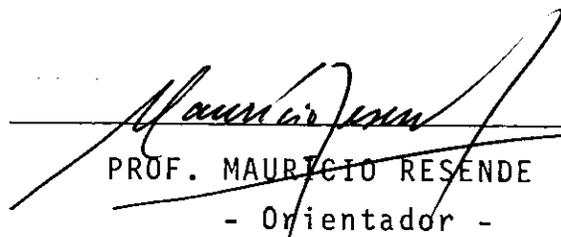
Área: Medicina Veterinária Preventiva.

Belo Horizonte
Minas Gerais
1986

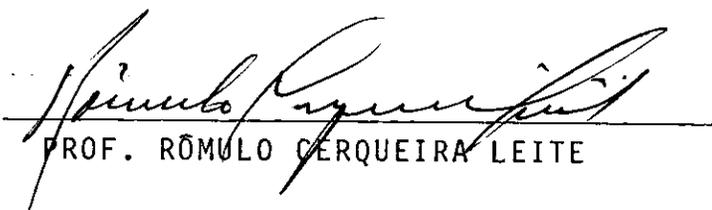
Fernandez, Fernando María, 1952-
F363d Desenvolvimento de um teste de ELISA com anticorpos
monoclonais para o diagnóstico da rotavirose bovina.
83p. ilustr.
Tese, Mestre em Medicina Veterinária.
1. Rotavirus bovino, ELISA. 2. ELISA. 3. Anticorpos
Monoclonais, Rotavirus. I. Título.

CDD - 636.208 960 75

Aprovada em: 19/12/86.


PROF. MAURICIO RESENDE
- Orientador -


PROF. JOSÉ SERGIO RESENDE


PROF. RÔMULO CERQUEIRA LEITE

Aos meus pais, a quem devo não pouco: primeiro a vida, depois os estudos para vivê-la com dignidade.

À minha esposa por sua compreensão e companhia.

À meu filho José Emílio "cocoliço" por todo...

Que esta tese contribua um pouco na procura de uma melhor sociedade para você.

Ao Dr. Alejandro Schudel por sua orientação, apoio e amizade.

À meu amigo e companheiro inseparável Manuel Borca.

À meu amigo Norberto Rodriguez e a sua família. A fraternidade e generosidade por vocês oferecida jamais esquecerei.

À Ligia por essa linda amizade e toda essa força transmitida, principalmente nos momentos mais difíceis.

AGRADECIMENTOS

A realização deste trabalho tornou-se possível devido a colaboração amigável de diversas pessoas que aqui deixaram um pouco de si e seus conhecimentos.

Ao Professor Maurício Resende pelo constante apoio, amizade, orientação e sobretudo, pelos brilhantes ensinamentos.

A meu colega e amigo Vicente Toledo por sua desinteressada ajuda e permanente apoio técnico.

As doutoras Estela Cornaglia e Maria Barrandeguy, o material doado por vocês facilitou a realização deste trabalho.

A meu amigo Carlos Chavaz por sua valiosa colaboração.

A meu colega e amigo Enrique Perez Gutierrez, você fez compreender melhor alguns aspectos deste trabalho, e o mais importante alguns aspectos da vida.

Aos funcionários e colegas do Laboratório de Virologia Comparada e Anticorpos Monoclonais: a Neuza por seu excelente desempenho e dedicação, a Marília, Roberto, Alice, Regina, Fátima, Amaurí, Abdusalan, a todos vocês pela amizade e companheirismo oferecido.

Aos Professores Carlos A.P. Tavares e Evaldo Nascimento pelas oportunas sugestões e as facilidades oferecidas pa-

ra dispor de seus laborat6rios.

Ao Professor Baeta por sua valiosa colabora76o.

A Ester pela efici6ncia demonstrada no fornecimen-
to de animais de biot6rio.

Ao Departamento de Microbiologia do Instituto de
Ci6ncias Biol6gicas da Universidade Federal de Minas Gerais.

As autoridades do Instituto Nacional de Tecnologia
Agropecu6ria (INTA), Argentina, pela oportunidade oferecida de
completar meus estudos de P6s-Gradua76o.

Ao Centro Panamericano de Zoonosis/Organizaci6n Pa-
namericana de la Salud, pela bolsa de estudos oferecida.

Aos Professores e ao pessoal administrativo da Es-
cola de Veterin6ria da Universidade Federal de Minas Gerais.

A todos os meus colegas e amigos Latino-Americanos
nas pessoas de Dimas, Araceli, Carlitos, Porf6rio, M6rio e
Gustavo. Em circunst6ncias adversas soubemos caminhar juntos
demonstrando que somos irm6os por origem e destino.

Ao Povo Brasileiro, nas pessoas de meus colegas de
turma, pela fraterna amizade oferecida durante minha estad6ia.

SIGLAS

ACF: Adjuvante Completo de Freund
Ac(s): Anticorpo (s)
ACm(s):Anticorpo(s) Monoclonal (is)
Ag(s): Antígeno(s)
DMSO: Dimetil Sulfoxido
DICT: Dose Infectante Cultivo de Tecido
DO: Densidade Ótica
ELISA: Enzime-Linked Immunosorbent Assay
EDTA: Ethylenediaminetetraacetic Acid
HAT: Hipoxantina Aminopterina Timidina
HT: Hipoxantina Timidina
Ig(s): Imunoglobulina(s)
PBS: Phosphate Buffer Salina
PBSC: PBS Caseína (sigma) 2%
RV: Rotavirus
RVB: RV Bovino
SS: Solução Salina
SST: SS Tween 20 (sigma)
TA: Temperatura Ambiente
TRIS: [Tris(hydroxymethyl)-aminomethane]

RESUMO

ACm que reagem com RVB foram produzidos com o objetivo de se preparar um teste de ELISA para o diagnóstico de rotavirose bovina. Dos nove clones secretores obtidos, um da classe IgM denominado ACm 2RVB, foi fortemente positivo (título 1×10^{-6}) sendo utilizado na diluição 1:50.000 como Ac detector (ELISA II) e Ac de captura (ELISA III e V), e 1:1.000 como Ac revelador (ELISA IV e V). Um teste de ELISA I policlonal convencional foi incluído neste trabalho com fins de comparação. Os cinco testes resultaram 100% específicos e 100% sensíveis quando foram analisadas 48 amostras de fezes de bezerros previamente diagnosticadas pelos testes de eletroforese em gel de poliacrilamida, ELISA-INTA policlonal e isolamento em cultura de células. As reações positivas resultaram mais intensas com a inclusão de ACm 2RVB, sendo estas mais marcadas no teste de ELISA V que utilizou exclusivamente ACm. A capacidade de reagir em forma cruzada com RV amostra SA-11, oferece a possibilidade de se utilizar este ACm no diagnóstico de RV humano.

APRESENTAÇÃO

É indispensável que o diagnóstico de laboratório das enfermidades infecciosas seja rápido e preciso, tanto para se eleger um tratamento mais adequado (quando for possível), como para acompanhar um programa de prevenção, controle ou erradicação em saúde animal. Esse fato adquire maior importância, naquelas doenças de etiologia complexa caracterizadas por apresentar um quadro clínico comum e uma alta morbidade, como é o caso das diarreias e das desordens respiratórias.

As técnicas clássicas de laboratório que normalmente são usadas, em virologia, para fins diagnósticos (isolamento em cultura de células, inoculação de animais susceptíveis, soroneutralização, etc), ainda que específicas e sensíveis, chegam a ser cansativas, difíceis e em alguns casos, impraticáveis.

Nos últimos anos tem-se pesquisado novos métodos rápidos para diagnóstico das infecções víricas, visando simplificá-los, sem entretanto, sacrificar a sua sensibilidade e especificidade. Um destes testes é o ELISA que tem demonstrado ser de grande valor na detecção de Ag e Ac. Esta técnica se baseia em princípios enzimáticos de um elevado grau de sensibilidade que permite a detecção de componentes víricos sem a fase prévia de isolamento (cultivo celular). Isto é particularmente importante em relação a RV devido à grande

dificuldade de adaptação ao crescimento em cultivos celulares.

Com o desenvolvimento das técnicas de DNA recombinante e de ACm tem sido possível produzir Ag e Ac para fins de diagnóstico com especificidade e homogenicidade conhecidas e em quantidades suficientes para permitir o aperfeiçoamento e a uniformização desejáveis nos testes de diagnóstico.

Estas novas técnicas vêm sendo aplicadas ao estudo dos vírus, entre eles os RV, e tem sido agora possível analisar o RNA vírico em gel de poli-acrilamida, produzir ACm e mapear os peptídeos víricos. Daí se obtêm evidências sobre a variabilidade de amostras em populações humanas e animais, criando-se assim, um novo campo de estudo conhecido como Epidemiologia Molecular.

	Página
3.6.1. Conjugado anti-Ig totais de camundongo..	24
3.6.2. Conjugado anti-Ig totais de bovino.....	24
3.6.3. Conjugação de ACm2RVB.....	24
3.7. Microgeldifusão em ágar.....	25
3.8. Tecnologia de hibridomas - fusão celular.....	26
3.8.1. Esquema de imunização de camundongos....	26
3.8.2. Obtenção das células de baço.....	26
3.8.3. Obtenção de macrófagos para camada ali- mentadora ("Feeder Layer").....	27
3.8.4. Cultivo de plasmocitomas.....	27
3.8.5. Fusão celular.....	28
3.8.6. Clonagem dos híbridos em meio líquido...	29
3.8.7. Expansão dos clones positivos.....	30
3.8.8. Produção de líquido ascítico.....	31
3.9. Reação imunoenzimática (ELISA).....	31
3.9.1. ELISA indireto na detecção de Ac anti-RVB	31
3.9.1.1. Sensibilização das placas e pa- dronização da concentração de Ag.....	31
3.9.1.2. Execução da técnica.....	32
3.9.1.3. Leitura das reações e interpre- tações dos resultados.....	33
3.9.1.4. Controles de conjugado e subs- trato.....	33
3.9.1.5. Controles positivo e negativo.	33
3.9.2. ELISA na detecção de RVB.....	33
3.9.2.1. ELISA I indireto duplo "sandwich" utilizando Ac policlonais.....	33
3.9.2.1.1. Sensibilização das placas.....	33
3.9.2.1.2. Execução da técnica.	34
3.9.2.2. ELISA II indireto duplo "sandwich" utilizando ACm2RVB como Ac detector	34

	Página
3.9.2.2.1. Sensibilização das placas.....	34
3.9.2.2.2. Execução da técnica	34
3.9.2.3. ELISA III indireto duplo "sand wich" utilizando ACm2RVB como Ac de captura.....	35
3.9.2.3.1. Sensibilização das placas.....	35
3.9.2.3.2. Execução da técnica	35
3.9.2.4. ELISA IV direto simples "sand- wich" utilizando ACm2RVB conju gado com peroxidase como Ac re velador.....	35
3.9.2.4.1. Sensibilização das placas.....	36
3.9.2.4.2. Execução da técnica	36
3.9.2.5. ELISA V direto simples "sand- wich" utilizando ACm2RVB como Ac de captura e simultaneamen te conjugado com peroxidase co mo Ac revelador.....	36
3.9.2.5.1. Sensibilização das placas.....	36
3.9.2.5.2. Execução da técnica	
3.9.2.6. Leitura das reações e interpre tação dos resultados.....	
3.9.2.7. Controle de conjugado e subs trato.....	37
4. RESULTADOS.....	38
4.1. Padronização do teste de ELISA indireto na de tecção de Ac anti-RVB.....	38
4.2. Produção de ACm.....	39
4.2.1. Caracterização isotópica dos ACm.....	39

	Página
4.2.2. Atividade imunológica dos ACm frente a RVB.....	40
4.3. ELISA no diagnóstico de RVB.....	40
4.3.1. ELISA I indireto duplo "sandwich" utilizando Ac policlonais.....	41
4.3.2. ELISA II indireto duplo "sandwich" utilizando ACm2RVB como Ac detector.....	41
4.3.2.1. Titulação de ACm2RVB como Ac detector.....	41
4.3.2.2. Análise das amostras de fezes de bezerros.....	41
4.3.3. ELISA III indireto duplo "sandwich" utilizando ACm2RVB como Ac de captura..	42
4.3.3.1. Titulação de ACm2RVB como Ac de captura.....	42
4.3.3.2. Análise das amostras de fezes de bezerros.....	42
4.3.4. ELISA IV simples "sandwich" utilizando ACm2RVB conjugado com peroxidase como Ac revelador.....	43
4.3.4.1. Titulação de ACm2RVB conjugado no teste de ELISA IV.....	43
4.3.4.2. Análise das amostras de fezes de bezerros.....	43
4.3.5. ELISA V direto simples "sandwich" utilizando ACm2RVB na captura e simultaneamente conjugado com peroxidase na revelação.....	44
4.3.5.1. Titulação de ACm2RVB conjugado com peroxidase no teste de ELISA V.....	44
4.3.5.2. Análise das amostras de fezes de bezerros.....	44
5. DISCUSSÃO.....	61

	Página
6. CONCLUSÕES.....	70
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	71

LISTA DE TABELAS

	Página
TABELA I - Genes e proteínas de RV amostra SA-11.,.	5
TABELA II - Classificação das amostras de fezes de <u>be</u> zerros após serem analisadas por três técnicas de referência (ELISA-INTA policlonal, isolamento em cultura de células e eletroforese do RNA vírico em gel de poliacrilamida).....	21
TABELA III - Características dos nove clones secretores de ACm.....	48
TABELA IV - Título dos ACm em sobrenadante de cultura e líquido ascítico determinado pelo teste de ELISA.....	49
TABELA V - Teste de ELISA I indireto duplo "sandwich" utilizando Ac policlonais no diagnóstico de RVB.....	50
TABELA VI - Teste de ELISA II indireto duplo "sandwich" utilizando ACmRVB como Ac detector no diagnóstico de RVB.....	52

	Página
TABELA VII - Teste de ELISA III indireto duplo "sandwich" utilizando ACm2RVB como Ac de captura, no diagnóstico de RVB.....	54
TABELA VIII - Teste de ELISA direto simples "sandwich" utilizando ACm2RVB conjugado com peroxidase como Ac revelador no diagnóstico de RVB.....	56
TABELA IX - Teste de ELISA V direto simples "sandwich" utilizando ACm2RVB como Ac de captura e simultaneamente ACm2RVB conjugado com peroxidase como Ac revelador, no diagnóstico de RVB.....	58
TABELA X - Classificação das 48 amostras de bezerros e as 2 amostras de referência (RVB-Lincoln e SA-11) baseado na intensidade de cor desenvolvida na reação nos cinco testes de ELISA empregados no diagnóstico de RVB...	59

LISTA DE FIGURA

	Página
FIGURA 1 - Estrutura topográfica de RVB.....	6

LISTA DE GRÁFICOS

	Página
GRÁFICO 1 - Determinação da concentração ótima de proteínas do RVB amostra Lincoln na fase sólida do teste de ELISA indireto para a detecção de Ac específicos.....	46
GRÁFICO 2 - Curva de titulação de ACm2RVB purificado como Ac detector no teste de ELISA II.....	51
GRÁFICO 3 - Curva de titulação de ACm2RVB purificado como Ac de captura no teste de ELISA III.....	54
GRÁFICO 4 - Curva de titulação de ACm2RVB conjugado com peroxidase como Ac revelador no teste de ELISA IV.....	55
GRÁFICO 5 - Curva de titulação de ACm2RVB conjugado com peroxidase como Ac revelador no teste de ELISA V.....	57
GRÁFICO 6 - Distribuição das percentagens de amostras positivas baseado na intensidade de cor desenvolvido na reação nos diferentes testes de ELISA.....	60

LISTA DE QUADRO

	Página
QUADRO 1 - Esquema de obtenção de clones produtores de ACm anti-RVB.....	47

1. INTRODUÇÃO

As diarréias constituem uma das principais patologias que afetam os bovinos, especialmente durante suas primeiras semanas de vida. Ocasionalmente ocasionam perdas econômicas significativas, devido a sua alta incidência e às altas taxas de morbidade e mortalidade (ROY, 1980), dependendo também do tipo de exploração pecuária (TZIPORI, 1981).

No Brasil, índices de mortalidade de 8,4% e 8,2% em bezerros de rebanhos de corte tem sido respectivamente assinalados por BARROS, 1968 e FIGUEIREDO, 1979. Em rebanhos leiteiros, o índice encontrado tem sido de 14,5%; 21,0% a 34,0%; 26,0% e 19,6% segundo MATTA, 1973; OLIVEIRA FILHO, 1973; CEPANZO, 1976 e GOMES & CARNEIRO, 1977. Se bem que o país não dispõe de informação específica sobre a participação das diarréias nessas altas taxas de mortalidade descritas, é de se supor que a semelhança de outras partes do mundo, as diarréias são uma das principais causas de mortalidade em bezerros (ROY, 1980).

Uma extensa lista de agentes infecciosos tem sido sugeridos como agentes etiológicos, principalmente vírus, bactérias e protozoários. Além disto, estão associados fatores predisponentes gerados pelo tipo de sistema de produção como manejo, stress, nutrição, estado imunológico e possivelmente fatores genéticos (TZIPORI, 1981).

É prática comum tentar um tratamento curativo utilizando antibióticos e sulfas, que além de elevar significativamente os insumos do processo produtivo nem sempre obtêm sucesso. Possivelmente este fato possa ser explicado pela grande diversidade de agentes não bacterianos envolvidos na etiologia.

Em bezerras, a maioria dos agentes esteropatogênicos produzem um quadro clínico comum, caracterizado por enterite aguda, de curto período de incubação, depressão, anorexia e diarreia com diferentes graus de desidratação. Os achados histopatológicos encontrados, são na maioria das vezes, atrofia das vilosidades intestinais e substituição dos enterócitos por células cuboidais imaturas. Nem as manifestações clínicas, nem os achados histopatológicos são elementos suficientes para se chegar a um diagnóstico específico. Ainda que a cor das fezes e a idade do animal afetado possam, com certa frequência, ser de algum valor, o diagnóstico específico do agente envolvido depende inteiramente do laboratório (TZIPORI, 1981).

Concluem-se destas observações que laboratórios com técnicas de diagnóstico eficientes são imprescindíveis para um conhecimento preciso do agente ou combinação de agentes infecciosos, responsáveis pela patologia. É necessário frisar que só o isolamento de um agente enteropatogênico nem sempre é suficiente (MC NULTY, 1983), devendo-se considerar os indicadores epidemiológicos e os sinais clínicos para um diagnóstico definitivo (TZIPORI, 1981).

Entre os agentes infecciosos da atualidade, os RV são considerados como um dos principais agentes de diarreias neonatais nas mais diferentes espécies animais, incluindo o homem (MC NULTY, 1983; FLEWETT & WOOD, 1978; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1979; ORGANIZACION MUNDIAL DE LA SALUD, 1981; CUKOR, G. & BLACKLOW, N.R., 1984 e SIMHON, A, 1985).

O RV murino foi o primeiro a ser identificado em 1958, causando um surto de diarreia epizootica em camundongos lactentes (KRAFT, 1958).

A primeira comprovação que os RV produzem diarreias em bezerros foi realizada por MEBUS et alii (1969), na Universidade de Nebraska, o qual conseguiu reproduzir diarreias severas em bezerros gnotobióticos privados de colostro, com filtrado de fezes livres de bactérias provenientes de bezerros que apresentavam naturalmente um quadro de diarreia. Por essa razão, no princípio, o vírus foi denominado "Nebraska Calf Diarrhea Virus".

No ano 1973 na Austrália, se detectou partículas víricas semelhantes a Reovirus, por microscopia eletrônica em biópsias duodenais de crianças com diarreia, denominando-lhes "reo-like vírus" e também "duovírus", por colonizar o duodeno e possuir um capsídeo duplo (BISHOP et alii, 1973).

Em 1979 estes vírus são definitivamente incluídos no gênero Rotavírus, na família Reoviridae. O nome de RV deriva-se do latim "rota" roda (CUKOR & BLACKLOW, 1984).

Criptograma: R/2: 11/12: S/S: V/0.

RVB é um integrante do gênero Rotavírus que, juntamente com os gêneros Reovírus e Orbivírus constituem a família Reoviridae (MOHANTY, 1981).

O RVB se distribui mundialmente, sendo dentro dos agentes etiológicos envolvidos, o maior responsável pela diarreia em bezerros, (OJEH, 1984).

Todos os RV possuem 11 segmentos de cadeia dupla de RNA que são envolvidas por duas cápsulas protéicas (capsídeo duplo). A infectividade está associada com o capsídeo externo. Por microscopia eletrônica, nos casos de infecção natural, são identificados nas fezes: a) virions de capsídeo duplo, denominados "completos" ou "lisos" com 70 a 72 nm de diâmetro e 1,36 g/ml de densidade e b) partículas víricas "rugosas" ou "incompletas" apresentando somente o capsídeo interno com 65 nm de diâmetro e 1,38 g/ml de densidade (MOHANTY, 1981; SIMHON, 1985).

