



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA



Dissertação de mestrado

**CARACTERIZAÇÃO DE ANTICORPOS MONOCLONAIS
CONTRA ROTAVÍRUS BOVINO E SUAS APLICAÇÕES COMO
FERRAMENTA DE DIAGNÓSTICO**

Patrícia Araújo Beck

Salvador – Bahia – Brasil

2005

UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA

Dissertação de mestrado

**CARACTERIZAÇÃO DE ANTICORPOS MONOCLONAIS CONTRA
ROTAVÍRUS BOVINO E SUAS APLICAÇÕES COMO FERRAMENTA DE
DIAGNÓSTICO**

PATRÍCIA ARAÚJO BECK

Orientadora: Silvia Inês Sardi

Co-orientador: Gúbio Soares Campos

**Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-graduação em Imunologia do Instituto de
Ciências da Saúde, da Universidade Federal
da Bahia, como requisito para obtenção do
grau de Mestre em Imunologia.**

Salvador – Bahia – Brasil

2005

Biblioteca Prof. Penildon Silva - ICS - UFBA

B393 Beck, Patrícia Araújo,

Caracterização de anticorpos monoclonais contra Rotavirus bovino e suas aplicações como ferramenta de diagnóstico / Patrícia Araújo Beck.

- Salvador, 2005.

67 f. : il.

Orientadora: Profa. Dra. Sílvia Inês Sardi.

Co-orientador: Prof. Dr. Gúbio Soares Campos.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal da Bahia, Instituto de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Imunologia, 2005.

1. Anticorpos monoclonais. 2. Rotavirus bovino. I. Sardi, Sílvia Inês.
II. Campos, Gúbio Soares. III. Universidade Federal da Bahia. Instituto de Ciências da Saúde. IV. Título.

CDU: 578.823

CARACTERIZAÇÃO DE ANTICORPOS MONOCLONAIS CONTRA ROTAVÍRUS
BOVINO E SUAS APLICAÇÕES COMO FERRAMENTA DE DIAGNÓSTICO.

PATRÍCIA ARAÚJO BECK

FOLHA DE APROVAÇÃO

COMISSÃO EXAMINADORA

Dra. Maria Luiza Brito de Souza Atta
Faculdade de Farmácia - UFBA

Dr. Paulo Henrique Palis Aguiar
Escola de Veterinária - UFBA

Dra. Silvia Inês Sardi
ICS-UFBA

Dedico esta dissertação à Minha Mãe, Zenira Araújo, pela demonstração de amor, carinho, apoio e paciência em todos os passos da minha caminhada e sem os quais eu não teria chegado até aqui.

AGRADECIMENTOS

A **Deus** por todas as bênçãos derramadas sobre minha vida.

À Dra. **Silvia Sardi**, pelos ensinamentos compartilhados e pelo apoio e dedicação, não apenas como minha orientadora, mas também como amiga e conselheira.

Ao Dr. **Gúbio** responsável pelo começo de tudo.

A todos os amigos do Laboratório de Virologia-ICS-UFBA, especialmente a **Camila**, pela sua colaboração, esforço, otimismo e paciência.

A meu noivo, **Flávio Oliveira**, pelo carinho e compreensão demonstrados sempre.

À **Dilcéia**, secretária do PPGIm, por toda ajuda oferecida quando solicitada.

Aos meus colegas do mestrado, especialmente a **Ana Luiza**, pela cumplicidade e amizade, para que juntos conseguíssemos ultrapassar mais esta etapa.

À Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Imunologia (PPGIm).

Ao CNPQ

A todos os professores do PPGIm e da UFBA, principalmente a **Ivana, Robert e Silvia Costa**.

À Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ) e a todos os seus integrantes, particularmente, a Dr. **Marcos Vannier e Cláudio Pereira** que muito contribuíram com este trabalho.

A **Você** que, mesmo não tendo sido mencionado, de alguma maneira tornou esse trabalho possível.

“Embora ninguém possa voltar atrás e fazer um novo começo, qualquer um pode começar agora e fazer um novo fim”.