Recentemente, com os trabalhos de SATO et alii (1981), tem sido possível a multiplicação dos RV, fundamentalmente os de origem humana em cultura de células. Este fato, a

companhado do desenvolvimento das novas técnicas de biologia molecular, permitiu aprofundar mais o grau de conhecimento dos aspectos moleculares deste grupo de vírus.

A amostra de RV SA-11 de origem primata não humano (macaco rhesus s.p.), tem sido a melhor estudada. Na TAB. I apresenta-se uma descrição dos diferentes componentes estruturais e funcionais da amostra de RV SA-11, segundo CUKOR & BLACKLOW (1984).

NOVO & ESPARZA (1981), estudaram a topografia e composição polipeptídica do RVB usando eletroforese em gel de poliacrilamida. Os autores descreveram seis polipeptídeos estruturais nos virions, três deles associados ao capsídeo interno (P102K, P91K, P45K) e três com o capsídeo externo (P84K, P37K, P34K) - FIG. 1. Destaca-se o polipeptídeo P45K, representando 60% da massa protéica total das partículas "completas" e 80% das partículas "simples".

Além da identidade morfológica, os RV mamíferos compartilham determinantes antigênicos situados no polipeptídeo VP6 (TAB. I). Neste polipeptídeo situam-se também os determinantes antigênicos que definem os sub-grupos (GREEMBER et alii, 1983b).

As diferenças interespecíficas e a heterogeneidade intraespecífica (sorotipos) são determinadas por Ags situados nos polipeptídeos do capsídeo externo, principalmente no VP7 (TAB. I), sendo também os responsáveis pela indução dos Acs neutralizantes (KILLEN & DIMMOCK, 1982; GREEMBERG et alii, 1983b).

A replicação dos RV realiza-se no citoplasma da célula infectada (HOLMES et alii, 1975). Durante o processo de multiplicação viral, todos os organelos citoplasmáticos incluindo o núcleo são destruídos (CARPIO et alii, 1981).

O tecido atingido é o epitélio da zona apical das vilosidades do intestino delgado. Nos bezerros infectados, as células cilíndricas nas quais se detecta a replicação viral por imunofluorescência são destruídas em 5 a 6 horas pós-infecção e gradualmente substituídas por células cubóides não

TABELA I - Genes e proteínas de RVB amostra SA-11

Segmento de RNA	PM de RNA x 10 ⁶	Migração das proteínas	PM das proteínas (Kda)	Localização no vírion	Associação funcional
1	2.05	VP1	125	C.I.	
2	1.68	VP2	94	C.I.	
3	1.60				
4	1.60	VP3	88	C.E.	Hemoaglutinação, <u>neu</u> tralização menor
5	0.98	NS53	53		
6	0.81	VP6	41	C.I.	Ag comum de grupo e sub-grupo
7	0.5	NS34	34		
8	0,5	NS35	35		
9	0.5	VP7	37	C.E.	Ag sorotipo <u>específi</u> co, neutralização maior
10	0.3	NS29	29	Não <u>estrutu</u> ral ou C.I.	
11	0.2	VP9	26	C.E.?	

VP: proteína vírica

NS: proteína não estrutural

CI: capsídeo interno

CE: capsídeo externo

Fonte: CUKOR & BLACKLOW (1984).

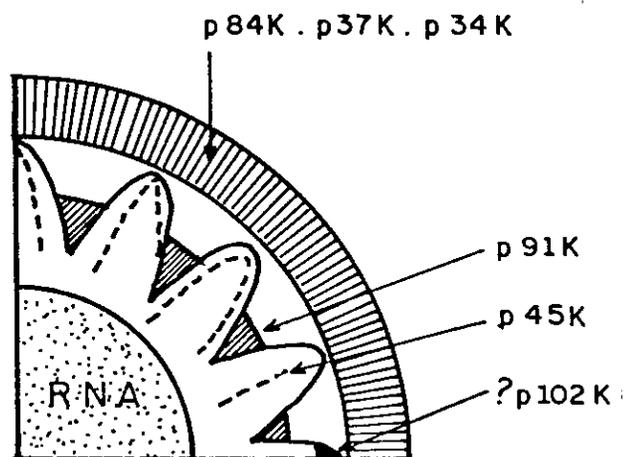


FIGURA 1 - ESTRUCTURA TOPOGRÁFICA DE RVB
FONTE: NOVO & ESPARZA (1981)

fluorescentes. Este fato determina que o epitélio colunar se transforme em escamoso (MEBUS et alii, 1971).

A regeneração do epitélio começa 5 a 7 dias após o início da diarreia. Dez a 15 dias depois de terminada a doença, o aspecto do epitélio intestinal é quase normal (MEBUS & NEWMAN, 1977).

A doença em bezerros caracteriza-se por um curto período de incubação que vai de 15 horas a dois ou três dias, sendo que os sintomas principais são: depressão, anorexia e diarreia, o que pode resultar em desidratação (MC NULTY, 1978; TZIPORI, 1981).

As células descamadas, junto a uma maior concentração de lactose na luz intestinal, oferecem um ambiente ideal para o desenvolvimento de infecções bacterianas secundárias, podendo aumentar os índices de mortalidade (MC NULTY, 1978).

A doença apresenta-se principalmente no inverno, atingindo os bezerros nas primeiras semanas de vida, sendo a morbidade elevada e a mortalidade reduzida embora, em surtos epizooticos, o índice de mortalidade possa chegar aos 90% (MC NULTY, 1978).

Os animais adultos infectados raramente apresentam a doença, podendo eliminar vírus nas fezes contínua ou esporadicamente. Esta característica epizootiológica, somada a elevada concentração do vírus nas fezes, sua resistência as mudanças de p.H., temperatura até 60°C e desinfectantes comumente utilizados, determina a prolongada permanência do vírus nos meios contaminados, favorecendo a infecção dos animais suscetíveis (WOODE, 1978; MC NULTY, 1983).

É interessante destacar a possibilidade de infecções cruzadas com RV entre diferentes espécies (PEREIRA et alii, 1983; BRIDGER et alii, 1986), podendo ser considerada a rotavirose como uma zoonose emergente.

Desde que se demonstrou que os RV eram causa importante de diarreia, os esforços foram principalmente dirigidos para se adaptar, desenvolver e aperfeiçoar diferentes técnicas de diagnóstico, visando ganhar em simplicidade e rapidez, como uma condição indispensável no controle desta infecção.

O diagnóstico das rotavírus baseia-se na detecção do vírus, Acs virais ou outros componentes víricos. Como informação adicional pode-se quantificar os Acs em soro, analisando amostras obtidas durante a fase aguda da doença e o período de convalescência. A presença de IgM específica confirma infecções recentes, quando não se dispõe de amostras extraídas durante a fase aguda (ORGANIZACION MUNDIAL DE LA SALUD, 1981).

Embora o isolamento do vírus em cultura de células seja um método de diagnóstico eficiente em algumas doenças virais, este é discutido para os vírus gastrointestinais (RED DE COOPERACION DE LABORATORIOS VETERINARIOS DE DIAGNOSTICO, 1985). Além de ser uma técnica laboriosa, pouco sensível e de custo elevado, os RV apresentam dificuldades para crescer "in vitro". Este problema tem sido resolvido em parte com a descoberta de que a tripsina reforça a infecção por RV (BABIUK et alii, 1977). Apesar dessas limitações, o isolamento de RV em cultura de células e a posterior revelação por imunofluorescência direta ou indireta, é um dos métodos indicados no diagnóstico desta infecção (ZORATTI, 1979).

A microscopia eletrônica tem sido inicialmente usada no estudo e diagnóstico dos RV, sendo considerado o método de referência para comparar as demais técnicas (CUKOR & BLACKLOW, 1984; SIMHON, 1985). A morfologia característica das partículas de RV eliminadas nas fezes dos animais infectados em altas concentrações, são facilmente reconhecidas por microscopia eletrônica empregando a técnica de coloração negativa (CUKOR & BLACKLOW, 1984). Para conseguir visualizar RV por esta técnica é necessário dispor de amostras contendo uma concentração mínima de 10^6 partículas virais por grama de fezes (SIMHON, 1979). Amostras com quantidades menores de vírus devem ser tratadas previamente por ultracentrifugação ou ser incubadas com imunossoros específicos, obtendo-se preparados mais concentrados (FLEWETT et alii, 1973). Neste último procedimento, denominado imunomicroscopia eletrônica, a incorporação de soros conhecidos, permite identificar os diferentes sorotipos de RV (FERNELIUS et alii, 1972).

Embora a microscopia eletrônica seja considerada um método simples e direto, sua aplicação está limitada, uma vez que só permite processar um número reduzido de amostras, além de ser necessário dispor de um equipamento altamente complexo (ORGANIZACION MUNDIAL DE LA SALUD, 1981).

A fixação de complemento tem sido aplicada com algumas modificações no diagnóstico das rotaviroses (KAPIKIAN, 1975), embora sua sensibilidade seja comparada com a microscopia eletrônica, a atividade anticomplementar presente em algumas amostras de fezes restringe sua aplicação (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1979).

A demonstração de que os RV aglutinam eritrócitos humanos do tipo O (SPENCE, 1976) sugeriu a possibilidade de incluir a hemoaglutinação direta como método de diagnóstico. O principal problema que apresenta esta técnica é de que nem todas as amostras de RV tem hemoaglutininas em sua superfície (ZORATTI, 1979).

Diferentes técnicas baseadas na aglutinação indireta têm sido desenvolvidas e aplicadas no diagnóstico de RV, são elas: imunoaderência hemoaglutinação (KAPIKIAN et alii, 1981), hemoaglutinação inversa passiva (ORGANIZACION MUNDIAL DE LA SALUD, 1981), absorção de eritrócitos na fase sólida (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1979), látex aglutinação (HAIKALA et alii, 1983), coaglutinação de stafilococos (SKAUG et alii, 1983). Estes métodos apresentaram uma sensibilidade similar à microscopia eletrônica e imunofluorescência (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1979). A absorção inespecífica desses preparados, consequência da alta contaminação das amostras e a sensibilização contínua de eritrócitos frescos, são as principais desvantagens apresentadas por estes métodos (ORGANIZACION MUNDIAL DE LA SALUD, 1981).

A imunoeletrosmoforese tem sido incluída como uma técnica alternativa no diagnóstico desta infecção (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1979; IMMUNOELEKTROSMOPHORESIS, 1981; ORGANIZACION MUNDIAL DE LA SALUD, 1981), embora seja um teste simples e rápido, que permite processar um grande número de amostras,

caracteriza-se por apresentar relativamente, uma baixa sensibilidade (ORGANIZACION MUNDIAL DE LA SALUD, 1981).

Com o desenvolvimento da biologia molecular, novas técnicas estão sendo adaptadas ao diagnóstico de RV. A eletroforese do RNA vírico, extraído diretamente das fezes infectadas, em gel de poliacrilamida possibilita a identificação, caracterização genômica e comparação de isolamentos individuais constituindo-se em uma técnica valiosa para se utilizar no diagnóstico, estudos moleculares e epidemiológicos das rotavírus (HERRING et alii, 1982; SIMMONS, 1985). Além disso, uma maior especificidade na identificação do RNA de RV está sendo obtida com a técnica de hibridização "in vitro" de cadeias simples marcadas de RNA (obtidas "in vitro" por transcrição de partículas de RV) com RNA desnaturado por aquecimento, extraído a partir de fezes infectadas e imobilizadas em membranas de nitrocelulose (FLORES et alii, 1983; DIMITROV et alii, 1985). Embora estas sejam técnicas de uma grande sensibilidade e especificidade, a necessidade de equipamentos específicos limitam sua utilização no diagnóstico de rotina (RED DE COLABORACION DE LABORATORIOS VETERINARIOS DE DIAGNOSTICO, 1985).

A imunofluorescência tem sido amplamente utilizada no diagnóstico das rotavíruses, permitindo detectar RV em cortes histológicos de intestino delgado (DAVISON et alii, 1975b) esfregaços de fezes (YOLKEN et alii, 1977; MC NULTY, 1978; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1979), ou cultura de células infectadas com preparados de fezes (MC NULTY, 1978; RED DE COLABORACION DE LABORATORIOS VETERINARIOS DE DIAGNOSTICO, 1985). Caracteriza-se esta técnica por apresentar uma sensibilidade similar à microscopia eletrônica (MC NULTY, 1978). A necessidade de possuir um microscópio de fluorescência (de elevado custo) além de ser um método relativamente trabalhoso e sujeito a certa subjetividade, destacam-se como as principais desvantagens da técnica (ORGANIZACION MUNDIAL DE LA SALUD, 1981).

Embora todos os métodos anteriormente mencionados possam ser utilizados no diagnóstico das rotavíruses, atualmente têm sido quase totalmente substituídas por métodos de

imunoensaio (SIMHON, 1985; ORGANIZACION MUNDIAL DE LA SALUD, 1981). A presença de pequenas quantidades de Ag ou Ac, não de tectados pelas técnicas convencionais, podem ser obtidos quando um dos reagentes imunológicos mencionados é ligado a marcadores de alta sensibilidade, os isótopos no caso do radioimunoensaio (RIA) e as enzimas no teste de imunoabsorvância (ELISA); (VOLLER et alii, 1980). Além de sua elevada sensibilidade, baseada no fato de que tais marcadores podem ser detectados ainda em concentrações tão baixas como 1×10^{-18} moles, os métodos de imunoensaio permitem processar rapidamente e simultaneamente um grande número de amostras, sendo ainda possível sua realização em forma automática (ISHIKAWA & KATO, 1978 e PESCE et alii, 1978).

A necessidade de se dispor de equipamentos especiais, caros, reativos instáveis (pequena meia vida), que oferecem riscos biológicos, e sua manipulação estar legalmente regulamentada, limita a aplicação do radioimunoensaio no diagnóstico de rotina (VOLLER et alii, 1980; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1979; ORGANIZACION MUNDIAL DE LA SALUD, 1981).

Por estas razões, na atualidade, o teste de ELISA é considerado a prova de escolha para se realizar o diagnóstico de RV (ORGANIZACION MUNDIAL DE LA SALUD, 1981), destacando-se como suas principais vantagens, a estabilidade dos reagentes; os resultados podem ser lidos visualmente ou com um espectrofotômetro; baixo custo; simples elaboração; não sendo necessário dispor de pessoal altamente especializado, nem tecnologia complicada permitindo sua realização em laboratórios de escassa infraestrutura (VOLLER et alii, 1980).

Após a aplicação do ELISA para quantificar imunoglobulinas G humanas por ENGVALL & PERLMANN em 1971, muitos pesquisadores tem trabalhado no desenvolvimento desta técnica para o diagnóstico imunológico em grande número de doenças humanas e animais.

VOLLER et alii (1974), aplicaram pela primeira vez o teste de ELISA no diagnóstico de uma doença infecciosa, detectando Acs contra malária, adaptando ELISA ao sistema de mi

croplacas.

Essa técnica foi primeiro utilizada na detecção de RV e os Acs dirigidos contra ele por SCHERRER & BERNARD (1977). No mesmo ano ELLENS & LEEVW (1977a e b); YOLKEN et alii (1977 a e b); AMATO et alii (1977); publicam mais informações sobre essa matéria.

Nos últimos anos, o teste de ELISA tem sido aperfeiçoado e padronizado, convertendo-se no teste de preferência para o diagnóstico de RV em diferentes espécies animais (YOLKEN et alii, 1980; ELLENS et alii, 1978; SIMHON et alii, 1979; GRAUBALLE et alii, 1981). Além do diagnóstico, o teste de ELISA é aplicado com êxito em estudos sorológicos (THOULESS et alii, 1982); epidemiológicos (WHITE et alii, 1984; LAMBERT et alii, 1984; LAZDINS et alii, 1985) e moleculares (COULSON et alii, 1985), nesta doença.

No método de ELISA mais comumente empregado na detecção de RV utiliza-se um revestimento de Ac sobre uma fase sólida, o "Ac de captura", para pescar o Ag. Identifica-se o Ag através de um Ac específico conjugado com uma enzima (método direto "simple sandwich") ou, alternativamente, com um soro específico detector e em seguida com um conjugado anti-antisoro específico (método indireto duplo "sandwich"). Em ambos métodos, o produto da reação resultante do desdobramento enzimático, a cor, é avaliada pela simples interpretação visual ou quantificada num espectrofotômetro (ORGANIZACION MUNDIAL DE LA SALUD, 1981; KURSTAK, 1985).

Recentemente diferentes autores têm feito algumas observações referentes à utilização dos Ac policlonais no teste de ELISA.

BRESCHKIN et alii (1981), observaram que uma das desvantagens potenciais do ELISA é quando se utilizam soros convencionais preparados frente a RV como fonte de Acs de "captura". Com este tipo de Acs, podem não ser detectados com eficiência todas as amostras de RV.

Um soro policlonal contém Acs altamente heterogêneos, com diferentes variações de especificidade, enquanto

que um ACm reconhece um único epitopo com uma única afinidade. Um ACm é um reagente mais específico e sensível (KNISLEY et alii, 1986).

Baseado nestas observações o objetivo deste trabalho foi produzir e selecionar um ACm com alta reatividade cruzada entre amostras de RVB que possa ser usado como Ac de captura, detector e/ou revelador no teste de ELISA no diagnóstico das rotavirose^s bovinas.

2. REVISÃO DA LITERATURA

Desde a primeira comunicação realizada por KÖLLER & MILSTEIN (1975), sobre a produção de ACm, estes reagentes obtidos através da técnica de hibridomas vêm sendo amplamente utilizados no estudo das doenças virais, entre elas, as rotaviruses.

Em 1981, foram obtidos oito clones produtores de ACm após a imunização de camundongos com três amostras de RV: WA (humana), SA-11 (primata não humano) e NIC (bovina). Destes clones, seis davam reações cruzadas, sendo os dois restantes específicos, um para WA e outro para NIC (BRESCHKIN et alii, 1981).

Em 1982, utilizando-se como imunógeno a amostra WA de RV, foi obtido um ACm de tipo IgG, dirigido contra o maior polipeptídeo do capsídeo interno (p42K), o qual possuía a característica de reagir cruzadamente contra outros RV de mamíferos mas não com os aviários (GARY et alii, 1982).

ROSETO et alii (1983) trabalhando com a amostra Thiversal de RVB, produziram e caracterizaram cinco clones de hibridomas produtores de ACm. Destes, três eram dirigidos contra o maior polipeptídeo estrutural do vírion (p39/42K) e imunoprecipitavam cruzadamente o maior polipeptídeo do RV humano e do RV de macaco. Um quarto ACm possuía a capacidade de reconhecer somente o p89K, que é um polipeptídeo estrutural do capsídeo externo. Um quinto ACm resultou positivo por imunofluorescência mas não mostrou atividade por imunoprecipitação. Nenhum deles

mostrou atividade neutralizante.

GREENBERG et alii (1983a), analisaram os ACm dirigidos contra a proteína estrutural do capsídeo interno (p42K). Estes ACm foram postos a reagir com RV de origem humana, bovina, primata não humana, suína, eqüina, murina, canina, felina e aviária. Oito deles reagiram com o Ag comum de mamíferos. Dois ACm reconheceram Ag sub-grupo específico de uma maneira mais eficiente do que a de um Ac policlonal.

Tendo como objetivo a produção de ACm soroneutralizante frente as amostras SA-11, NIC e WA de RV, SONZA et alii (1983), produziram 27 clones. Desees, nove tinham a capacidade de neutralizar a amostra homóloga SA-11. Os autores observaram ainda que, em alguns casos, existia uma estreita correlação entre a atividade neutralizante e a função inibidora de hemoaglutinação. Baseando-se nisso, puderam concluir que estas duas funções são reguladas por dois epitopos diferentes localizados bem próximos entre si na superfície do capsídeo externo do vírion.

De camundongos imunizados com RV do macaco rhesus (*Macacca sp*), 39 clones foram selecionados dos quais 36 imuno precipitaram com o polipeptídeo p82K do capsídeo externo. Além disto alguns deles possuíam capacidade soroneutralizante específica somente frente ao vírus homólogo (GREENBERG et alii, 1983 b).

BEARDS et alii (1984), reportaram que um ACm foi mais eficiente na "captura" de RV quando foi comparado com três soros policlonais anti-RV preparados em cabra, cobaio e coelho, respectivamente, após terem sido analisados no teste de ELISA indireto duplo "sandwich". Resultados similares foram encontrados quando esses mesmos reagentes foram utilizados como Ac detector. A utilização simultânea de um ACm na "captura" e como conjugado na revelação no teste de ELISA direto simples "sandwich" mostrou ser menos eficiente que os métodos indiretos.

WHITE et alii (1984), utilizaram dois ACm como Ac detectores no teste de ELISA indireto duplo, "sandwich" para classificar 252 isolamentos de crianças com diarréia por RV,

249 (99%) isolamentos foram identificados desta maneira. Comparativamente, os mesmos autores empregaram um Ac policlonal como Ac detector e conseguiram classificar apenas 35 dessas amostras. Por imunoaderência-hemoaglutinação foram classificadas 37% e pela análise eletroforética do RNA vírico, 80% desses isolamentos.