Chico Xavier

RESUMO

CARACTERIZAÇÃO DE ANTICORPOS MONOCLONAIS CONTRA ROTAVÍRUS BOVINO E SUAS APLICAÇÕES COMO FERRAMENTA DE DIAGNÓSTICO. [PATRÍCIA ARAÚJO BECK]. O Rotavírus, pertencente à família *Reoviridae*, é o maior agente etiológico de diarreias agudas em bovinos. O vírus é não envelopado, de simetria icosaédrica e possui capsídeo duplo constituído pelas proteínas estruturais VP1, 2, 3, 4, 6 e 7. O objetivo deste trabalho foi a caracterização dos anticorpos monoclonais (AcM) produzidos contra Rotavírus bovino para sua aplicação como ferramenta de diagnóstico, utilizando as técnicas de Isotipificação, *Dot-blot*, *Western-blot*, Imunofluorescência indireta (IFI) e ensaio imunoenzimático (ELISA). A caracterização imunoquímica demonstrou que todos os AcM (1G5, 4F7, 1E12, 4F3 e 3C12) foram do isotipo IgG2a, com cadeia leve κ . Através da técnica de *Dot-blot*, os AcM 1G5, 4F7, 1E12, 4F3 detectaram antígenos do Rotavírus e apenas dois AcM (1E12 e 4F3) reconheceram proteínas virais pela técnica de *Western-blot*. Os cinco AcM reagiram positivamente na técnica de IFI e, também, foram capazes de detectar antígeno viral nas amostras fecais, pela técnica de ELISA de captura. Desta forma, foi possível identificar dois grupos de AcM: um formado pelo 4F7, 1E12 e 1G5 que tiveram resultados animadores para seu uso na detecção de antígeno viral em fezes, e outro pelos AcM 4F3 e 3C12, que podem ser usados para detectar antígeno viral em culturas de células através de IFI. Portanto, a caracterização imunoquímica dos AcM mostra o seu possível uso como ferramenta no diagnóstico das rotaviroses em bovinos.

Palavras-chave: Anticorpos monoclonais, Rotavírus e Caracterização

ABSTRACT

CHARACTERIZATION OF MONOCLONAL ANTIBODIES AGAINST BOVINE ROTAVIRUS AND THEIR DIAGNOSTIC APPLICATIONS. [PATRÍCIA ARAÚJO BECK]. Rotavirus, a member of the *Reoviridae* family, is the most important etiologic agent of diarrheas in bovine. Complete particules measure 70 nm in diameter, are nonenveloped and have a distinctive double-layered icosahedral protein capsid that consists of an outer and an inner layer. Within the inner capsid is a third layer, the core, that contains the virus genome consisting of 11 segments of double-strand RNA. The genome codes structural proteins VP1, 2, 3, 4, 6 e 7. The objective of this study was the characterization of monoclonal antibodies (MAbs) and the use of these MAbs as diagnosis tools by Isotyping, Dot-blot, Western-blot, Immunofluorescence and ELISA techniques. The immunochemistry characterization showed that all were isotype IgG2a with a kappa light chain. The *Dot-blot* immunoassay showed that the MAbs 1G5, 4F7, 1E12, 4F3 detected viral antigens and only two MAbs (1E12 e 4F3) recognized viral proteins by Western-blot. The five MAbs reacted positively to indirect immunofluorescence (IFI) and all MAbs can detect rotavirus antigen in fecal samples by indirect ELISA. We identified two groups of Mabs: one with 4F7, 1E12 e 1G5 showing stimulant results by use detect rotavirus antigen in fecal samples and other with 4F3 e 3C12 by use detected Rotavirus antigens in cell culture by IFI. The results obtained discuss the potential use of these MAbs as diagnosis tools in diarrheas by Rotavirus in bovines.

Key Words: Monoclonal Antibodies, Rotavirus, Characterization.

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1 – Representação esquemática dos 11 segmentos genômicos do Rotavírus codificando proteínas estruturais e não-estruturais..... | 17 |
| Figura 2A – Perfil eletroforético das proteínas do Rotavírus | 33 |
| Figura 2B – Microscopia eletrônica por contrastação negativa do Rotavírus bovino ultracentrifugado | 33 |
| Figura 3 – Perfil eletroforético do RNA de Rotavírus extraído em suspensão de fezes..... | 34 |
| Figura 4 – Dot-blot. Avaliação da capacidade dos AcM em detectar RTV bovino..... | 42 |
| Figura 5 – Western-blot. Identificação de proteínas do Rotavírus bovino (RVB-P) por anticorpo monoclonal e policlonal..... | 43 |
| Figura 6A – Imunofluorescência indireta (IFI)..... | 45 |
| Figura 6B – Imunofluorescência indireta (IFI)..... | 46 |
| Figura 7 – Inibição da Hemaglutinação (IHA)..... | 48 |
| Figura 8 – ELISA de captura | 51 |
| Figura 9 – Dot-blot..... | 52 |

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Perfil imunológico dos AcM contra Rotavírus bovino.....44

Tabela 2 – Reatividade dos AcM contra Rotavírus bovino.....50

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | |
|------|--|
| AcM | Anticorpo Monoclonal |
| AS | Ácido Siálico |
| BSA | Soro Albumina Bovina |
| CD | do inglês, Clusters of differentiation |
| CTLs | Linfócitos T Citotóxicos |

| | |
|----------|--|
| DAB | Diaminobenzidina |
| DICT | Dose Infecciosa em Cultivo de Tecidos |
| DLP | Partícula com Duplo Capsídeo |
| DO | Densidade ótica |
| EDTA | Ácido Etilenodiaminotetracético |
| EIA | Ensaio Imunoenzimático |
| ELISA | do inglês, Enzyme-Linked Immunosorbent Assay |
| FITC | Isotiocianato de Fluoresceína |
| HA | Hemaglutinação |
| IFI | Imunofluorescência Indireta |
| IgA | Imunoglobulina A |
| IgG | Imunoglobulina G |
| IgM | Imunoglobulina M |
| IHA | Inibição da Hemaglutinação |
| kDa | Kilodalton |
| mA | miliAmpere |
| MEM-E | Meio Essencial Mínimo-Eagle |
| MHC | Complexo de Histocompatibilidade Principal |
| NSP | Proteína Não Estrutural |
| NT | Neutralização |
| PAGE | Eletroforese em Gel de Poliacrilamida |
| PBS | Tampão Salina Fosfato |
| PBS-T | Tampão Salina Fosfato-Tween |
| PEG | Polietilenoglicol |
| RER | Retículo Endoplasmático Rugoso |
| RNA | Ácido Ribonucléico |
| RNA f.d. | Ácido Ribonucléico de fita dupla |
| RNA m. | Ácido Ribonucléico mensageiro |
| RTV | Rotavírus |
| RVB-P | Proteína do Rotavírus Bovino |
| SDS | Dodecil Sulfato de Sódio |
| SFB | Soro fetal Bovino |
| Th | Linfócito T Auxiliar |

| | |
|-----|-----------------------------|
| TMB | 3,3,5,5 Tetrametilbenzidina |
| UHA | Unidade Hemaglutinante |
| VP | Proteína Viral |
| WB | Western-Blot |

SUMÁRIO

| | |
|--|----|
| 1. INTRODUÇÃO | 15 |
| 2. REVISÃO DE LITERATURA | 16 |
| 2.1 AGENTE ETIOLÓGICO | 16 |
| 2.1.1 Características Morfológicas | 16 |

| | |
|---|-----------|
| 2.1.2 Classificação | 18 |
| 2.1.3 Ciclo de Replicação Viral | 18 |
| 2.2 ENTRADA DO VÍRUS E MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS..... | 20 |
| 2.3 RESPOSTA IMUNOLÓGICA..... | 21 |
| 2.4 ANTICORPOS MONOCLONAIS | 23 |
| 2.4.1 Definição | 23 |
| 2.4.2 Anticorpos Policlonais versus AcM..... | 24 |
| 2.4.3 Caracterização de AcM: Propriedades..... | 24 |
| 2.4.4 Aplicações dos AcM | 25 |
| 2.4.5 Aplicações no Estudo do Rotavírus..... | 26 |
| 3.OBJETIVO GERAL | 28 |
| 3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS..... | 28 |
| 3.1.1 Caracterização imunológica dos AcM | 28 |
| 3.1.2 Aplicação dos AcM em testes diagnósticos | 28 |
| 4. MATERIAIS E MÉTODOS | 29 |
| 4.1 CULTIVOS CELULARES | 29 |
| 4.2 VÍRUS | 29 |
| 4.2.1 Produção do vírus | 29 |
| 4.2.2 Titulação do vírus | 30 |
| 4.2.3 Concentração do vírus | 30 |
| 4.2.4 Dosagem Protéica Viral | 31 |
| 4.2.5 Padrão eletroforético das proteínas virais | 31 |
| 4.2.6 Microscopia eletrônica por contrastação negativa | 32 |
| 4.2.7 Padrão eletroforético do RNA viral | 32 |
| 4.3 CARACTERIZAÇÃO IMUNOQUÍMICA DOS AcM | 35 |
| 4.3.1 Isotipificação | 35 |
| 4.3.2 Detecção do RTV em diferentes concentrações: <i>Dot-blot</i> | 36 |
| 4.3.3 Caracterização das proteínas virais: <i>Western-blot</i> | 36 |
| 4.3.4 Avaliação dos AcM na detecção do Rotavírus bovino em cultura de células: Imunofluorescência indireta (IFI) | 37 |
| 4.3.5 Avaliação da Capacidade Neutralizante | 38 |
| 4.3.6 Avaliação da Capacidade de Inibição da Hemaglutinação | 38 |
| 4.4 APLICAÇÃO DOS AcM EM TESTES DIAGNÓSTICO..... | 39 |
| 4.4.1 ELISA de captura | 39 |
| 4.4.2 <i>Dot-blot</i> | 40 |
| 5. RESULTADOS | 41 |
| 5.1 CARACTERIZAÇÃO IMUNOQUÍMICA DOS AcM..... | 41 |
| 5.1.1 Isotipificação | 41 |
| 5.1.2 <i>Dot-blot</i> | 41 |
| 5.1.3 <i>Western-blot</i> | 41 |
| 5.1.4 Imunofluorescência indireta (IFI)..... | 44 |
| 5.1.5 Atividade Neutralizante | 47 |
| 5.1.6 Inibição da Hemaglutinação (IHA) | 47 |
| 5.2 APLICAÇÃO DOS AcM EM TESTES DIAGNÓSTICO | 49 |

| | |
|---|----|
| 5.2.1 ELISA de captura | 49 |
| 5.2.2 <i>Dot-blot</i> | 52 |
| 6. DISCUSSÃO | 53 |
| 7. CONCLUSÕES | 57 |
| ESTUDOS FUTUROS | 58 |
| REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 59 |