SONZA et alii (1984), obtiveram 18 ACm a partir de uma fusão com linfócitos de camundongos imunizados com as amostras SA-11, NIC e WA de RV. Cinco desses ACm foram obtidos imunizando com NIC e WA mas reconheciam p42K dessas duas amostras e ainda SA-11. Por outro lado, os ACm obtidos com amostra SA-11 identificavam dois grupos de epitopos localizados em p34K apenas da amostra homóloga. Um grupo desses ACm se relacionava com atividade neutralizante, outro com inibição da hemoaglutinação e um terceiro com ambas atividades.

LAMBERT et alii, 1984; trabalhando com amostras de RV denominadas: RIT 4237 (origem bovina), 82.561 e 81.2162 (ambas de origem humana), obtiveram 41 ACm derivados de cinco fusões celulares detectados pelo teste de ELISA indireto. Dois deles mostraram atividade neutralizante e doze reagiam no teste de fixação do complemento. Dois ACm, MH2 (específico de sub-grupo I) e MH25 (específico de sub-grupo II), foram utilizados no teste de ELISA indireto duplo "sandwich" para realizar um estudo epidemiológico sobre um total de 74 amostras, sendo possível classificar 96% das amostras.

SABARA et alii (1985), descreveram pela primeira vez a obtenção de um ACm com capacidade neutralizante para uma amostra de RVB (amostra 486). Estes ACm reconheciam epitopos localizados no polipeptídeo p38K do capsídeo externo.

Onze ACm com capacidade neutralizante foram produzidos utilizando-se como imunógeno três sorotipos diferentes de RV humano, S2 (sub-grupo I, sorotipo 2), Y0 (sub-grupo II, sorotipo 3) e KU (sub-grupo II, sorotipo 1). Estes ACm foram analisados em testes de neutralização frente a dez amostras de origem humana e dois de origem animal (SA-11 de macaco e Lincoln de bovino). Sete desses ACm reagiram com todas as amostras in

cluídas dentro de um único sorotipo, dois reconheceram várias amostras de diferentes sorotipos humanos, o que não ocorreu com aquelas de origem animal, e as duas restantes só neutralizaram uma única amostra (TANIGUCHI et alii, 1985).

COULSON et alii (1985), obtiveram, a partir de camundongos imunizados com amostra RV-3 (humana), três clones secretores de ACm com atividade neutralizante. Dois deles reagem com amostras víricas pertencentes ao sorotipo 3, e outro reconhecia apenas a amostra homóloga.

CRANAGE et alii (1985), descreveram uma prova de hemaglutinação inversa passiva utilizando hemácia sensibilizada com um ACm grupo específico dirigido contra VP6. Este teste mostrou-se tão eficaz quanto o ELISA policlonal.

Dois ACm, um específico para RV sorotipo 1 e outro específico para RV sorotipo 3, mostraram-se eficientes, quando foram utilizados como Ac de captura no teste de ELISA indireto duplo "sandwich", permitindo a realização do diagnóstico e também a identificação sorológica diretamente de fezes obtidas de indivíduos infectados (SHAW et alii, 1985).

HERRMANN et alii (1985), compararam a eficiência no diagnóstico de RV de um teste de ELISA indireto duplo "sandwich" policlonal comercial com um ELISA indireto duplo "sandwich" no qual utilizou-se um ACm na etapa de detecção, sendo analisadas um total de 141 amostras previamente identificadas por microscopia eletrônica. Os autores concluíram que o ELISA monoclonal mostrou-se mais sensível e específico.

Um grupo de ACm foram utilizados na seleção e estudos antigênicos de amostras mutantes de RV SA-11 resistentes à neutralização. Os autores identificaram uma amostra altamente resistente à neutralização por soro hiperimune, caracterizando uma glicoproteína, no capsídeo externo, classificada como sítio antigênico dominante, responsável pela neutralização (LAZDINS et alii, 1985).

Utilizando a microscopia eletrônica como método de referência, 100 amostras de crianças com diarreia foram analisadas, detectando-se RV em 44% delas. Baseados nestes resulta

dos os autores estudaram comparativamente outros quatro testes, um ELISA indireto duplo "sandwich" monoclonal, dois ELISA policlonais e uma prova de látex aglutinação, com o objetivo de determinar o grau de eficiência destes no diagnóstico das rotavirose. O ELISA monoclonal mostrou-se significativamente mais sensível na identificação das amostras positivas (KNISLEY et alii, 1986).

Duas amostras de RV C11 e ALA isoladas de coelhos foram classificadas dentro do sub-grupo I utilizando ACm na detecção no teste de ELISA indireto duplo "sandwich" (THOULESS et alii, 1986).

Um total de 176 amostras de fezes humanas foram examinadas por quatro técnicas de diagnóstico de RV, um ELISA indireto duplo "sandwich" monoclonal (considerado o método de referência neste trabalho), um ELISA indireto duplo "sandwich" policlonal comercial I, uma modificação deste denominado ELISA indireto duplo "sandwich" policlonal II e um teste comercial de látex aglutinação. Os autores concluíram que o ELISA policlonal II apresentou sensibilidade semelhante ao ELISA monoclonal, e o latex aglutinação tão específico como este último (DOERN et alii, 1986).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Vírus

3.1.1. RVB amostra Lincoln purificada*

RVB amostra Lincoln foi multiplicado em cultura primária de células de rim fetal bovino em presença de 2ug /ml de tripsina (Pharmacia) em meio Hanks (sigma). O sobrenadante obtido, a partir das células infectadas após dois ciclos de congelamento e descongelamento, foi clarificado por centrifugação a 5.000 rpm durante 20 minutos. A suspensão vírica (10^5 DICT₅₀/ml) foi misturada com polietilenoglicol (Sima 8.000) em uma concentração final de 7,2%. Após 12 horas de repouso a 4°C. Centrifugou-se a 6.000 rpm durante 45 minutos, o sedimento ressuspense em meio Hanks foi novamente clarificado por centrifugação a 6.000 rpm durante 20 minutos. O sobrenadante foi concentrado através de um colchão de sacarose (Merck) 45% p/v por centrifugação a 24.000 rpm em rotor SW 27 durante 140 minutos. O sedimento ressuspense em meio Hanks foi centrifugado em um gradiente de cloreto de césio (Sigma Grade 1) (0,52 - 0,26 g/cc) a 20.000 rpm em rotor SW 27.1 a 5°C durante 22 ho-

* Material cedido pela Dr^a Estela Cornaglia, Laboratório de Usyreva, Departamento de Virologia, INTA-Castelar, Rep. Argentina.

ras. Finalmente, determinou-se o pico do vírus fazendo a leitura das diferentes frações a 260 nm. O RVB amostra Lincoln purificado foi conservado a -70°C .

3.1.2. RV amostra SA-11 (origem macaco)*

3.2. Amostra de fezes**

Neste trabalho foram incluídas, como grupo de teste, 48 amostras de fezes de bezerros previamente analisadas e classificadas como positivas ou negativas (TAB. II), pelas técnicas de ELISA-INTA policlonal (método indireto duplo "sandwich"); isoladamente em cultura de células, utilizando como sistema revelador imunofluorescência direta; e eletroforese do RNA vírico em gel de poliacrilamida, de acordo com os protocolos desenvolvidos por RED DE COOPERACION DE LABORATORIOS VETERINARIOS DE DIAGNOSTICO (1985).

3.2.1. Processamento das fezes

Para serem analisadas no teste de ELISA, as fezes foram homogeneizadas em PBS (British Drug House) 0,1 M pH 7,2 numa diluição de 1/10 e após clarificadas por centrifugação a 2.000 rpm durante 15 minutos. Esta suspensão foi conservada até o momento de sua utilização a -20°C . Na hora de serem testadas em ELISA, as amostras foram diluídas 1:3 em PBS/EDTA preparado nas seguintes proporções: 4ml de EDTA (British Drug House) 0,25 M pH 7,5, ajustado com Tris (Sigma) e 96 ml de PBS 0,1 M pH 7,2.

* Material cedido pela Dr^a Eliane de Castro, Laboratório de Virologia do Instituto Oswaldo Cruz do Rio de Janeiro.

**Material cedido pelas Dr^{as} M. Barrandeguy, E. Cornaglia e N. Fitzman, Departamento de Virologia, INTA-Castelar, Rep. Argentina.

TABELA II - Classificação das 48 amostras de fezes de bezerros após terem sido analisadas por três técnicas de referência (ELISA-INTA policlonal, isolamento em cultura de células e Eletroforese do RNA vírico em gel de poliacrilamida)

Amostras positivas pelos três testes										Amostras negativas pelos três testes							
034	041	043	058	060	111	112	134	143		031	032	039	051	054	114	118	135
194	196	200	202	204	210	216	217	219		192	270						
220	269	274	276	280	283	284	285	286									
294	295	297	298	301	302	303	304	310									
316	322																

Fonte: Amostras cedidas pelo Laboratório de USYREVA, Dep. Virologia, INTA-Castelar - República Argentina.

3.3. Camundongos*

Nestes experimentos foram utilizados camundongos da linhagem Balb/c, machos e fêmeas com 4 a 6 semanas de vida.

3.4. Antisoros

3.4.1. Soro de camundongo anti-RVB

O soro de camundongo policlonal anti-RVB foi obtido a partir de três camundongos Balb/c que receberam o esquema de imunização apresentado no QUADRO 1. Os animais foram sangrados pelo plexo venoso ocular, e 24 horas após da formação do

* Material cedido pelo Prof. Carlos Tavares, Departamento de Bioquímica-Imunologia, Instituto de Ciências Biológicas da UFMG.

coágulo, o soro foi separado por centrifugação a 2.500 g durante 20 minutos a T.A. Este soro foi positivo no teste de ELISA indireto até uma diluição de 1:6.400 sendo utilizado como controle positivo no referido teste na diluição de 1:800 em PBS 0,1 m pH 7,2.

3.4.2. Soro de camundongo pré-imune

O soro de camundongo pré-imune foi obtido a partir de três camundongos Balb/c de trinta dias de idade de acordo com a técnica descrita em 3.4.1. A ausência de Ac anti-RVB nestes soros foi confirmada pelo teste de ELISA indireto. Este material foi utilizado como controle negativo no teste de ELISA indireto na detecção de Ac anti-RVB numa diluição de 1:100 em PBS 0,1 m pH 7,2.

3.4.3. Soro de coelho anti-RVB*

O soro de coelho anti-RVB, denominado F33, tinha sido previamente titulado, sendo utilizado como Ac de captura no teste de ELISA I e ELISA IV, na concentração de 0.08 ug de proteína/100ul em tampão carbonato-bicarbonato (British Drug House) 10 mM pH 9,6.

3.4.4. Soro de bovino anti-RVB

O soro de bovino anti-RVB, denominado F40, foi utilizado como Ac detector na diluição de 1:500 em PBS 0,1m pH 7,2 de ELISA I e III.

3.4.5. Soros anti-IgG e IgM de camundongos**

Os soros padrões anti-IgG e IgM de camundongo prepa

* Material cedido pelo Laboratório de USYREVA, Departamento de Virologia, CICV-INTA, Castelar - Rep. Argentina.

** Material cedido pelo Dr. Daniel Lopez, Instituto Dudwig para Pesquisa do Câncer, São Paulo.

rados em coelho foram utilizados no teste de imunodifusão em gel de ágar na determinação dos isótipos dos ACm selecionados.

3.5. ACm2RVB purificados

3.5.1. Precipitação com sulfato de amônio

Dez ml de líquido ascítico contendo ACm2RVB foram diluído em 10 ml de PBS 0,1m pH 8,0. Este ACm de tipo IgM foi precipitado por adição gota a gota a 4°C sob agitação permanente de 20 ml de uma solução saturada de sulfato de amônio (sigma ACS) pH 7,1 de modo a se obter uma concentração final de 50% de sulfato de amônio. Após o material permanecer 30 minutos em agitação a 4°C, foi transferido a geladeira permanecendo em repouso "overnight". O precipitado foi então lavado por centrifugação a 10.000 rpm durante 20 minutos a 4°C e o sedimento ressuspenso em 4 ml de PBS 0,1 m pH 8,0 para 1:5 do volume original do líquido ascítico diluído. Uma nova precipitação foi realizada em 2 ml de uma solução saturada de sulfato de amônio (0,5 ml de sulfato de amônio por cada 1 ml de material ressuspenso, sob agitação a 4°C durante 30 minutos. O sobrenadante foi eliminado por centrifugação a 10.000 rpm a 4°C durante 20 minutos e o sedimento contendo ACm 2RVB foi ressuspenso em 1 ml de PBS 0,1m pH 8,0 (1:10 do vol. original), seguindo-se diálise exaustiva contra o mesmo tampão (6 trocas de 500 ml cada 12 horas durante 3 dias) com o objetivo de eliminar o sulfato de amônio. Este material foi armazenado a -20°C.

3.5.2. Quantificação de proteínas

A dosagem de proteínas foi realizada seguindo-se o método de BRADFORD (1976). A partir de uma alíquota do material purificado foram feitas diluições de base 2 em SS (Merck) 0,9% e 50ul de cada diluição adicionada a 2 ml de reagente de BRADFORD, 1976.

As amostras foram lidas em espectrofotômetro a 592 nm e os resultados lançados num gráfico previamente construído com diferentes diluições de uma solução padrão de soroalbumina bovina (sigma).

A concentração de proteína determinada foi de 12,8 mg/ml, valor obtido por extrapolação da curva padrão.

3.6. Conjugados com peroxidase

3.6.1. Conjugado anti-Ig totais de camundongo*

O conjugado anti-Ig totais de camundongo, para reações imunoenzimáticas (ELISA), foi utilizado na diluição de 1:600 em PBS 0,1m pH 7,2.

3.6.2. Conjugado anti-Ig totais de bovino

O conjugado anti-Ig totais de bovino, para reações imunoenzimáticas (ELISA), foi utilizado como Ac revelador no teste de ELISA I e III na diluição de 1:1.000 em PBS 0,1m pH 7,2.

3.6.3. Conjugação de ACm 2RVB

Utilizou-se neste procedimento, a metodologia adotada por WILSON & NAKANE (1980).

Após a dissolução de 4,0 mg de peroxidase (tipo IV Sigma) em 1,0 ml de água bidestilada, foi adicionado 200ml de uma solução 0,1m de periodato de sódio (Sigma) gota a gota, sob lenta agitação por 20 minutos à T.A. O sistema foi realizado "overnight" a 4°C em tampão acetato (Merck) 1 mM - pH 4,4. A solução foi estabilizada, pela adição de 20 ul de tampão car-

* Material cedido pelo Dr. Evaldo Nascimento, Laboratório de Imunoparasitologia, Departamento de Parasitologia do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG.

bonato -bicarbonato 0,2 m - pH 9,6. Ainda neste mesmo tampão ACm 2RVB, previamente precipitado com sulfato de amônia, foi solubilizado de modo a se obter uma concentração final de 8,0 mg/ml e então adicionado a solução de peroxidase-periodato de sódio (Merck). Após agitação por três horas à T.A., acrescentou-se 100 ul de baroidreto de sódio (Merck) 0,106 m, deixando a suspensão em repouso por 20 horas a 4°C. O conjugado foi precipitado a 4°C com um volume final de 50% de sulfato de amônio 90% em pH 7,1. Após centrifugação a 10.000 r.p.m. por 20 minutos, o sedimento foi lavado duas vezes na mesma solução e finalmente solubilizado em volume mínimo de PBS 0,1 m pH 7,2 e dializado exaustivamente contra o mesmo tampão. Adicionou-se ao conjugado assim obtido, soroalbumina bovina na concentração final 1% de glicerina (Merck tamponada em PBS pH 7,2 v/v). O conjugado foi armazenado a -20°C em pequenas alíquotas.

3.7. Microgeldifusão em ágar

A técnica de microgeldifusão foi usada para determinação de isotipos de ACm.

Foram utilizadas lâminas de vidro de 7,5 x 2,5 cm por 1 mm de espessura.

As lâminas foram lavadas com Extran (Merck) a 2% em água, durante 12 horas a T.A. Foram seladas com uma cobertura de 2,0 ml de ágar (Special Ágar Noble Difco) a 0,2% em água destilada. Em seguida foram levadas à estufa a 37°C onde permaneceram por 12 horas para secarem do gel. A seguir foram conservadas a T.A. No momento do uso das lâminas foram cobertas com moldes adequados para microgeldifusão. Ágar 1% em PBS 0,15 m pH 7,2, contendo azida sódica (Merck) na concentração final de 0,1%, foi introduzido por capilaridade com auxílio de uma seringa sob o molde.

Os sobrenadantes de cultura dos clones selecionados, a serem testados, foram colocados em um volume aproximado de 10 ul nos orifícios dos moldes para microgeldifusão. Nos ori-

fícios centrais adicionou-se um volume aproximado de 10 ul dos soros padrões anti-IgG ou IgM de camundongo.

Câmaras úmidas com solução de azida sódica a 0,05% em água bidestilada foram utilizadas para a armazenagem das lâminas durante as 48 horas de incubação a T.A. Decorrido esse tempo, a leitura foi procedida pela visualização macroscópica da linhas de precipitação no gel.

3.8. Tecnologia de hibridomas - fusão celular

Na produção de hebridomas para a obtenção de ACm seguiu-se basicamente a técnica descrita por GALFRÉ & MILSTEIN (1981); com algumas modificações.

3.8.1. Esquema de imunização de camundongos

Camundongos Balb/c foram imunizados no dia 0 com 2 ug de RVB amostra Lincoln purificada, sendo que 1ug (suspensão em 200 ul de PBS 0,1m pH 7,2) foi inoculado por via intraperitoneal e 1 ug em 100 ul de PBS 0,1m pH 7,2) emulsificado em adjuvante completo de Freund (Difco) v/v, foi inoculado por via subcutânea. Nos dias 12, 14, 15 e 16 após a primeira inoculação os animais receberam 2 ug de RVB amostra Lincoln purificada a cada dia em 200 ul de PBS 0,1m pH 7,2 por via intraperitoneal. Três dias após a última injeção os níveis de Ac anti-RVB foram avaliados pelo teste de ELISA indireto. O camundongo que apresentou o maior título de Ac anti-RVB (1/3.200) foi o escolhido como doador de células para realizar a fusão celular.

3.8.2. Obtenção das células do baço

O camundongo imunizado foi sacrificado por ruptura da coluna cervical e mergulhado em álcool 70%, levado à capela de fluxo laminar fixado à uma prancha de dissecação com proteção de alumínio laminado e com o auxílio de pinças e tesou-

as, sob condições de assepsia, a pele da região peritoneal foi removida, de modo a expor as vísceras. O baço foi removido e transferido para uma placa de Petri (100 x 20 cm 60 x 15 mm) contendo solução salina de Fazekas e Growth (FAZEKAS et alii, 1980) e dilacerado com duas pinças estéreis.

A suspensão foi então filtrada por uma tela de náilon presa à boca de um Beacker de 50 ml. Os linfócitos foram transferidos para um tubo de centrífuga de 35 ml e deixados em repouso por 10 minutos. Paralelamente, procedeu-se a diluição de uma alíquota da suspensão a 1:20 em solução de Turr (FAZEKAS et alii, 1980). A concentração de linfócitos para fusão foi padronizada em aproximadamente 8×10^7 ml em solução salina de Fazekas e Growth.

3.8.3. Obtenção de macrófagos para camada alimentadora ("Feeder Layer")

Camundongos albinos foram sacrificados e preparados com o mesmo procedimento descrito em 3.8.2 com o auxílio de pinças e tesouras estéreis a pele da região abdominal foi rebatida sem a perfuração da parede peritoneal. Inoculou-se na cavidade peritoneal dos animais 3-4 ml de uma solução de sacarose (Sigma) 0,34 M, gelada, com auxílio de uma seringa de 0,5 ml montada com agulha 25 x 8mm. Após suave massagem sobre o peritônio, a solução de sacarose contendo macrófagos foi aspirada e transferida para tubos de centrífuga mantidos em banho de gelo. Os macrófagos foram contados em câmara de Neubauer e distribuídos em placas de 96 orifícios ($2-4,0 \times 10^6$ macrófagos por placa) em placas de 24 orifícios ($1,0 \times 10^6$ macrófagos), garrafas plásticas de 80 ml (5×10^5 macrófagos) e garrafas de 250 ml ($2,0 \times 10^6$ macrófagos). A camada alimentadora, pode ser utilizada até 4 dias após a preparação.

3.8.4. Cultivo de plasmocitomas

Adotou-se para fusão celular, a linhagem de células

de plasmocitomas SP₂O de camundongo (SHULMAN et alii, 1978), não secretoras de imunoglobulinas, as quais foram transferidas do nitrogênio líquido diretamente para banho-maria a 37°C até o completo descongelamento, sendo então imersas em banho de gelo por 3 minutos. Sob condições assépticas, as células foram introduzidas em tubos de centrífugas estéreis e lavadas em 10,0 ml de meio RPMI (Sigma) contendo 10% de soro fetal bovino (Microbiológica) e ressuspensão em 5,0 ml do mesmo meio. A suspensão de células foi então distribuída em garrafas e utilizada na fase exponencial de crescimento, apresentando 98% de viabilidade.

3.8.5. Fusão celular

Adotou-se o método descrito por FAZEKAS et alii (1980).

Em tubo plástico de 50 ml, adicionou-se 8×10^7 células de baço de camundongo imunizado e $2,7 \times 10^7$ células de plasmocitomas SP₂O de camundongo. Ambas suspensões celulares foram padronizadas em solução salina de Fazekas e Growth. A suspensão celular foi centrifugada a 1800 r.p.m. por 8 minutos à T.A. e os sobrenadante completamente desprezado.

Ao sedimento adicionou-se um mililitro de polietileno glicol, agente fusogênico da escolha (PEG 6000 - Sigma), previamente aquecido a 37°C, gota a gota, sob agitação constante, prolongada até 90 segundos após completa adição do PEG. Adicionou-se então 25, ml de solução salina de Fazekas & Growth, obedecendo-se à seguinte ordem cronológica, e sob agitação constante: 1,0 ml em 30 segundos; 3,0 ml em 30 segundos e 21,0 ml em 60 segundos. Decorrido este tempo, o volume do tubo foi completado para 45,0 ml com solução salina, deixando-se o sistema em repouso por 5 minutos. As células foram então centrifugadas a 1800 r.p.m. por 8 minutos, o sobrenadante desprezado e o sedimento ressuspensão em 30 ml de meio RPMI contendo 10% de soro fetal bovino. Centrifugou-se a suspensão celular a 1800 r.p.m. por 8 minutos. O sobrenadante foi total

mente desprezado e o sedimento redissolvido em 5,0 ml de meio HAT (Sigma) contendo 15% de soro fetal bovino. Dessa suspensão, 3 ml foram distribuídos em razão de uma gota por orifício em 2 placas de 24 orifícios contendo "Feeder Layer" de macrófagos e 1,5 ml de meio HAT. Ao volume de 2,0 ml de células restantes, acrescentou-se 8,0 ml de meio HAT, sendo em seguida distribuídos uma gota por orifício em 2 placas de 96 orifícios contendo "Feeder Layer" de macrófagos em 0,1 ml de meio HAT. Todas as placas foram incubadas em estufa a 37°C, umidificada e com 5% de CO₂.

As placas foram examinadas a cada 2 dias para verificação de crescimento de colônias e condições de pH do meio. Uma semana após a fusão adicionou-se 1,0 ml de meio HAT às placas de 24 orifícios e 0,1 ml às placas de 98 orifícios, após ter sido aspirado o sobrenadante de cada pocinho. A partir do momento em que os clones se tornavam visíveis macroscopicamente, a presença de AC anti-RVB nos sobrenadantes das culturas, foi avaliado pela técnica de ELISA. O meio HAT foi usado para crescimento dos híbridos até 15 dias após a fusão e em seguida substituído pelo meio HT (Sigma).

3.8.6. Clonagem dos híbridos em meio líquido

As células que secretavam AC anti RVB, foram retiradas dos orifícios das placas com auxílio de pipetas tipo Pasteur, contadas em câmaras de Neubauer e clonadas através de diluições limitantes. Este método, obviamente, baseia-se na diluição das células de maneira que, estatisticamente teríamos apenas uma célula viável por pocinho. Elas foram diluídas a 1:10, 1:100, 1:1000, por transferência sucessivas em tubos de ensaio estéreis (100 x 100 mm) contendo 0,9 ml de meio HAT. Do tubo que continha a maior diluição, ou seja, menor quantidade de células, retiravam-se 50 células com auxílio de uma pipeta estéril de vidro (capacidade para 0,1 ou 0,2 ml), transferindo-as para um tubo estéril, contendo 2,5 ml de meio HAT. Em um segundo tubo, contendo o mesmo volume de meio, foram colocadas 100 células. As células conti

das em 2,5 ml de meio foram distribuídas, na proporção de uma gota por orifício, na metade de uma placa de 96 orifícios, contendo "Feeder Layer" de macrófagos em 0,1 ml de meio HAT. Na outra metade dessa mesma placa, distribuiu-se as 100 células, contidas em outro tubo de ensaio.

De cada placa de clonagem, selecionou-se no máximo 3 clones, baseando-se na capacidade de secretar AC anti-RVB, no poder de crescimento e na viabilidade dos híbridos. Quando surgiram dúvidas sobre a primeira clonagem, as células foram re-clonadas, seguindo-se o mesmo procedimento descrito anteriormente.

3.8.7. Expansão dos clones positivos

Os clones selecionados que se desenvolveram em pocinhos de clonagem, apresentando aspecto circular e aderência à placa, foram transferidos para placas com 24 pocinhos com auxílio de pipetas Pasteur estéreis, a partir do 10º dia de crescimento. Após o 4º dia, as células foram transferidas novamente para garrafas de 8,0 ml contendo 3,0 ml de meio HT e "Feeder Layer" de macrófagos, onde prosseguiu-se o cultivo até a formação semiconfluente de células, sendo então transferidas para garrafas com capacidade de 250 ml, permanecendo até tornarem-se confluentes em todo o fundo do frasco, sendo transferidas para garrafas de Roux, para a obtenção de grandes volumes de sobrenadante de cultura contendo ACm.

Invariavelmente, todos os clones expandidos e que apresentavam boa viabilidade, foram também congelados, sendo as células coletadas diretamente de garrafas de cultura, contidas em câmara de Newbauer, centrifugadas a 1800 RPM por 8 minutos e ressuspensas em solução gelada de DMSO (Sigma) 5%, gota a gota, sob agitação até se obter uma concentração celular de 10^6 - 10^7 células/ml. A suspensão foi distribuída em alíquotas de 1,0 ml em tubos de Nunc (Thomas Scientific) estéreis, devidamente identificados e imediatamente deixados "overnight" a -70°C , sendo então, introduzidos em nitrogênio líquido.

3.8.8. Produção de líquido ascítico

Um grupo de camundongos Balb/c foram inoculados previamente com 0,5 ml de Nujol (Shering, Brasil) ou Pristane e, 6, 10, 14-tetrametilpentadecano (Sigma), por via intraperitoneal. Pela mesma via foram inoculadas 10^6 células de cada clone em um volume de 0,5 ml de meio RPMI contendo 15% de soro fetal bovino. Após o desenvolvimento do tumor (7-10 dias após inóculo), o líquido ascítico foi coletado, centrifugado a 900 r.p.m., por 10 minutos à T.A., decantado em frascos tipo penicilina e as células foram ressuspensas em 0,5 a 0,1 ml de meio RPMI e novamente inoculadas em outros camundongos. O congelamento a -20°C do líquido ascítico obtido de cada camundongo foi precedido de dosagem de AC anti-RVB pelo teste de ELISA indireto.

3.9. Reação imunoenzimática (ELISA)

3.9.1. ELISA indireto na detecção de AC anti-RVB

3.9.1.1. Sensibilização das placas e padronização da concentração de Ag

Microplacas de poliestireno (Hemobag), contendo 96 orifícios, com capacidade de 200 μl por orifício foram sensibilizadas com RVB - amostra Lincoln purificada nas concentrações de 0,0125; 0,025; 0,05; 0,1 e 0,2 μg de proteína por 100 μl de tampão carbonato bicarbonato 10 mM pH 9,6. A cada orifício da placa adicionou-se 100 μl da solução de Ag, seguindo-se incubação "overnight" a 4°C , em câmara úmida sendo utilizadas ao dia seguinte da sensibilização.

A padronização da concentração de RVB-amostra Lincoln purificada a ser observada nos orifícios da placa foi feita empregando soro de camundongo anti-RVB (3.4.1.) na diluição de 1:800 em PBS 0,1 M pH 7,2 e soro de camundongo preimmune, control negativo (3.4.2.) na diluição de 1:100 em PBS

0,1 M pH 7,2.

A padronização da concentração ótima de proteína do Ag e da curva de variação das cores nas reações quantitativas foram feitas baseando-se nas absorções obtidas através de espectrofotômetro característica no comprimento de onda (λ) de 492 nm.

3.9.1.2. Execução da técnica

As placas sensibilizadas com o Ag foram lavadas duas vezes com SST, por inversão sobre a pia e posteriormente sobre papel absorvente para retirar o excesso de SST. Em seguida, 100 μ l de PBSC adicionado em cada orifício com o objetivo de cobrir os espaços livres da fase sólida (bloqueio). Após incubação durante 30 minutos a 37°C ou 1 hora à T.A. em câmara úmida, as placas foram lavadas três vezes com SST. A continuação 100 μ l de soro, sobrenadante de cultura ou líquido ascítico foram adicionados aos diferentes orifícios. Quando desejou-se determinar o título de Acs, nesses materiais, as diluições foram feitas em PBS 0,1 M pH 7,2.

Após incubação durante 45 minutos à T.A. em câmara úmida, as placas foram lavadas seis vezes em SST. Em cada orifício foi então colocado 100 μ l de conjugado anti-Ig totais de camundongo (3:6.1.), na diluição de 1:600 em PBS 0,1 M pH 7,2, seguindo-se nova incubação por 45 minutos à T.A. em câmara úmida. Após essa incubação, as placas foram lavadas nove vezes em SST e adicionou-se em cada orifício 100 μ l de tampão citrato (Merck) 0,1 M pH 5,0 contendo 30 mg por cento de ortofenilendiamino (Sigma) e 0,012% de H₂O₂ (Peridrol Merck) como substrato. As placas foram incubadas durante 15 minutos à T.A. em câmara escura e, após esse período, 50 μ l de ácido sulfúrico (Merck) 2 N foram adicionados em cada orifício para interromper a reação.

3.9.1.3. Leitura das reações e interpretações dos resultados

As leituras das reações foram feitas com ajuda do espectrofotômetro no comprimento de onda (λ) de 492 nm e a interpretação dos resultados levando em consideração os controles positivos e negativos usados para cada placa.

3.9.1.4. Controles do conjugado e substrato

Em cada placa foi incluído um controle do conjugado (2 orifícios que receberam Ag de captura, PBS 0,1 M pH 7,2 substituindo as Igs de camundongo, conjugado e substrato) e um controle de substrato (2 orifícios que receberam Ag de captura, PBS 0,1 M pH 7,2 e substrato). O controle do substrato foi utilizado na calibração do espectrofotômetro.

3.9.1.5. Controles positivo e negativo

Em cada placa foi incluído um soro de camundongo policlonal anti-RVB (3.4.1) na diluição de 1:800 em PBS 0,1 M pH 7,2 como controle positivo e um soro de camundongo pré-imune (3.4.2) na diluição de 1:100 em PBS 0,1 M pH 7,2, como controle negativo.

3.9.2. ELISA na detecção de R.V.B.

3.9.2.1. ELISA I indireto duplo "sandwich" utilizando Ac policlonais

3.9.2.1.1. Sensibilização das placas

Microplacas de poliestireno (3.9.1.1.) foram sensibilizadas com 0,08 μ g de proteínas por 100 μ l de tampão carbonato 10 mM pH 9,6 por orifício, do soro de captura F33 an-

ti-RVB (3.4.3) seguindo-se incubação "overnight" a 4°C em câmara úmida, sendo utilizadas as placas no dia seguinte da sensibilização.

3.9.2.1.2. Execução da técnica

As placas sensibilizadas com Ac de captura foram lavadas com SST e bloqueadas com PBSC seguindo-se o protocolo descrito em 3.9.1.2. Em seguida, 100 µl da suspensão de fezes previamente processadas (3.2.1.) foram adicionadas, sendo distribuída cada amostra em um orifício. Após incubação durante 1 hora à T.A. em câmara úmida as placas foram lavadas 3 vezes com SST. Em cada orifício foi então colocado 100 µl de soro bovino detector anti-RVB F40 (3.4.4.) na diluição de 1.500 em PBS 0,1 M pH 7,2. Após incubação de 1 hora à T.A. em câmara úmida as placas foram lavadas 4 vezes com SST. Imediatamente, adicionou-se em cada orifício 100 µl de conjugado anti-Igs de bovino (3.6.2) na diluição de 1:1.000 em PBS 0,1 M pH 7,2. Após incubação de 1 hora à T.A. em câmara úmida, as placas foram lavadas 7 vezes com SST e adicionou-se em cada orifício 100 µl da solução de substrato de acordo com o estabelecido em 3.9.1.2. As placas foram incubadas durante 15 minutos à TA em câmara escura, e após esse período, 50 µl de ácido sulfúrico 2 N foram adicionados a cada orifício para interromper a reação.

3.9.2.2. ELISA II indireto duplo "sandwich" utilizando ACm2RVB como Ac detector

3.9.2.2.1. Sensibilização das placas

Idem 3.9.2.1.2.

3.9.2.2.2. Execução da técnica

As placas sensibilizadas com Ac de captura foram

lavadas, bloqueadas com PBSC e as amostras adicionadas como foi descrito em 3.9.2.1.2. Após incubação durante 1 hora à T. A. em câmara úmida as placas foram lavadas três vezes com SST. Em seguida cada orifício recebeu 100 ul de ACm2RVB (3.5) em PBS 0,1 M pH 7,2 como Ac detector. Após incubação durante 1 hora a TA em câmara úmida as placas foram lavadas 4 vezes com SST. Imediatamente, adicionou-se em cada orifício 100 ul de conjugado anti-Igs totais de camundongos (3.6.1.) na diluição de 1:600 em PBS 0,1 M pH 7,2. Após incubação durante 1 hora à TA em câmara úmida, as placas foram lavadas sete vezes com SST e adicionou-se em cada orifício 100 ul da solução de substrato de acordo com o estabelecido em 3.9.1.2. As placas foram incubadas durante 15 minutos à TA em câmara escura, e após esse período, 50 ul de ácido sulfúrico 2N foram adicionados a cada orifício para interromper a reação.

3.9.2.3. ELISA III indireto duplo "sandwich" utilizando ACm2RVB como Ac de captura

3.9.2.3.1. Sensibilização das placas

Microplacas de poliestireno (3.9.1.1.) foram sensibilizadas com 100 ul de diluições do ACm2RVB purificado (3.5.) em tampão carbonato-bicarbonato 10 mM pH 9,6. As placas foram incubadas "overnight" a 4°C em câmara úmida sendo utilizadas no dia seguinte da sensibilização.

3.9.3.2. Execução da técnica

Idem 3.9.2.1.2.

3.9.2.4. ELISA IV direto simples "sandwich" utilizando ACm2RVB conjugado com peroxidase co com Ac revelador

3.9.2.4.1. Sensibilização das placas

Idem 3.9.2.1.1.

3.9.2.4.2. Execução da técnica

As placas sensibilizadas foram tratadas, incubadas com as amostras e lavadas como em 3.9.2.1.2. Imediatamente adicionou-se 100 ul em cada orifício de ACm2RVB conjugado com peroxidase (3.6.3.) na diluição de 1:1.000 em PBS 0,1M pH 7,2. Após de incubação durante uma hora a TA em câmara úmida as placas foram lavadas sete vezes com SST e adicionaram-se em cada orifício 100 ul de substrato de acordo com o estabelecido em 3.9.1.2. As placas foram incubadas durante 15 minutos a TA em câmara escura e após esse período 50 ul de ácido sulfúrico 2N adicionado a cada orifício para interromper a reação.

3.9.2.5. ELISA V direto simples "sandwich" utilizando ACm2RVB como Ac de captura e simultaneamente conjugado com peroxidase como Ac revelador

3.9.2.5.1. Sensibilização das placas

Idem 3.9.2.3.1.

3.9.2.5.2. Execução da técnica

As placas foram tratadas e incubadas com as amostras e lavadas de acordo com 3.9.2.1.2. Imediatamente adicionou-se 100 ul de ACm2RVB conjugado na diluição de 1:1.000 em PBS 0,1 M pH 7,2 sendo feita a revelação diretamente como foi descrito em 3.9.2.4.2.

3.9.2.6. Leitura das reações e interpretação dos resultados

As leituras das reações foram feitas com ajuda do espectrofotômetro no comprimento de onda (DO) de 492 nM.

Leitura menores de 0.200 (DO) foram consideradas negativas. Esta primeira classificação foi feita considerando que uma intensidade de cor menor que esse valor, além de ser de difícil percepção no caso de se realizar a leitura em forma visual, em geral é consequência de reações inespecíficas. Leituras iguais ou maiores de 0.200 (DO), foram consideradas positivas com a seguinte classificação: de 0.200 a 0.499 (DO) 1+; de 0.500 a 0.999 (DO) 2+; de 1.000 a 1.499 (DO) 3+; de 1.500 a 2.000 (DO) 4+ e maiores de 2.000 (DO) 5+.

Na categoria 0.200 a 0.499 (DO) 1+, deve-se destacar que um resultado que seja incluído em um valor de 0.200 a 0.300 (DO) pode originar dúvidas no caso de se realizar a leitura visual, sendo necessário, quando é de interesse o resultado individual, confirmar esses resultados com um novo teste ou recorrer a outros testes de referência.

3.9.2.7. Controle de conjugado e substrato

Em cada teste de ELISA, foram incluídos um controle conjugado (dois orifícios) onde o Ag foi substituído por PBS(EDTA e um controle de substrato em onde o Ag foi substituído por PBS/EDTA e o conjugado por PBS 0,1 M pH 7,2. O controle de substrato foi sempre utilizado na calibração do espectrofotômetro.

4. RESULTADOS

4.1. Padronização do teste de ELISA indireto na detecção de Ac anti-RVB

A primeira preocupação quando se trabalha com a tecnologia de hibridomas é quanto ao método a ser usado para se detectar os Acs produzidos. O teste de ELISA indireto foi escolhido para esse fim por ser um método altamente sensível, por requerer pequenas concentrações de Ag, ser de fácil execução e por permitir ao mesmo tempo avaliar um grande número de sobrenadantes de culturas de células.

Com a finalidade de pesquisar Ac anti-RVB tornou-se necessário a padronização do teste de ELISA indireto, uma vez que não eram conhecidos os parâmetros ideais para o emprego do Ag de RVB amostra Lincoln purificada nesta técnica.

Os dados apresentados no GRAF.1, demonstram que 0,1 ug da amostra Lincoln de RVB purificada por 100 ul de tampão carbonato 10 mM pH 9,6, representa a concentração ótima para se detectar Ac de camundongo anti-RVB, pelo teste de ELISA indireto. Um incremento na concentração do Ag de até 2 mg não aumentou a sensibilidade da prova. Em razão disto, no teste de ELISA indireto para detecção de Ac anti-RVB, foi utilizada a concentração de 0,1 ug de RVB amostra Lincoln purificada por 100 ul de tampão carbonato 10 mM pH 9,6.

4.2. Produção de ACm

A obtenção de híbridos, bem como as etapas envolvidas na seleção de clones estão representadas no QUAD.1. As células após a fusão foram distribuídas em duas placas de 96 orifícios e duas de 24 orifícios em meio HAT. Todos os orifícios continham "Feeder layer" de macrófagos. Após o crescimento, a presença de Ac no sobrenadante das culturas foi avaliado pelo teste de ELISA indireto, em um total de 135 orifícios selecionados por apresentar um ótimo crescimento. Setenta e cinco dos sobrenadantes, (55,55% dos orifícios testados), estavam secretando Ac anti-RVB. Esses 75 híbridos foram classificados pela intensidade de cor desenvolvida no teste de ELISA em: a) fracamente positivo (1 +); b) positivo (2 +); sendo ambos grupos posteriormente desprezados; e c) fortemente positivos (3 +), sendo todos eles expandidos e criopreservados; e sete clonados (QUAD. 1). Das sete clonagens, foram selecionados 12 clones, dos quais três contaminaram, e nove permaneceram com capacidade secretora de Ac sendo portanto inoculados intraperitonealmente em camundongos Balb/c para produção de líquido ascítico. Destes nove, dois não cresceram, quatro perderam a capacidade de secretar Acs e os três restantes tiveram bom crescimento e boa capacidade secretora de Acs anti-RVB (QUAD. 1). Na TAB. III apresenta-se um resumo das principais características destes nove clones produtores de ACm.

4.2.1. Caracterização isotípica dos ACm

A caracterização de isotipos dos nove ACm obtidos de cultura de células está representada na TAB. III. Nela podemos observar que os ACm denominados ACm1RVB; ACm9RVB e ACm12RVB (33,33% dos clones obtidos) pertencem a classe G das imunoglobulinas, e que os ACm denominados ACm2RVB, ACm4RVB, ACm5RVB, ACm10RVB e ACm11RVB (66,66% dos clones obtidos) pertencem a classe M das imunoglobulinas.

4.2.2. Atividade imunológica dos ACm frente ao RVB

A atividade imunológica "in vitro" dos ACm foi avaliada pelo teste de ELISA indireto. Os títulos máximos dos ACm na presença de RVB estão mostrados na TAB. IV. Nos sobrenadantes de cultura, em geral o título da maioria dos ACm (ACm4RVB, ACm5RVB, ACm6RVB, ACm10RVB, ACm11RVB e ACm12RVB) foi baixo, reagindo positivamente só quando o material foi testado sem diluir. Títulos intermediários foram obtidos com ACm1RVB e ACm9RVB, enquanto ACm2RVB permaneceu positivo até uma diluição de 1:1.000.

Dos três ACm obtidos em camundongo, a partir do líquido ascítico, ACm2RVB apresentou um título elevado (1:1.000.000) enquanto ACm5RVB e ACm6RVB revelaram baixo título (TAB. IV).

Em razão destes resultados, o ACm2RVB foi selecionado para a realização de estudos subsequentes, sendo os demais ACm armazenados para estudos posteriores.

4.3. ELISA no diagnóstico de RVB

A capacidade apresentada pelos cinco testes de ELISA desenvolvidos neste trabalho em detectar RVB em fezes, foi avaliada frente a 48 amostras de bezerros que tinham sido previamente caracterizadas como positivas ou negativas (TAB. II) por três métodos de diagnóstico de referência: isolamento em cultura de células, ELISA-INTA policlonal e eletroforese do RNA vírico em gel de poliacrilamida (3.2). Foram também incluídas, como controles positivos, as amostras de referência RVB amostra Lincoln e RV-SA11.

Em todos os casos as leituras das reações foram feitas com ajuda de um espectrofotômetro no comprimento de onda de 492 nm, os resultados expressados em valores de D_0 , e as amostras foram classificadas pela intensidade de cor desenvolvida na reação de acordo com o estabelecido em 3.9.2.6.

4.3.1. ELISA I indireto duplo "sandwich" utilizando Acs policlonais

Na TAB. V são apresentados os resultados para cada uma das amostras analisadas pelo teste de ELISA I.

Por este teste, 14 amostras (47,75% das positivas) foram classificadas com 2 + (DO de 0.500 e 0.999) sendo que a maior leitura obtida foi de 0.752 (DO) correspondendo à amostra 194. A maioria das amostras (63,15% das positivas) foram classificadas com 1 + (DO de 0.200 a 0.499), (TAB. X, GRÁF. 6).

É interessante se destacar que a leitura de quatro amostras (210, 269, 301 e 302), 10,6% das amostras positivas, foi menor que 0.300 (DO) (TAB. V).

4.3.2. ELISA II indireto duplo "sandwich" utilizando ACmRVB como Ac detector

4.3.2.1. Titulação de ACm2RVB como Ac detector

Com o objetivo de determinar a capacidade de detecção e padronizar a concentração ótima de ACmRVB a ser utilizada no teste de ELISA II, foram empregadas as seguintes diluições deste ACm purificado: 1:25.000; 1:50.000; 1:75.000; 1:100.000; 1:125.000; 1:150.000; 1:175.000 e 1:200.000. Estas diluições foram testadas no ELISA II frente a concentrações fixas de RVB amostra Lincoln purificada e três amostras de fezes de bezerros previamente caracterizadas por ELISA I policlonal, havendo sido classificadas como fortemente positivas: amostra 194; fracamente positiva: amostra 301; e negativa: amostra 031. Como é indicado no GRÁF. 2, ACm2RVB mostrou-se eficaz como Ac detector, sendo considerada a diluição de 1:50.000 como a concentração ótima a ser utilizada neste teste.

4.3.2.2. Análises das amostras de fezes de bezerros

Na TAB. VI são apresentadas os resultados para cada

uma das amostras, analisadas pelo teste de ELISA II.

Este teste apresentou uma especificidade e sensibilidade de 100%, sendo que 55,26% das amostras positivas foram classificadas com 2 + (DO de 0.500 a 0.999) e 44,77% das amostras positivas com 1 + (DO de 0.200 a 0.499) (TAB. X; GRÁF. 6). Somente 2 amostras, 204 e 301, apresentaram uma leitura menor que 0.300 (DO) (TAB. VI).

4.3.3. ELISA III indireto duplo "sandwich" utilizando ACm2RVB como Ac de captura

4.3.3.1. Titulação de ACm2RVB como Ac de captura

Com o objetivo de determinar a capacidade de captura e a concentração ótima de ACm2RVB a ser utilizado no teste de ELISA III, foram empregados microplacas de poliestireno sensibilizadas com ACm2RVB purificado nas seguintes concentrações: 6; 6,8; 8; 9,6; 12; 18; 24 e 48 ng de proteína por 100 ml de tampão carbonato bicarbonato 10 mM pH 9,6.

A padronização da concentração de ACm2RVB a ser absorvida nos orifícios da placa foi feita no teste de ELISA III, empregando concentrações fixas de RVB amostra Lincoln purificada e as três amostras de bezerros indicadas em 4.3.2.1.

Como está indicado no GRÁF. 3, 24 ng de proteína de ACm2RVB foi considerada a concentração ótima a ser utilizada no teste de ELISA III, embora uma concentração tão baixa como 12 ng de proteína foi capaz de detectar vírus na amostra 301 considerada como fracamente positiva.

4.3.3.2. Análise das amostras de fezes de bezerros

Na TAB. VII são apresentados os resultados para cada uma das amostras analisadas no teste de ELISA III.

ELISA III mostrou-se 100% específico e 100% sensível. Na TAB. X e no GRAF. 6 pode-se observar que das 38 amostras positivas somente nove (23,68% das positivas) apresenta-

ram uma leitura menor que 0.500 (DO), sendo que apenas uma delas (amostra 301) a leitura foi menor que 0.300 (DO) confirmando seu baixo conteúdo de Ag. É interessante se destacar que cinco amostras (13.15% das positivas) foram classificadas com 3 + (DO de 1.000 a 1.499) nível de positividade ainda não apresentado nos testes anteriores.

4.3.4. ELISA IV indireto simples "sandwich" utilizando ACm2RVB conjugado com peroxidase como Ac revelador

4.3.4.1. Titulação de ACm2RVB conjugado no teste de ELISA IV

Com o objetivo de determinar a capacidade de revelação e padronizar a concentração ótima de ACm2RVB conjugado com peroxidase no teste de ELISA IV foram testadas as seguintes diluições deste material: 1:500; 1:1.000; 1:1.500; 1:2.000; 1:2.500; 1:3.000; 1:3.500; 1:4.000; 1:4.500 e 1:5.000. Nesta determinação se utilizaram microplacas de poliestireno sensibilizadas de acordo com 3.9.2.1.1. sendo empregadas as amostras de vírus indicadas em 4.3.2.1. A diluição 1:1.000 foi considerada ótima para ser utilizada no diagnóstico de RVB no teste de ELISA IV (GRÁF. 4).

4.3.4.2. Análise das amostras de fezes de bezerros

Na TAB. VIII são apresentados os resultados para cada uma das amostras analisadas no teste de ELISA IV.

A especificidade e sensibilidade no teste de ELISA IV foi de 100%. Neste teste das 38 amostras positivas, somente cinco delas (13,15%) apresentaram uma leitura menor que 0.500 (DO), sendo que em duas amostras (210 e 301) a leitura foi menor que 0.300 (DO); sete amostras (18,42% das positivas) uma leitura de 0.500 a 0.999 (DO); doze amostras (31,57% das positivas) uma leitura de 1.000 a 1.499 (DO); onze amostras

tras (28,94% das positivas) uma leitura de 1.500 a 2.000 (DO) e três amostras (7,89% das positivas) uma leitura superior de 2.000 (DO) (TAB. VIII, GRAF. 4).

É interessante destacar que leituras superiores a 1.500 (DO) não tinham sido obtidas nos outros testes de ELISA previamente descritos neste trabalho (TAB. VIII; GRAF. 4).

4.3.5. ELISA V direto simples "sandwich" utilizando ACm2RVB na captura e simultaneamente conjugado com peroxidase na revelação

4.3.5.1. Titulação de ACm2RVB conjugado com peroxidase no teste de ELISA V

Com o objetivo de determinar a capacidade de revelação e padronizar a concentração ótima de ACm2RVB conjugado com peroxidase no teste de ELISA V foram testadas as mesmas diluições deste material indicadas em 4.3.4.1. Utilizou-se para esta determinação, microplacas de poliestireno sensibilizadas com ACm2RVB purificado de acordo com o descrito em 3.9.2.3.1., sendo empregadas as amostras de vírus indicadas previamente em 4.3.2.1.

Embora uma diluição de 1:2.000 permitiu diferenciar as amostras positivas das negativas; foi considerada 1:1.000 a concentração ótima de ACm2RVB conjugado para se utilizar no teste de ELISA V no diagnóstico de RVB (GRAF. 5).

4.3.5.2. Análise das amostras de fezes de bezerros

Na TAB. IX são apresentados os resultados para cada uma das 48 amostras analisadas no teste de ELISA V.

O teste de ELISA V demonstrou-se 100% específico e 100% sensível, sendo onde se observaram as reações mais fortemente positivas: 63,15% das amostras positivas foram classificadas com 5 + (DO maior que 2.000); 13,55% com 4 + (DO de 1.500 a 2.000); 2,63% com 3 + (DO de 1.000 a 1.499); 10,52 %

com 2 + (DO de 0.500 a 0.999) e 10,52% com 1 + (DO de 0.200 a 0.499), sendo que nenhuma amostra resultou com uma leitura menor de 0.300 de DO (TAB. IX; TAB. X; GRAF. 6).

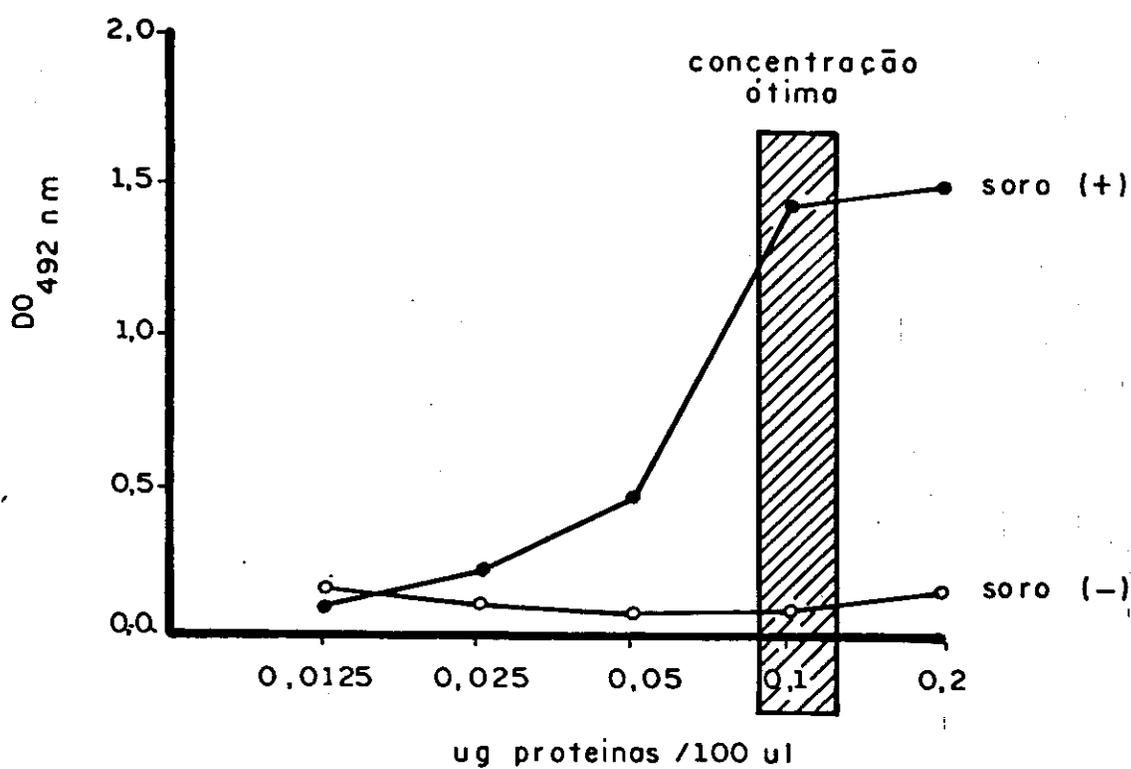


GRÁFICO 1 - DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO ÓTIMA DE PROTEÍNAS DO RVB AMOSTRA LINCOLN NA FASE SÓLIDA DO TESTE DE ELISA INDIRETO PARA A DETECÇÃO DE Acs ESPECÍFICOS

Soro (+): soro hiperimune de camundongo anti-RVB (1:800)

Soro (-): soro préimune de camundongo (1:100)

QUADRO 1 - ESQUEMA DE OBTENÇÃO DE CLONES PRODUTORES DE ACm ANTI-RVB

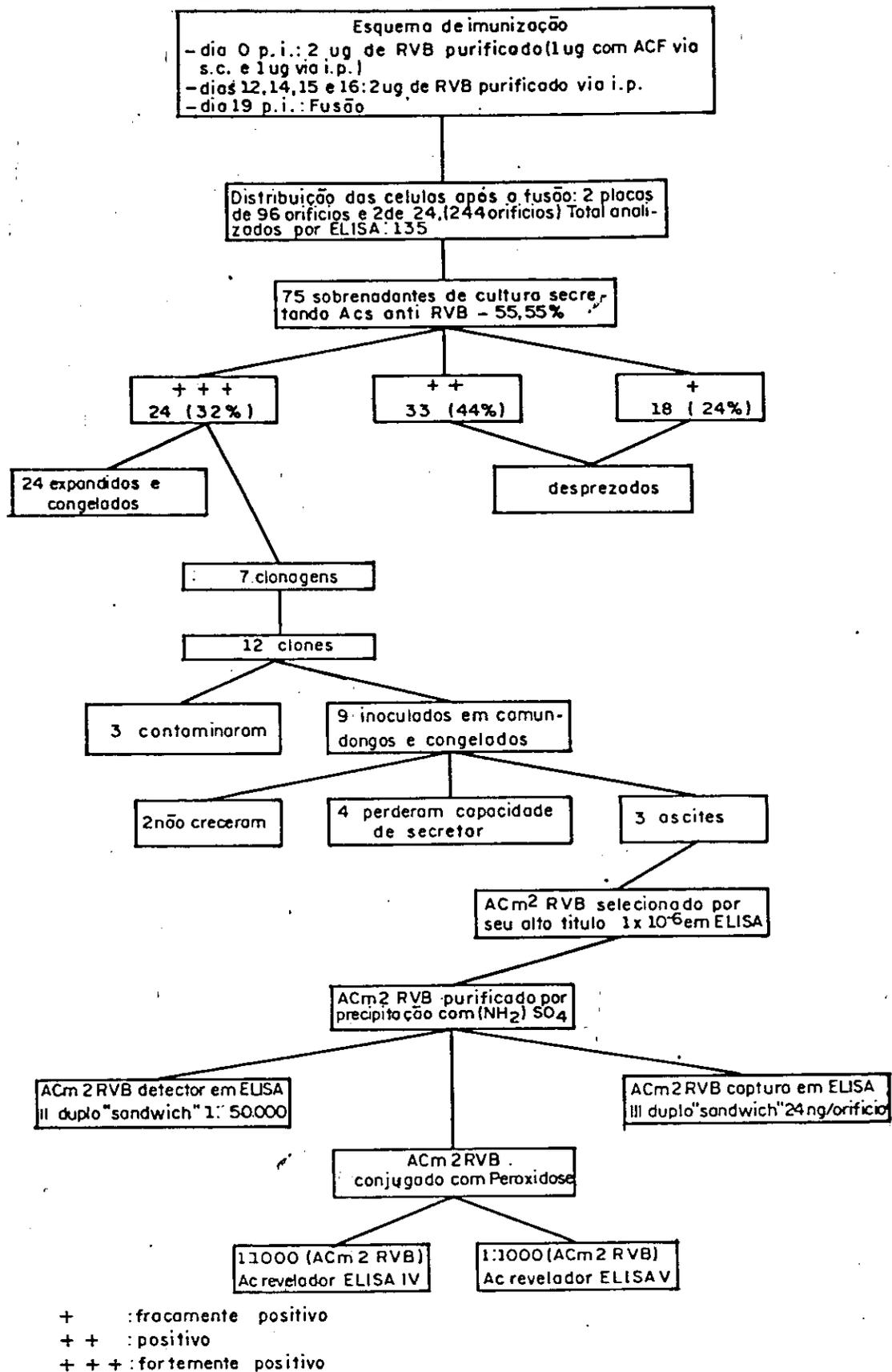


TABELA III - Características dos nove clones secretores de ACm

Isotipo		Sobrenadante de cultura	Produção tumor de	Líquido ascítico
Ig G	ACm1RVB	+++	sim	-
	ACm9RVB	++	sim	-
	ACm12RVB	+	sim	-
Ig M	ACm2RVB	+++	sim	+++
	ACm4RVB	+	não	
	ACm5RVB	+	sim	++
	ACm6RVB	+	sim	+
	ACm10RVB	+	sim	-
	ACm11RVB	+	não	

+++ : Clones fortemente positivos no teste de ELISA

++ : Clones positivos no teste de ELISA

+ : Clones fracamente positivos no teste de ELISA

- : Clones que perderam a capacidade de secretar

TABELA IV - Título dos ACm em sobrenadante de cultura e líquido ascítico determinado pelo teste de ELISA

Origem do material	1:10	1:100	1:1.000	1:10.000	1:100.000	1:1.000.000	T í t u l o
puro							
ACm4RVB							ACm2RVB
ACm5RVB							
ACm6RVB							
ACm10RVB							
ACm11RVB							
ACm12RVB							
Liq. ascítico		ACm6RVB	ACm5RVB				ACm2RVB

TABELA V - Teste de ELISA I indireto duplo "sandwich" utilizando Ac policlonais no diagnóstico de RVB

A m o s t r a s	Leitura (DO)	Intrepretação
034	0.401	+
041	0.454	+
043	0.390	+
058	0.734	++
060	0.673	++
111	0.645	++
112	0.499	+
134	0.501	++
143	0.566	++
194	0.752	++
196	0.400	+
200	0.576	++
202	0.490	+
204	0.302	+
210	0.259	+
216	0.380	+
217	0.467	+
219	0.589	++
220	0.470	+
269	0.290	+
274	0.530	++
276	0.523	++
280	0.510	++
283	0.454	+
284	0.369	+
285	0.402	+
286	0.380	+
294	0.590	++
295	0.444	+
297	0.487	+
298	0.502	++
301	0.207	+
302	0.297	+
303	0.408	+
304	0.490	+
310	0.456	+
316	0.377	+
322	0.511	++
031	0.034	-
032	0.002	-
039	0.004	-
051	0.011	-
054	0.003	-
114	0.005	-
118	0.018	-
135	0.006	-
192	0.014	-
270	0.009	-
RVB (Lincoln)	0.310	+
SA-11	0.446	+
Controle do conjugado	0.000	-
Controle do conjugado	0.000	-

- = DO de 0.000 a 0.199

+ = DO de 0.200 a 0.499

++ = DO de 0.500 a 0.999

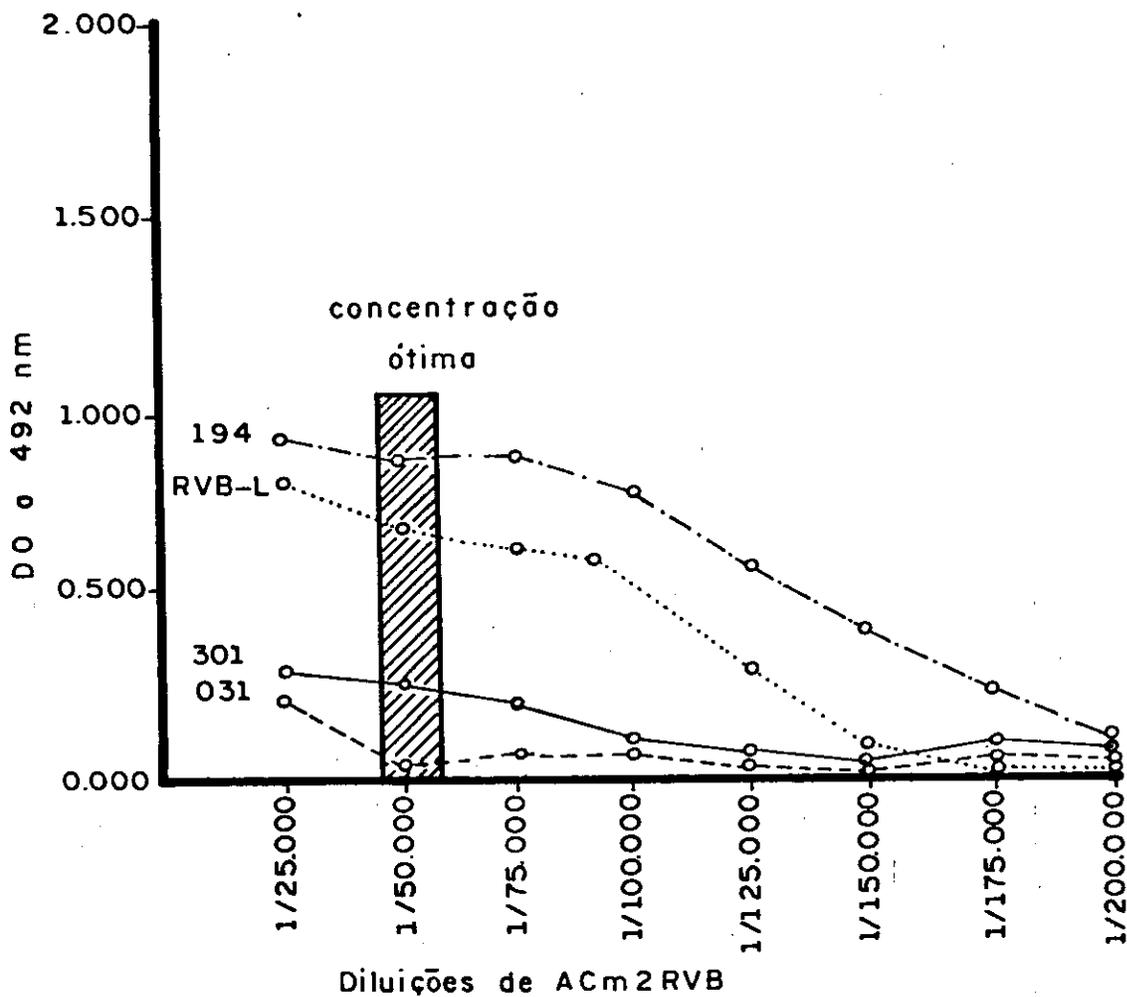


GRAFICO 2 - CURVA DE TITULAÇÃO DE ACm2 RVB PURIFICADO
COMO Ac DETECTOR NO TESTE DE ELISA II.

- RVB-L: RVB amostra Lincoln purificada
- 031 : amostra negativa para RVB
- 194 : amostra fortemente positiva para RVB
- 301 : amostra fracamente positiva para RVB

TABELA VI - Teste de ELISA II indireto duplo "sandwich" utilizando ACm2RVB como Ac detector no diagnóstico de RVB

A m o s t r a s	Leitura (DO)	Interpretação
034	0.462	+
041	0.586	++
043	0.496	+
058	0.760	++
060	0.856	++
111	0.631	++
112	0.627	++
134	0.509	++
143	0.642	++
194	0.766	++
196	0.413	+
200	0.653	+
202	0.498	+
204	0.267	+
210	0.310	+
216	0.550	++
217	0.533	++
219	0.622	++
220	0.488	+
269	0.377	+
274	0.669	++
276	0.500	++
280	0.547	++
283	0.451	+
284	0.447	+
285	0.466	+
286	0.455	+
294	0.588	++
295	0.520	++
297	0.542	++
298	0.553	++
301	0.247	+
302	0.340	+
303	0.439	+
304	0.554	++
310	0.466	+
316	0.431	+
322	0.520	++
031	0.081	-
032	0.069	-
039	0.103	-
051	0.114	-
114	0.098	-
118	0.044	-
135	0.035	-
192	0.082	-
270	0.069	-
RVB (Lincoln)	0.625	++
SA-11	0.744	++
Controle do conjugado	0.049	-
Controle do substrato	0.026	-

- = DO de 0.000 a 0.199

+ = DO de 0.200 a 0.499

++ = DO de 0.500 a 0.999

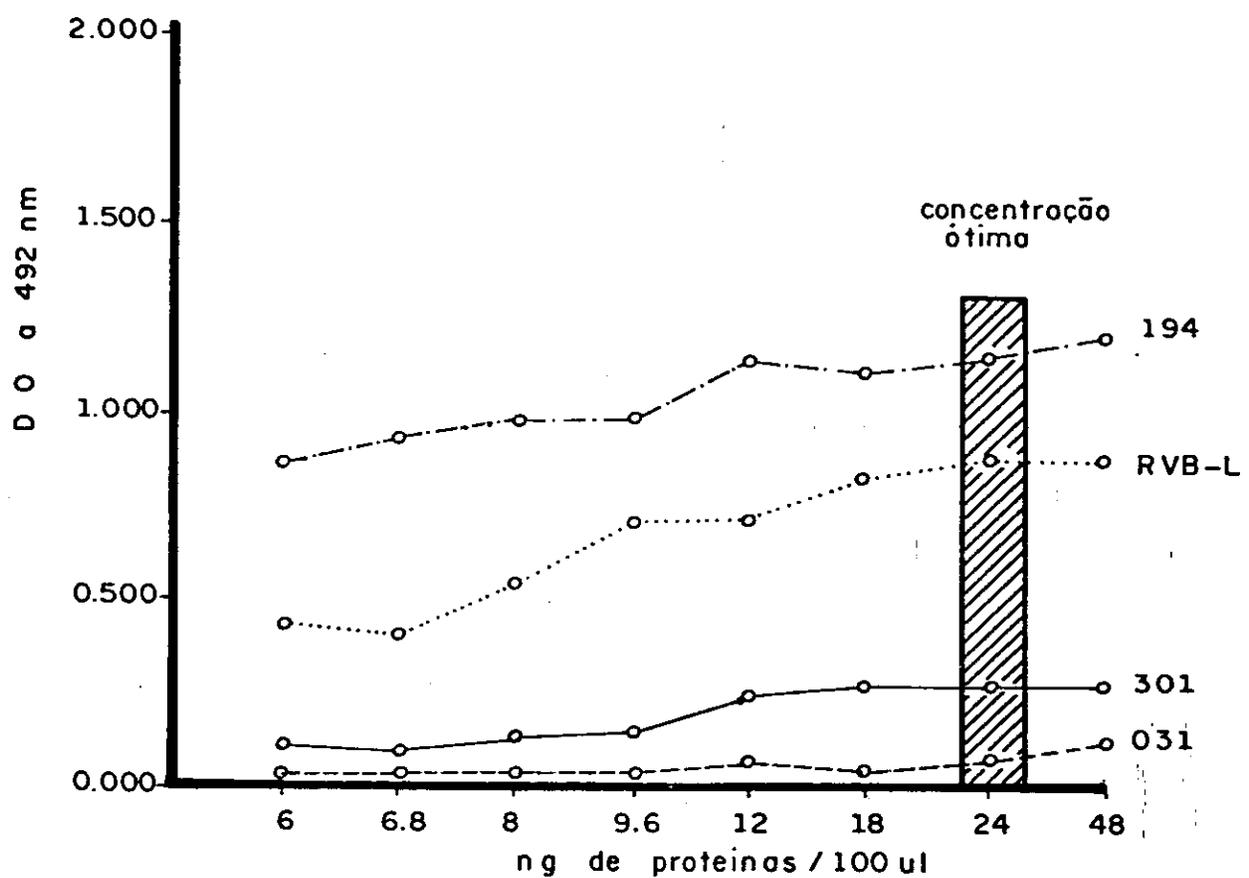


GRÁFICO 3- CURVA DE TITULAÇÃO DE ACm2RVB PURIFICADO
 COMO Ac DE CAPTURA NO TESTE DE ELISA III

RVB-L:RVB amostra Lincoln purificado
 031 : amostra negativa para RVB
 194 : amostra fortemente positiva para RVB
 301 : amostra fracamente positiva para RVB

TABELA VII - Teste de ELISA III indireto duplo "sandwich" utilizando ACm2RVB como Ac de captura, no diagnóstico de RVB

A m o s t r a s	Leitura (DO)	Interpretação
034	0.414	+
041	0.731	++
043	0.363	+
058	0.823	++
060	1.174	+++
111	0.567	++
112	0.600	++
134	0.374	+
143	0.476	+
194	1.292	+++
196	0.820	++
200	0.511	++
202	0.987	++
204	0.312	+
210	0.335	+
216	0.902	++
217	1.100	++
219	0,988	++
220	0.775	++
269	0.659	++
274	0.971	++
276	0.728	++
280	1.009	+++
283	0.976	++
284	0.736	++
285	0.984	++
286	0.737	++
294	1.300	+++
295	0.645	++
297	0.678	++
298	0.866	++
301	0.250	+
302	0.381	+
303	0.705	++
304	0.841	++
310	0.737	++
316	0.350	+
322	0.720	++
031	0.053	-
032	0.035	-
039	0.108	-
051	0.114	-
054	0.111	-
114	0.131	-
118	0.051	-
135	0.045	-
192	0.101	-
270	0.050	-
RVB (Lincoln)	0.871	++
SA-11	0.857	++
Controle do conjugado	0.034	-
Controle do substrato	0.001	-

- = DO de 0.000 a 0.199

+ = DO de 0.200 a 0.499

++ = DO de 0.500 a 0.999

+++ = DO de 1.000 a 1.499

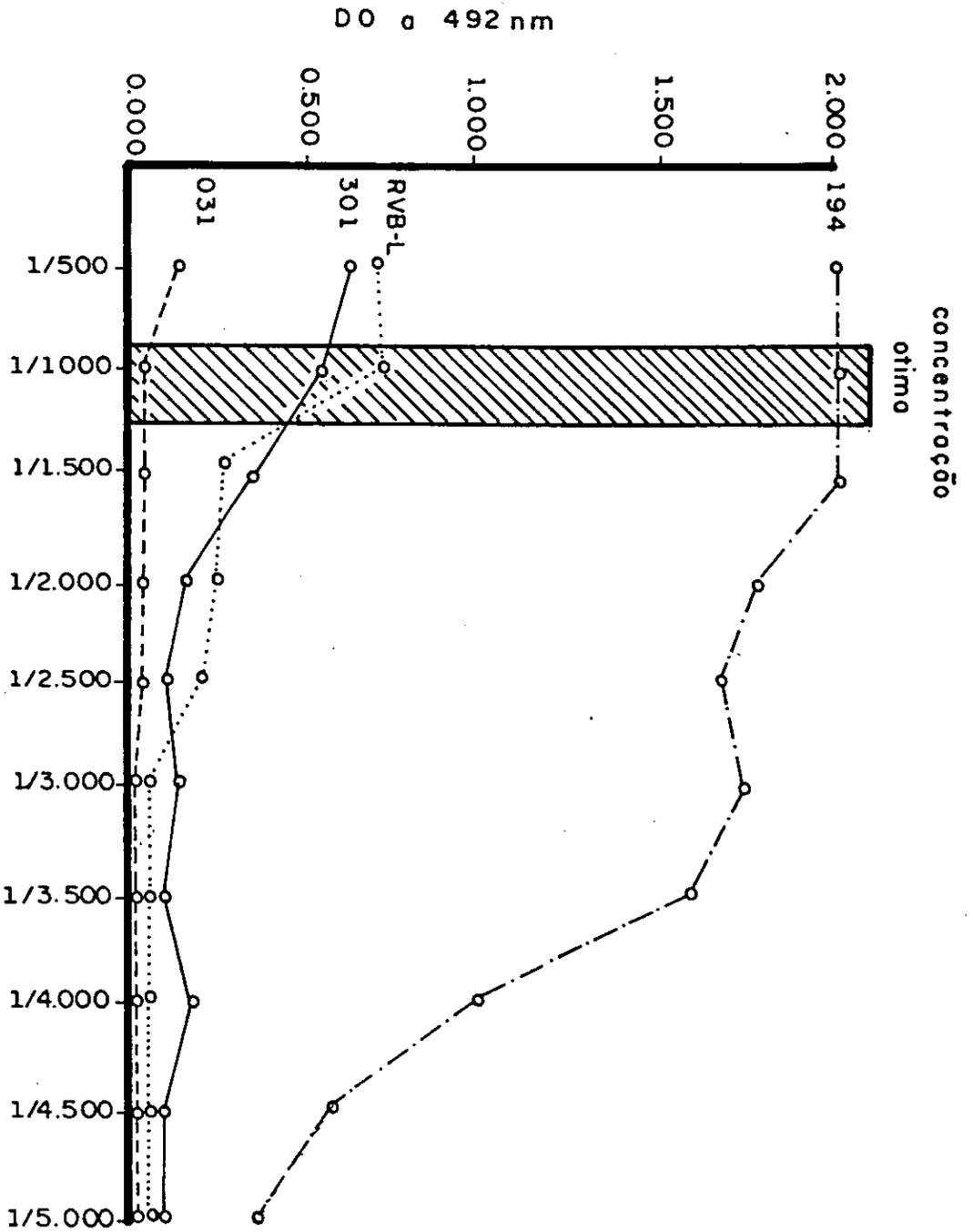


GRÁFICO 4 - CURVA DE TITULAÇÃO DE ACM 2 RVB CONJUGADO COM PEROXIDASE COMO AC REVELADOR NO TESTE DE ELISA IV

RVB-L: RVB amostra Lincoln purificado

031 : amostra negativa para RVB

194 : amostra fortemente positiva para RVB

301 : amostra fracamente positiva para RVB

TABELA VIII - Teste de ELISA IV direto simples, "sandwich" utilizando ACmRVB conjugado com peroxidase como Ac revelador no diagnóstico de RVB

A m o s t r a s	Leitura (DO)	Interpretação
034	0.376	+
041	1.185	+++
043	0.412	+
058	> 2.000	+++++
060	> 2.000	+++++
111	0.715	++
112	0.668	++
134	0.613	++
143	0.729	++
194	> 2.000	+++++
196	1.737	++++
200	1.615	++++
202	1.888	++++
204	0.409	+
210	0.270	+
216	1.266	+++
217	1.473	+++
219	1.523	++++
220	1.024	+++
269	1.283	+++
274	1.975	++++
276	1.338	+++
280	1.588	++++
283	1.535	++++
284	1.545	++++
285	1.944	++++
286	1.313	+++
294	1.852	++++
295	1.448	+++
297	0.914	++
298	1.561	++++
301	0.880	+
302	1.312	+++
303	1.001	+++
304	1.330	+++
310	1.454	+++
316	0.915	++
322	0.739	++
031	0.091	-
032	0.042	-
039	0.103	-
051	0.101	-
054	0.051	-
114	0.054	-
118	0.016	-
135	0.055	-
192	0.021	-
270	0.039	-
RVB (Lincoln)	0.971	++
SA-11	> 2.000	+++++
Controle do conjugado	0.012	-
Controle do substrato	0.000	-

- = DO de 0.000 a 0.199
+ = DO de 0.200 a 0.499
++ = DO de 0.500 a 0.999
+++ = DO de 1.000 a 1.499
++++ = DO de 1.500 a 2.000
+++++ = DO > que 2.000

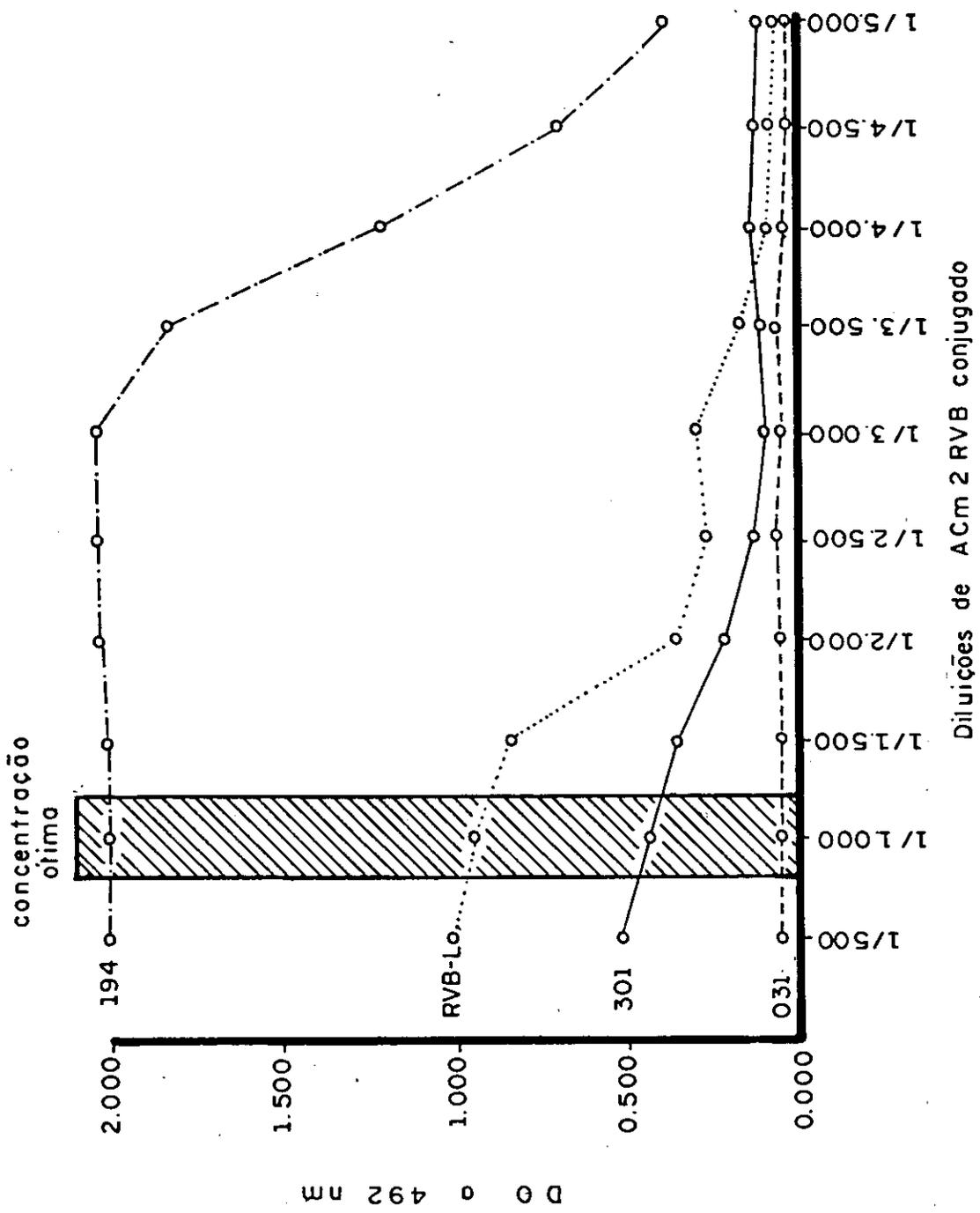


GRAFICO 5 - CURVA DE TITULAÇÃO DE ACm 2 RVB CONJUGADO COM PEROXIDASE COMO Ac REVELADOR NO TESTE DE ELISA V.

RVB-L : RVB amostra Lincoln purificado
 031 : amostra negativa para RVB
 194 : amostra fortemente positivo para RVB
 301 : amostra fracamente positivo para RVB

TABELA IX - Teste de ELISA V direto simples "sandwich" utilizando do ACm2RVB como Ac de captura e simultaneamente ACm2RVB conjugado com peroxidase como Ac revelador, no diagnóstico de RVB

A m o s t r a s	Leitura (DO)	Interpretação
034	0.376	+
041	0.771	++++
043	0.574	++
058	> 2.000	+++++
060	> 2.000	+++++
111	0.929	++
112	1.287	+++
134	0.978	++
143	0.944	++
194	> 2.000	+++++
196	> 2.000	+++++
200	> 2.000	+++++
202	> 2.000	+++++
204	0.487	+
210	0.344	+
216	> 2.000	+++++
217	> 2.000	+++++
219	> 2.000	+++++
220	> 2.000	+++++
269	> 2.000	+++++
274	> 2.000	+++++
276	> 2.000	+++++
280	> 2.000	+++++
283	> 2.000	+++++
284	> 2.000	+++++
285	> 2.000	+++++
286	1.905	++++
294	> 2.000	+++++
295	> 2.000	+++++
297	1.938	++++
298	> 2.000	+++++
301	0.385	+
302	> 2.000	+++++
303	1.964	++++
304	> 2.000	+++++
310	> 2.000	+++++
316	1.977	++++
322	> 2.000	+++++
031	0.091	-
032	0.052	-
039	0.094	-
051	0.092	-
054	0.127	-
114	0.113	-
118	0.085	-
135	0.067	-
192	0.111	-
270	0.043	-
RVB (Lincoln)	1.012	+++
SA-11	> 2.000	+++++
Controle do conjugado	0.017	-
Controle do substrato	0.007	-

- = DO de 0.000 a 0.199
 ++ = DO de 0.200 a 0.499
 ++ = DO de 0.500 a 0.999
 +++ = DO de 1.000 a 1.499
 ++++ = DO de 1.500 a 2.000
 +++++ = DO > 2.000

5. DISCUSSÃO

Recentemente, técnicas "rápidas", também denominadas de terceira geração (ORGANIZACION MUNDIAL DE LA SALUD, 1981), baseadas fundamentalmente em princípios imunológicos, estão sendo introduzidas nos laboratórios de diagnóstico virológico, substituindo métodos clássicos como isolamento em culturas de células, fixação de complemento, soroneutralização, etc., no intuito de aumentar a eficiência e rapidez na detecção de Ags e Acs, além de facilitar, simplificar e economizar cada vez mais o diagnóstico de rotina.

Entre as técnicas rápidas, o teste de ELISA vem adquirindo uma grande difusão e aceitação geral, em consequência das excelentes qualidades por ele apresentadas (VOLLER et alii, 1980).

No caso das rotavirose, o teste de ELISA é considerado hoje, por sua simplicidade e sensibilidade, o método de eleição para diagnóstico, permitindo detectar RV ou seus Ags, diretamente nas fezes de indivíduos infectados sem necessidade de tratamentos prévios (YOLKEN et alii, 1977a; ELLENS et alii, 1978; SIMHON et alii, 1979; GRAUDALLE et alii, 1981; ORGANIZACION MUNDIAL DE LA SALUD, 1981).

Um número crescente de métodos imunoenzimáticos estão sendo hoje produzidos e difundidos por diferentes laboratórios oficiais e privados ("kits" comerciais) destinados à realização do diagnóstico das rotavirose humanas e das dife-

rentes espécies animais, em geral utilizando soros policlonais convencionais (KNISLEY et alii, 1986).

O problema potencial destes soros policlonais, devido ao fato de serem obtidos de fontes diferentes ou da mesma fonte em períodos de tempo diferentes, é o seu alto grau de heterogenicidade como consequência do elevado número de populações de Ac diferentes, variáveis e indefinidas que participam em sua constituição.

Estes imunesoros podem, portanto, apresentar variações de especificidade e de sensibilidade, reatividade cruzada com outros Ag presentes na amostra e identificação eficiente de vírus de uma amostra e não de outra (BRESCHKIN et alii, 1981). Este fenômeno é mais crítico nos testes de diagnóstico de elevada sensibilidade, como é o caso dos métodos imunoenzimáticos, originando uma grande variação nos resultados e preocupando aos fabricantes de "kits" de diagnóstico pela falta de uniformidade e confiabilidade nos produtos elaborados.

Alguns autores, visando solucionar o problema produziram ACm com o objetivo de substituir os soros policlonais no teste de ELISA para diagnóstico de RV (BRESCHKIN et alii, 1981; BEARDS et alii, 1984; WHITE et alii, 1984; LAMBERT et alii, 1984; SHAW et alii, 1985; HERRMANN et alii, 1985; KNISLEY et alii, 1986; DOERN et alii, 1986).

Os ACm pelo fato de reconhecer um único epitopo, são, caracteristicamente reagentes altamente específicos. A obtenção destes reativos é feita a partir de clones de células híbridas capazes de crescer "in vitro", e como podem ser armazenados em nitrogênio líquido por tempo indeterminado, garantem a produção uniforme e contínua do produto de sua secreção. A inclusão destes reativos bem definidos e homogêneos nos "kits" de diagnóstico permite dispor de métodos com um alto grau de

especificidade, sendo também possível obter maior reprodutibilidade nos resultados, independentemente do tempo ou local de sua realização (MILSTEIN, 1980).

Com esse objetivo, neste trabalho foram produzidos e selecionados nove ACm (TAB. III), que reconheceram RVB amostra Lincoln com diferentes níveis de eficiência (TAB. IV). Entre eles o denominado ACm2RVB de isotipo M apresentou uma alta capacidade de reagir com o Ag homólogo, mantendo essa atividade até uma diluição de 1:1.000.000 no teste de ELISA indireto na detecção de Ac (TAB. IV).

Observa-se que nesta avaliação foi utilizado, como Ac revelador (conjugado), um soro anti Igs totais de camundongos, sendo portanto provável um aumento desse título no caso de se empregar um conjugado específico para IgM. Estas excelentes características de elevado título e alta afinidade, levaram a avaliar o ACm2RVB em quatro diferentes versões do teste imunoenzimático na identificação de RVB, sendo analisada independentemente de sua capacidade como Ac de detecção (ELISA II), Ac de captura (ELISA III), Ac de revelação (ELISA IV) e simultaneamente como Ac de captura e revelação (ELISA V).

Com a finalidade de comparação foi incluído o teste de ELISA I indireto duplo "sandwich" policlonal convencional. Serviu, também, como base para as modificações que originaram os testes de ELISA II, III e IV.

Observou-se que os cinco testes diferenciaram-se exclusivamente na composição de alguns dos reativos imunológicos (Ac) e no número de incubações realizadas ("sandwich" duplo ou simples). Mantiveram-se constantes o protocolo da técnica, os materiais, soluções e drogas utilizadas, que eventualmente, poderiam interferir na comparação dos resultados.

Após a análise de um total de 48 amostras de fezes de bezerras, previamente classificadas como positivas ou negativas por três técnicas de referência (4.1.3.) e duas amostras padrões de RV (RVB amostra Lincoln e SA-11), encontrou-se que os cinco testes de ELISA empregados foram 100% específicos, com ausência de falsos positivos, e 100% sensíveis, com

ausência de falsos negativos. A intensidade de cor desenvolvida durante a reação pelas amostras positivas foi marcadamente diferente em cada teste, quando se analisaram as leituras obtidas no espectrofotômetro em um comprimento de onda (λ) de 492 nm (TAB. X e GRAF. 6).

No teste de ELISA I, as reações positivas foram em geral baixas, alcançando um valor máximo de 2+ (λ 0.500 a 0.999) e houve uma alta percentagem de reações de 1+ (63.15% das amostras positivas) quando comparado com os outros testes (GRAF.6), sugerindo um medíocre desempenho dos soros policlonais, embora tenham sido empregados em diluições relativamente baixas.

Em função destes resultados, no caso de se empregar este teste no diagnóstico de rotina, é aconselhável para uma melhor interpretação dos resultados, principalmente quando se realiza a leitura à simples vista, processar as amostras paralelamente na mesma placa com um soro de captura hiperimune positivo e um soro de captura negativo, de acordo com o protocolo descrito em RED DE COOPERACION DE LABORATÓRIOS VETERINARIOS DE DIAGNÓSTICO, 1985. Esta modificação é imprescindível quando se tem que confirmar, com uma nova prova, aquelas amostras classificadas neste trabalho como fracamente positivas (λ 0.200 a 0.300) apresentadas no teste de ELISA I em quantidades importantes (10,52% das amostras positivas).

A substituição do soro bovino policlonal anti-RVB (soro detector) por ACm2RVB na diluição de 1:50.000 no teste de ELISA II melhorou a eficiência do método, invertendo a distribuição das percentuais das amostras positivas com respeito às observadas no teste de ELISA I (GRAF. 6).

Embora essa capacidade tenha se conservado até uma diluição 1:75.000, permitindo detectar a presença de Ag virais na amostra 301, caracterizada por possuir baixa concentração de RV, com o objetivo de garantir a sensibilidade do método, 1:50.000 foi considerada a diluição ótima a ser utilizada neste teste. É interessante destacar que, como Ac revelador (conjugado), foi utilizado um soro anti-Igs totais de camundongo, existindo a possibilidade de se aumentar ainda mais

a eficiência deste teste com a inclusão de um conjugado específico anti-IgM.

Estes resultados coincidiram com os reportados por BEARDS et alii (1984), os quais demonstraram um melhor rendimento no teste de ELISA indireto na identificação de RV com a inclusão de um ACm na diluição 1:10.000 na etapa de detecção. Posteriormente outros autores (WHITE et alii, 1984; LAMBERT et alii, 1984; HERMANN et alii, 1985) confirmaram esses resultados quando utilizaram ACm anti-RV grupo específico na etapa de detecção. Observa-se que em todos esses trabalhos os diferentes ACm foram empregados em concentrações marcadamente superiores ao ACm2RVB, destacando-se como uma das qualidades deste ACm, o seu elevado título.

Um melhor comportamento ainda foi observado no teste de ELISA III com a incorporação de ACm2RVB como Ac de captura. O poder de captura deste ACm pode ser avaliado observando os dados apresentados no GRAF. 3 e no GRAF. 6. Uma concentração tão baixa como 12 ng de proteína (equivalente a uma diluição 1:100.000) foi suficiente para capturar RVB ainda na amostra 301 (fracamente positiva) e um aumento na concentração de proteína na fase sólida até 48 ng não modificou substancialmente os resultados, sendo que 24 ng de proteína foi considerada a concentração ótima de ACm2RVB para sensibilizar as microp^lcas no teste de ELISA III.

Nestas condições o teste de ELISA III apresentou reação fortemente positivas de até 3+ (DO 1.000 a 1.499) traduzida por intensidade de cor, não observada nos testes anteriores.

Esta excelente capacidade de captura converte a ACm2RVB em um reativo altamente qualificado, considerando que a primeira fase do teste de ELISA é extremamente crítica, e uma eficiente captura é a base fundamental de todo teste imunoenzimático sobre o que se sustenta as demais etapas.

Esta última observação explicaria o fato que os melhores resultados, entre os três testes de ELISA doble "sandwich", foram obtidos em ELISA III quando ACm2RVB substituiu o soro policlonal na captura, embora tenha sido mantido o mesmo siste

ma detector-revelador que em ELISA I. A substituição de soro policlonal detector por ACm2RVB em ELISA II, mudando a totalidade do sistema revelador apesar de melhorar a eficiência com referência ao ELISA I, não alcançou o nível obtido no ELISA III (TAB. IX, GRAF. 6).

Em trabalhos anteriores diferentes autores (BEARDS et alii, 1984; SHAW et alii, 1985; KNILEY et alii, 1986) demonstraram que a inclusão de um ACm na fase sólida no teste de ELISA aumentou, significativamente, a capacidade de captura de RV, quando foi comparado com soros policlonais. Embora estes resultados coincidam com os apresentados neste trabalho, destaca-se que esses ACm foram empregados em diluições não maiores de 1:10.000 (BEARDS et alii, 1984), quatro vezes menor à indicada para o ACm2RVB.

Visando simplificar ainda mais o teste de ELISA no diagnóstico de RVB, o ACm2RVB foi conjugado com peroxidase e avaliação em duas versões diferentes do teste de ELISA direto simples "sandwich": o ELISA IV que utilizou soro policlonal na captura e ELISA V que utilizou na captura ACm2RVB.

O teste de ELISA direto simples "sandwich" conta com a vantagem de eliminar uma etapa de incubação, facilitando dessa forma a operacionalidade do laboratorista, além de diminuir as possibilidades de erros possíveis de se produzir durante a realização da técnica (ORGANIZACION MUNDIAL DE LA SALUD, 1981).

Embora o teste de ELISA IV tenha conseguido um aumento marcado na intensidade de cor desenvolvida pelas amostras positivas, o teste de ELISA V, que utilizou exclusivamente ACm2RVB como reativo imunológico, foi o que apresentou a maior eficiência na detecção RVB, mostrando as reações mais fortemente positivas (TAB. IX; GRAF. 6).

Estas marcadas diferenças obtidas nas leituras das amostras positivas, entre o teste de ELISA IV e V, são podem ser explicadas pela substituição do soro de captura policlonal por ACmRVB, confirmando, como já foi observado no teste de

ELISA III, a excelente capacidade de captura deste ACm.

Embora o marcado aumento na intensidade de cor observada na maioria das amostras positivas nos testes de ELISA IV e fundamentalmente, ELISA V, como consequência da maior eficiência na detecção de RV, alcançando em algumas leituras valores de até $5 \times (DO \ 2.000)$, este fato não modificou a especificidade dos testes, mantendo-se ausentes os falsos positivos (TAB. IX).

Embora tenha sido descrito que o teste de ELISA duplo "sandwich" é mais sensível que o simples "sandwich" pelo fato de estar amplificada a reação Ag-Ac nas etapas detecção-revelação (ORGANIZACION MUNDIAL DE LA SALUD, 1981), surpreendentemente os testes de ELISA IV e V apresentaram as reações mais fortemente positivas.

Estes resultados contradisseram os obtidos por BEARDS et alii (1984). Nesse informe, os autores reportaram que um teste de ELISA direto simples "sandwich" utilizando exclusivamente ACm, semelhante ao teste de ELISA V desenvolvido neste trabalho, foi menos sensível que dois testes de ELISA indireto duplo "sandwich", um deles incluindo ACm na captura e outro na detecção.

Este fato poderia ser explicado considerando que esses autores utilizaram como conjugado um ACm do isotipo G, enquanto que no teste de ELISA IV e V foi utilizado um ACm do isotipo M. A estrutura pentamérica da IgM, com peso molecular cinco vezes superior à IgG, ligaria mais moléculas de peroxidase durante o processo de conjugação, amplificando a reação durante a etapa de revelação. Além disto a IgM não necessariamente, saturaria todos seus paratopos na reação Ag-Ac, sendo isto mais fatível no caso da IgG, amplificando ainda mais essa reação-

Após a conjugação, o ACm2RVB perdeu significativamente seu título. Nas FIG. 6 e 7 pode se observar que, em ambos sistemas, o conjugado revelou a presença de vírus na amostra 301 (amostra fracamente positiva) em uma diluição até 1:2.000, sendo 1:1.000 considerada a diluição ótima para ser utilizada

rotineiramente nestes dois testes de ELISA.

Embora seja normal a perda de Igs durante o processo de conjugação, ainda com os soros policlonais, este fato pode se agravar no caso do ACm2RVB de isotipo IgM, macromolécula que além de apresentar uma maior fragilidade, tende normalmente a formar agregados, desvantagens próprias, deste tipo de Ig que devem ser consideradas no momento de sua manipulação.

O fato de ser ELISA V um teste direto, de fácil realização, que só inclui reativos homogêneos bem caracterizados, além de apresentar um alto grau de sensibilidade e especificidade, onde as reações positivas são intensas e bem definidas facilitando a leitura direta à simples vista, abre excelentes possibilidades para se incluir este teste no diagnóstico de rotina de RVB.

É interessante se destacar que o ACm2RVB apresenta a capacidade de reconhecer, em forma cruzada, o RV amostra SA-11 (origem de macaco). Esta amostra é comumente empregada na preparação de imun Soros e incluída como controle positivo nos testes imunoenzimáticos desenvolvidos para o diagnóstico de RV humana, portanto esta reatividade cruzada cria excelentes possibilidades para se analisar a eventual inclusão do ACm2RVB no teste de ELISA na identificação de RV humano e de outras espécies de mamíferos que, como já tem sido descrito por diferentes autores, compartilham determinantes antigênicos comuns de grupo (MC NULTY, 1978; MOHANTY, 1981).

Embora neste trabalho não tenha sido possível identificar o polipeptídeo reconhecido pelo ACm2RVB, estes resultados sugerem que reagiria com algum epítope localizado no VP6, onde se tem caracterizado os determinantes antigênicos comuns de grupo (TAB. I). Esta observação se apóia também no fato de que VP6 é o polipeptídeo que representa a maior parte da massa protéica total (60%) do vírus completo, explicando provavelmente, as reações pelas quais a maioria dos ACm obtidos pelos diferentes pesquisadores que trabalharam com RV, estão dirigidos contra essa proteína estrutural ou pelo menos quando

isto não tem sido confirmado, caracterizam-se por apresentar reatividade cruzada (BRESCKIN et alii, 1981; GARY et alii, 1982; ROSETO et alii, 1983; GREENBERG et alii, 1983a; GREENBERG et alii, 1983b; SONZA et alii, 1984; LAMBERT et alii, 1984; CRANAGE et alii, 1985).

Considerando a estrutura pentamérica do ACm2RVB, seria interessante se analisar no futuro a possibilidade de adaptar este ACm em um teste de aglutinação passiva, sensibilizando, eventualmente hemácias de carneiro ou partículas de látex, técnica que tem sido descrita com êxito utilizando ACm por CRANAGE et alii, 1985.

Finalmente o ACm2RVB apresentou características tais como, alto títulos, elevada afinidade, reatividade cruzada e boa adaptação no teste de ELISA nas funções de captura, detecção ou revelação. Além disso, o híbrido secretor apresentou ótimo crescimento "in vitro", com boa produção de tumor e líquido ascítico, oferecendo excelentes possibilidades para sua futura utilização no diagnóstico das rotaviroses.

6. CONCLUSÕES

Foram obtidos nove ACm com capacidade de reconhecer RVB, sendo três deles de isotipo G e seis de isotipo M.

Um deles, o ACm2RVB, apresentou título de até 1:1.000.000.

ACm2RVB mostrou-se efetivo como Ac de captura, detector e revelador em quatro variações diferentes do teste de ELISA.

Os cinco testes de ELISA desenvolvidos neste trabalho apresentaram uma sensibilidade e uma especificidade de 100%.

A inclusão do ACm2RVB nas diferentes variantes do teste imunoenzimático, aumentou a intensidade de cor desenvolvida durante a reação pelas amostras positivas, quando comparou-se com as obtidas no ELISA I policlonal.

As reações mais fortemente positivas foram obtidas no teste de ELISA V que utilizou exclusivamente ACm2RVB.

O reconhecimento de RV amostra SA-11 por ACm2RVB sugere a possibilidade de se utilizar, também, este ACm no diagnóstico de RV humano e, eventualmente, de outras espécies de mamíferos.

A reatividade cruzada apresentada pelo ACm2RVB sugere que este tenha reconhecido um epitopo localizado em VP6.

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AMATO, S.; SIMHON, A.; YOLKEN, R.H.; MATA, L. El ensayo inmunosorbente enzima-conjugada (ELISA) en el diagnóstico de rotavirus. *Revista Médica del Hospital Nacional de Niños Dr. Carlos Saenz Herrera, Costa Rica*, 2(2):73-78, 1977.
2. BABIUK, L.A.; MOHAMMED, K.; SPENCE, L.; FAUVEL, M.; PETRO, R. Rotavirus isolation and cultivation in the presence of trypsin. *Journal Clinical Microbiology*, Washington, 6: 610-617, 1977 apud SIMHON, A. Virología de los Rotavirus y epidemiología de la diarrea por Rotavirus. *Boletín de la Oficina Sanitaria Panamericana*, Washington, 98(4):295-308, 1985.
3. BARROS, H.M. *Mortalidade de bezerros Zebus: influência das precipitações pluviométricas*. Botucatu, Faculdade de Ciências Médicas e Biológicas de Botucatu, 1968. 25p. (Tese, Docência Livre).
4. BEARDS, G.M.; CAMPBELL, A.D.; COTTRELL, N.R.; PEIRIS, J.S. M.; REES, N.; SANDERS, R.C.; SHIRLEY, J.A.; WOOD, H. C.; FLEWETT, T.H. Enzyme-Linked Immunosorbent Assays Based on Polyclonal and Monoclonal Antibodies for Rotavirus Detection. *Journal of Clinical Microbiology*, Washington, 19 (2):248-254, 1984.

5. BISHOP, R.F.; DAVIDSON, G.P.; HOLMES, I.H.; RUCK, B.J. Virus particles in epithelial cells of duodenal mucosa from children with acute nonbacterial gastroenteritis. *Lancet*, London, 2:1497-1503, 1973 apud SIMHON, A. Virología de los rotavirus y epidemiología de la diarrea por rotavirus. *Boletín de la Oficina Sanitaria Panamericana*, Washington, 98(4):295-308, 1985.
6. BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, New York, 72(1-2):248-254, 1976.
7. BRIDGER, J.C.; PEDLEY, S.; McCRAE. Group C rotavirus in humans. *Journal of Clinical Microbiology*, Washington, 23(4):760-763, 1986.
8. BRESCHKIN, A.; SONZA, S.; HOLMES, I. The application of monoclonal antibodies to the studies of virus diarrhoeal diseases. In: SYMPOSIUM OF THE PROPERTIES OF THE MONOCLONAL ANTIBODIES PRODUCED BY TECHNOLOGY AND THEIR APPLICATION TO THE STUDY OF DISEASE, SINGAPORE, 1981. *Proceedings*. UNDP/WORLD BANK/WHO, Geneva, 1982, 151-157.
9. CARPIO, M.M.; BABIUK, L.A.; MISRA, V. & BLUMENTHAL, R. M. Bovine rotavirus-cell interactions: effect of virus infection on cellular integrity and macromolecular synthesis. *Virology*, New York, 114(1):86-97, 1981.
10. CENTRO PANAMERICANO DE ZONOSIS. Ramos Mejia. Diagnóstico da situação sanitária na sub-área de São Gonçalo do Sapucaí, Minas Gerais. In: CURSO DE PLANIFICACION EN SALUD ANIMAL, Buenos Aires, 1976. Relatório de participantes. Ramos Mejia, 1976 (mimeografiado).
11. COULSON, B.S.; FOWLER, K.J.; BISHOP, R.F.; COTTON, R.G.H. Neutralizing monoclonal antibodies to human rotavirus and indications of antigenic drift among strains from neonat

- tes. *Journal of Virology*, Washington, 54(1):14-20, 1985.
12. CRANAGE, M.P.; CAMPBELL, A.D.; VENTERS, J.I.; MAWSON, S.; COOMBS, R.R.A.; FLEWETT, H. Detection and quantitation of rotavirus using monoclonal antibody coupled red blood cells: comparison with ELISA. *Journal of Virological Methods*. Amsterdam, 11(2):273-287, 1985.
 13. CUKOR, G. & BLACKLOW, N.R. Human viral gastroenteritis. *Microbiological Reviews*, Washington, 48(2):157-179, 1984.
 14. DAVISON, G.P.; BISHOP, R.F.; TOWNLEY, R.R.; HOLMES, I.H.; RUCK, B.J. Importance of a new virus in acute sporadic enteritis in children. *Lancet*, London, 1:242-246, 1975a.
 15. DAVISON, G.P.; GOLLER, I.; BISHOP, R.F.; TOWNLEY, R.R.W.; HOLMES, I.H.; RUCK, B.J. Immunofluorescence in duodenal mucosa of children with acute enteritis due to a new virus. *Journal Clinical Pathology*, London, 28:263, 1975b apud AMATO, S.; SIMHON, A.; YOLKEN, R.H.; MATA, L. Ensayo inmunosorbente enzima-conjugada (ELISA) en el diagnóstico de rotavirus. *Revista Médica del Hospital Nacional de Niños Dr. Carlos Saenz Herrera*, Costa Rica, 2(2):73-78, 1977.
 16. DIMITROV, D.H.; GRAHAM, D.Y.; ESTES, M.K. Detection of rotaviruses by nucleic acid hybridization with cloned DNA of simian rotavirus SA-11 genes. *The Journal of Infectious Diseases*, Chicago, 152(2):293-300, 1985.
 17. DOERN, G.V.; HERRMANN, J.E.; HENDERSON, P.; STOBBS-WALRO, D.; PERRON, D.M.; BLACKLOW, N.R. Detection of rotavirus with a new polyclonal antibody enzyme immunoassay (Rota_zyme II) and a commercial Latex Agglutination Test (Rota_talex): comparison with a Monoclonal Antibody Enzyme Immunoassay. *Journal of Clinical Microbiology*, Washington, 23(2):226-9, 1986.

18. ELLENS, D.J. & DE LEEUW, P.W. Detection of infantile gastroenteritis virus (Rotavirus) by ELISA. *Lancet*, London, 1363-1364, 1977a apud ELLENS, D.J.; LEEUW, P.W.; STRAVER, P.J.; BALKEN, J.A.M. Comparison of five diagnostic methods for the detection of RV antigens in calf faeces. *Medical Microbiology and Immunology*, Heidelberg, 166 (1):157-163, 1978.
19. ELLENS, D.J. & DE LEEUW, P.W. Enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of rotavirus infections in calves. *Journal of Clinical Immunology*, Washington, 6(3):530-532, 1977b.
20. ELLENS, D.J.; LEEUW, P.W.; STRAVER, P.J.; BALKEN, J.A. M. Comparison of five diagnostic for the detection of RV antigens in calf faeces. *Medical Microbiology and Immunology*, Heidelberg, 166(1):157-163, 1978.
21. ENGVALL, E. & PERLMANN, Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochemistry*, Oxford, 8(9):871-874, 1971.
22. FAZEKAS DE ST. GROTH & SCHEIDEGGER. Production of Monoclonal Antibodies: strategy and tactics. *Journal of Immunological Methods*, Amsterdam, 35(1):1-21, 1980.
23. FERNELIUS, A.L.; RITCHIE, A.E.; CLASSICK, L.G.; NORMAN, J. O.; MEBUS, C.A. Cell culture adaptation and propagation of a reovirus-like agent of calf diarrhoea from a field outbreak in Nebraska. *Archiv für die Gesante Virusforschung*, Heidelberg, 37:114-130, 1972 apud MC NULTY, M.S. Rotaviruses. *Journal General Virology*, Colchester, 40(1): 1-18, 1978.
24. FIGUEIREDO, M.C.P. *Alguns aspectos da situação sanitária bovina do município de Uberaba, M.G.* Belo Horizonte, Escola de Veterinária da UFMG, 1979. 46p. (Tese, Mestre em Medicina Veterinária).

25. FLEWETT, T.H.; BRYDEN, A.S.; DAVIES, H. Virus particles in gastroenteritis. *Lancet*, 1497, 1973 apud MC NULTY, M.S. Rotaviruses. *Journal General Virology*, Colchester, 40(1):1-18, 1978.
26. FLEWETT, T.H. & WOODDE, G.N. The rotaviruses. *Archives of Virology*, Vienna, 57(1):1-23, 1978.
27. FLORES, J.; PURCELL, R.H.; PEREZ, I.; WYATT, R.G.; BOEGGMAN, E.; SERENO, M.; WHITE, L.; CHANOCK, R.M.; KAPIKIAN, Z. A. A dot hybridization assay for detection of rotavirus. *Lancet*, London, 555-559, 1983 apud CUKOR, G. & BACKLOW, N.R. Human viral gastroenteritis. *Microbiological Reviews*, Washington, 48(2):157-179, 1984.
28. GALFRE, G. & MILSTEIN, C. Preparation of monoclonal antibodies: strategies and procedures. In: SYMPOSIUM OF THE PROPERTIES OF THE MONOCLONAL ANTIBODIES PRODUCED BY TECHNOLOGY AND THEIR APPLICATION TO THE STUDY OF DISEASE. Singapore, 1981. Proceedings: Geneva, UNDP/WORLD BANK/WHO, 1982, 1-46.
29. GARY, G.W., RENEE BLACK, D.; PALMER, E. Monoclonal IgG to the inner capsid to human rotavirus. *Archives of Virology*, Vienna, 72(2):223-227, 1982.
30. GOMES, E.F.C. & CARNEIRO, J.J. *Subsídios para a programação do desenvolvimento da pecuária bovina mineira*. Belo Horizonte, Imprensa Oficial, 1977. 167p.
31. GRAUBALLE, P.C.; VESTERGAARD, B.F.; MEYLING, A.; GENNER, J. Optimized enzyme-linked immunosorbent assay for detection of human and bovine rotavirus in stools: comparison with electron-microscopy, immunoelectroosmosphoresis and fluorescent antibody techniques. *Journal of Medical Virology*, New York, 2(1):29-40, 1981.
32. GREENBERG, H.B.; VALDESUSO, J.; WYKE, K.; MIDTHUN, K.;

- WALSH, M.; MC AULIFFE, V.; WYATT, R.; KALICA, A.; FLORES, J.; HOSHINO, Y. Production and preliminary characterization of monoclonal antibodies directed at two surface proteins of rhesus rotavirus. *Journal of Virology*, Washington, 45(3):1143-1146, 1983a.
33. GREENBERG, H.; MC AULIFFE, V.; VALDESUSO, J.; WYATT, R.; FLORES, J.; KALICA, A.; HOSHINO, Y. Serological analysis of the sub-group protein of rotavirus, using monoclonal antibodies. *Infection and Immunity*, Washington, 39(1):91-99, 1983b.
34. HAIKALA, O.J.; KOKKONEN, J.O.; LEINONEN, M.K.; NURMI, T.; MANTYAJARVI, R.; CARKKINEN, H.K. Rapid detection of Rotavirus in stool by latex agglutination: comparison with radioimmunoassay and electron microscopy and clinical evaluation of the test. *Journal Medical Virology*, New York, 11(1):91-97, 1983.
35. HERRING, A.J.; INGLIS, N.F.; OJEH, C.K.; SNODGRASS, D.R.; MENZIES, J.D. Rapid diagnosis of Rotavirus infection by direct detection of viral nucleic acid in silver-stained polyacrylamide gels. *Journal of Clinical Microbiology*, Washington, 16(3):473-477, 1982.
36. HERRMANN, J.E.; BLACKLOW, N.R.; PERRON, D.M.; CUKOR, G.; KRAUSE, P.J.; HYAMS, J.S.; BARRETT, H.J.; OGRA, P.L. Enzyme immunoassay with monoclonal antibodies for the detection of Rotavirus in stool specimens. *The Journal of Infectious Diseases*, Chicago, 152(4):830-832, 1985.
37. HOLMES, I.H.; RUCK, B.J.; BISHOP, R.F.; DAVIDSON, G.P. Infantile enteritis viruses: morphogenesis and morphology. *Journal of Virology*, Washington, 16(3):937-943, 1975.
38. IMMUNOELECTROSMOPHORESIS (IEOP) for the detection of bovine rotavirus antigen in feces. In: LEEUW, P.W. & GUINEE, P.A.M., ed. Laboratory diagnosis in neonatal calf and

- pig diarrhoea. The Hague, Martinus Nijhoff, 1981. p.108-114 apud MC NULTY, M.S. The etiology, pathology and Epidemiology of viral gastroenteritis rotavirus infections in calves. *Annales de Recherches Veterinaires*, Versailles, 14 (4):427-432, 1983.
39. ISHIKAWA, E. & KATO, K. Ultrasensitive enzyme immunoassay. *Scandinavian Journal of Immunology*, Oxford, 8(7): 43-45, 1978.
40. KAPIKIAN, A.Z.; CLINE, W.L.; GREENBERG, H.B.; WYATT, R.G. ALICA, A.R.; BANKS, C.E.; JAMES, H.D.; FLORES, J.; CHANOCK, R.M. Antigenic characterization of human and animal rotaviruses by immune adherence hemagglutination assay (IAHA): evidence for distinctness of IAHA and neutralization antigens. *Infection and Immunity*, Washington, 33(1)214-425, 1981.
41. KAPIKIAN, A.Z.; CLINE, W.L.; MEBUS, C.A.; WYATT, R.G.; KALICA, H.D.; JAMES, H.D.; VANKIRK, D.; CHANOCK, R.M. New complement-fixation test for the human reovirus-like agent of infantile gastroenteritis. Nebraska calf diarrhea virus used as antigen. *Lancet*, London, 1:1056-1061, 1975 apud CUKOR, G. & BLACKLOW, N.R. Human viral gastroenteritis. *Microbiological Reviews*, Washington, 48(2)157-179, 1984.
42. KILLEN, H.M. & DIMMOCK, N.J. Identification of a neutralization-specific antigen of a calf rotavirus. *Journal General Virology*, Colchester, 62(2)297-311, 1982.
43. KNISLEY, C.V.; BEDNARZ-PRASHAD, A.J. PICKERING, L.K. Detection of rotavirus in stool specimens with monoclonal and polyclonal antibody-based assay systems. *Journal of Clinical Microbiology*, Washington, 23(5):897-900, 1986.
44. KOHLER, G. & MILSTEIN, C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Na-*

- ture, London, 256:495-497, 1975.
45. KRAFT, L.M. Observations on the control and natural history of epidemic diarrhea of infant mice (EDIM). *Yale Journal Biology and Medicine*, New Haven, 31:121-137, 1958 apud SIMHON, A. Virologia de los rotavirus y epidemiología de la diarrea por rotavirus. *Boletín de la Oficina Sanitaria Panamericana*, Washington, 98(4):295-308 1985.
 46. KURSTAK, E. Progress in enzyme immunoassays: production of reagents, experimental design, and interpretation. *Bulletin of the World Health Organization*, Geneva, 63(4):793-811, 1985.
 47. LAMBERT, J.P.; MARBEHANT, P.; MARISSENS, D.; ZISSIS, G. Monoclonal antibodies directed against different antigenic determinants of rotavirus. *Journal of Virology*, Washington, 51(1):47-51, 1984.
 48. LAZDINS, I.; SONZA, S.; DYALL-SMITH, M.L.; COULSON, B.S.; HOLMES, I.H. Demonstration of an immunodominant neutralization site by analysis of antigenic variants of SA-11 rotavirus. *Journal of Virology*, Washington, 56(1):317-319, 1985.
 49. MATTA, H. Influência da variação estacional na criabilidade de bezerros mestiços leiteiros. *Pesquisa Agropecuária Brasileira Serie Zootecnia*, Rio de Janeiro, 8(2):39-42, 1973.
 50. MC NULTY, M.S. Rotaviruses. *Journal General Virology*, Colchester, 40(1):1-18, 1978.
 51. MC NULTY, M.S. The etiology, pathology and epidemiology of viral gastroenteritis-rotavirus infections in calves. *Annales Recherches Veterinaires*, Versailles, 14(4):427-432, 1983.

52. MEBUS, C.A.; UNDERDAH, N.R.; RHODES, M.B.; TWIEHAUS, M.J. *Calf diarrhea (scours): reproduced with a virus from a field outbreak*. s.l., Nebraska, Agric. Exp. Sta., 1969. 16p. (Res. Bull. 233).
53. MEBUS, C.A.; STAIR, E.L.; UNDERDHAL, N.R.; TWIEHAUS, M.J. Pathology of neonatal calf diarrhea induced by a reo-like agent. *Veterinary Pathology*, Washington, 8(5-6): 490-505, 1971.
54. MEBUS, C.A. & NEWMAN, L.E. Scanning electron, light, and immunofluorescent microscopy of gnotobiotic calf infected with reovirus-like agent. *American Journal of Veterinary Research*, Schaumburg, 38(5):553-558, 1977.
55. MILSTEIN, C. Monoclonal antibodies. *Scientific American*. New York, 243(4):56-64, 1980.
56. MOHANTY, S.B. *Veterinary Virology. Genus Rotavirus*. Philadelphia, Lea & Febiger, 1981, p.134-136.
57. NOVO, E. & ESPARZA, L. Composition and topography of structural polypeptides of bovine rotavirus. *Journal General Virology*, Colchester, 56(2):325-335, 1981.
58. OJEH, C.K. Evidence for serotypic variation among bovine rotavirus. *Archives of Virology*, Vienna, 79(3-4): 1984.
59. OLIVEIRA FILHO, E.B. Apreciação preliminar da situação da pecuária leiteira em cinco localidades dos Estados de São Paulo e Minas Gerais. *Arquivos da Escola de Veterinária UFMG*. Belo Horizonte, 25(2):157-168, 1973.
60. ORGANIZACION MUNDIAL DE LA SALUD, Ginebra. *Técnicas rápidas para el diagnóstico de infecciones víricas*. Informe de un Grupo Científico de La OMS. Serie de informes técnicos 661, 1981.

61. PEREIRA, H.G.; LEITE, J.P.G.; AZEREDO, R.S.; FARIAS, V.; SUTMOLLER, F. An atypical rotavirus detected in child with gastroenteritis in Rio de Janeiro, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz Rio de Janeiro*, Rio de Janeiro, 78:245-250, 1983.
62. PESCE, A.J.; FORD, D.J.; GAIZUTIS, M.A. Qualitative and quantitative aspects of immunoassays. *Scandinavian Journal of Immunology. Supplement*, Oxford, 7(8):1-6, 1978.
63. RED DE COOPERACION DE LABORATORIOS VETERINARIOS DE DIAGNOSTICO. Montevideo. *Diarreas neonatales bovinas; manual de técnicas para la caracterización de agentes infecciosos*. s.l., FAO-Oficina Regional para América Latina Y el Caribe, 1985. 75p.
64. ROSETO, A. Isolation and characterization of anti-rotavirus immunoglobulins secreted by cloned hybridoma cell lines. *Journal General Virology*, Colchester, 64(1):237-240, 1983.
65. ROY, J.H. Factors affecting susceptibility of calves to disease. *Journal of Dairy Science*, Champaign, 63(4):650-664, 1980.
66. SABARA, M.; GILCHRIST, J.E.; HUDSON, G.R.; BABIUK, L. A. Preliminary characterization of an epitope involved in neutralization and cell attachment that is located on the major bovine rotavirus glycoprotein. *Journal of Virology*, Washington, 53(1):58-66, 1985.
67. SATO, K.; INABA, Y.; SHINOSAKI, T.; FUJII, R.; MATUMOTO, M. Isolation of human rotavirus in cell cultures: brief report. *Archives of Virology*, Vienna, 69(2):155-160, 1981.
68. SCHERRER, R. & BERNARD, S. Application d'une technique immunoenzymologique (ELISA) à la détection du rotavirus

- bovin et des anti-corps dirigés contre lui. *Annales de Microbiologie*, A, Paris, 128(4):499-510, 1977.
69. SHAW, R.D.; STONER, D.L.; ESTES, M.K.; GREENBERG, H. B. Specific enzyme-linked immunoassay for rotavirus serotypes 1 and 3. *Journal of Clinical Microbiology*, Washington, 22(2):286-291, 1985.
70. SHULMAN, M.; WILDE, C.D.; KÖLLER, G. A better cell line for making hibridomas secreting specific antibodies. *Nature*, London, 276:269-270, 1978.
71. SIMHON, A.; AMATO, S.; HERNANDEZ, F.; YOLKEN, R.H.; MATA, L. Diagnóstico de rotavirus por microscopia electrónica y el ensayo inmunsorbente enzima conjugada (ELISA). *Boletín de la Oficina Sanitaria Panamericana*, Washington, 86(5):391-399, 1979.
72. SIMHON, A. Virología de los rotavirus y epidemiología de la diarrea por rotavirus. *Boletín de la Oficina Sanitaria Panamericana*, Washington, 98(4):295-308, 1985.
73. SKAUG, K.; FIGENSCHAUD, K.J.; OSTRAVIK, I. Rotavirus staphylococcal co-agglutination test. *Acta of Pathology, Microbiology and Immunology. Scandinavica Section B*, Copenhagen, 91:175-178, 1983, apud CUKOR, G.; BLACKLOW, N. R. Human viral gastroenteritis. *Microbiological Reviews*, Washington, 48(2):157-179, 1984.
74. SONZA, S.; BRESCHKIN, A.; HOLMES, I. Derivation of neutralizing monoclonal antibodies against rotavirus. *Journal of Virology*, Washington, 45(3):1143-1146, 1983.
75. SONZA, S.; BRESCHKIN, A.; HOLMES, I. The major surface glycoprotein of simian rotavirus (SA-11) contains distinct epitopes. *Virology*, New York, 134(2):318-327, 1984.
76. SPENCE, L.; FAUVEL, M.; PETRO, R.; BLOCH, S. Haemaggluti

- nin from rotavirus. *Lancet*, London, 123, 1976 apud FLEWETT, T.H. & WOODE, G.N. The rotaviruses. *Archives of Virology*, Vienna, 57(1):1-23, 1978.
77. TANIGUCHI, K.; URASAWA, S.; URASAWA, T. Preparation and characterization of neutralizing monoclonal antibodies with different reativity patterns to human rotaviruses. *Journal General Virology*, Colchester, 66(4):1045-1053, 1985.
78. THOULESS, M.E. BEARDS, G.M.; FLEWETT, T.H. Serotyping and subgrouping of rotavirus strains by the ELISA test. *Archives of Virology*, Vienna, 73(5):219-230, 1982.
79. THOULESS, M.E.; DIGIACOMO, R.F.; NEUMAN, D.S. Isolation of two lapine rotaviruses: characterization of their subgroup, serotype and RNA electropherotypes. *Archives of Virology*, Vienna, 89(1/4):161-170, 1986.
80. TZIPORI, S. The aetiology and diagnosis of calf diarrhoea. *The Veterinary Record*, London, 108(24):510-514, 1981.
81. VOLLER, A.; BIDWELL, D.E.; HULDT, G.; ENGVALL, E. *Bulletin of World Health Organization*, Geneva, 51:209, 1974, apud VOLLER, A.; BIDWELL, D.E.; BARTLETT, A. Enzyme-linked immunosorbent assay. In: ROSE, N.R. & FRIDMAN, H. *Manual of Clinical Immunology*, 2.ed. Washington, American Society fo Microbiology, 1980, p. 358-371.
82. VOLLER, A.; BIDWELL, D.E.; BARTLETT, A. Enzyme-linked immunosorbent assay. In: ROSE, N.R. & FRIDMAN, H. *Manual of Clinical Immunology*, 2.ed., Washington, American Society for Microbiology, 1980, p.358-371.
83. WHITE, L.; PEREZ, I.; PEREZ, M.; URBINA, G.; GREENBERG, H.; KAPIKIAN, A.; FLORES, J. Relative frequency of rotavivurs subgroups 1 and 2 in venezuelan children with gastroenteritis as assay with monoclonal antibodies. *Journal of Clinical Microbiology*, Washington, 19(4):516-520 1984.

84. WILSON, M.B. & NAKANE, P.K. Developments in the periodate method of conjugating horseradish peroxidase to antibodies. In: KNAPP, W. *Immunofluorescence and related techniques*. Amsterdam, Elsevier apud VOLLER, A.; BIDWELL, D.E.; BARTLETT, A. Enzyme-linked immunosorbent assay. In: ROSE, N.R. & FRIDMAN, H. *Manual of Clinical Immunology*. 2.ed., Washington, American Society for Microbiology, 1980. p.358-371.
85. WORLD HEALTH ORGANIZATION. Ginebra. *Rotavirus and other viral diarrhoeas*. Washington, 1979. p.1-20.
86. WOODE, G.N. Epizootiology of bovine rotavirus infection. *Veterinary Record*, London, 103(3):44-46, 1978.
87. YOLKEN, R.H.; KIM, H.W.; CLEM, T.; WYATT, R.G.; KALICA, A. R.; CHANOCK, R.M.; KAPIKIAN, Z.A. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for detection of human reovirus-like immunosorbent assay. *Lancet*, London, 263-269, 1977a apud MC NULTY, M.S. Rotaviruses. *Journal General Virology*, Colchester, 40(1):1-18, 1978.
88. YOLKEN, R.H.; WYATT, R.G.; KAPIKIAN, A.Z. ELISA for rotavirus (letter) *Lancet*, London, 819, 1977b apud CUKOR, G. & BLACKLOW, N.R. Human viral gastroenteritis. *Microbiological Reviews*, Washington, 48(2):157-179, 1984.
89. YOLKEN, R.H.; STOPA, P.J. & HARRIS, C.C. Enzyme immunoassay for the detection of rotavirus antigen and antibody In: ROSE, N.R. & FRIDMAN, H. *Manual of Clinical Immunology*, 2.ed., Washington, American Society for Microbiology, 1980, p.692-699.
90. ZORATTI, A. Etiología vírica de la diarrea neonatal del ternero. *Revista de Medicina Veterinaria*. Buenos Aires, 60(6):362-370, 1979.