1. INTRODUÇÃO

Rotavírus tem sido identificado como o maior agente etiológico de gastroenterite viral aguda em animais jovens de uma variedade de espécies, incluindo a humana (McCRAE *et al.*, 1982; GREENBERG *et al.*, 1983).

Em bezerros, as diarreias constituem um importante problema mundial e o Rotavírus é um dos mais frequentes patógenos envolvidos na doença (BRITO *et al.*, 2000). A diarreia causada pelo Rotavírus é, muitas vezes, mais grave do que aquelas provocadas por outras viroses, provocando consideráveis prejuízos econômicos. Um estudo sobre o impacto das infecções entéricas na população bovina, no Brasil, concluiu que leva a um prejuízo anual de aproximadamente 100 milhões de dólares (SILVA *et al.*, 2001). O prejuízo econômico é devido ao atraso no crescimento, tempo e peso inadequado ao abate e, em alguns casos, até a morte dos animais infectados.

As manifestações clínicas da enfermidade não são suficientemente distintas para permitir o diagnóstico. Por isso, o diagnóstico requer detecção do vírus ou antígeno viral (KAPIKIAN; CHANOCK, 1996).

O anticorpo monoclonal tornou-se um componente chave para testes diagnósticos clínico laboratorial. Sua ampla aplicação em detecção e identificação de analitos séricos, células marcadas, e agentes patogênicos deve-se em grande parte a especificidade requintada desses reagentes (NELSON *et al.*, 2000).

Neste trabalho, foi realizada a caracterização de anticorpos monoclonais contra Rotavírus bovino, produzidos no Laboratório de Virologia, ICS-UFBA e avaliada sua aplicação como ferramenta de diagnóstico.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 AGENTE ETIOLÓGICO

2.1.1 Características Morfológicas

Os Rotavírus pertencem a família *Reoviridae*, gênero *Rotavirus*. O vírion mede, aproximadamente, 70 nm de diâmetro, de simetria icosaédrica, não envelopado, com

seis proteínas organizadas em três camadas concêntricas distintas contendo um genoma de 11 segmentos de RNA de fita dupla (LUDERT *et al.*, 2002).

O segmento de RNA 1, 2, e 3 codifica proteínas virais (VPs) do core ou cerne (camada protéica mais interna do vírion), designadas VP1 (125 kDa), VP2 (94 kDa) e VP3 (88 kDa), ao passo que o segmento 6 codifica a maior proteína da camada intermediária, o capsídeo interno VP6 (41kDa) e os segmentos 4 e 9 codificam para proteínas do capsídeo externo VP4 (88 kDa) e VP7 (37 kDa) , respectivamente. Entretanto, os segmentos 5, 7, 8, 10 e 11 codificam as seis proteínas não estruturais (NSPs), designadas NSP1 a NSP6 (Figura 1) (KAPIKIAN; CHANOCK, 1996).

No Rotavírus, o capsídeo externo é composto por 780 cópias da glicoproteína VP7 organizadas em 260 trímeros e, 120 cópias da proteína VP4 que forma as 60 espículas virais (JAYARAM *et al.*, 2004). Ambas induzem, independentemente, a formação de anticorpos neutralizantes (CHEN *et al.*, 1992; SANTOS *et al.*, 2002).

A proteína VP4 é clivada especificamente pela enzima proteolítica tripsina, para formar produtos de clivagem designados VP5*(60 kDa) e VP8*(28 kDa) que permanecem associados ao vírion (KAPIKIAN; CHANOCK, 1996).

Esta clivagem proteolítica da VP4 potencializa a infectividade, facilitando a penetração do vírus na célula. VP4 está implicada não somente na ligação e penetração à célula mas também, a diversas outras funções biológicas como atividade hemaglutinante e virulência. O peptídeo VP5* contém sítios responsáveis pela reatividade cruzada entre diferentes tipos de VP4 e, possivelmente, possui os epítomos responsáveis pela adsorção do vírus à célula, ao passo que o peptídeo VP8* possui o maior sítio antigênico para especificidade de sorotipo (KAPIKIAN; CHANOCK, 1996).

A proteína VP6 contém o maior antígeno de subgrupo, assim como, o antígeno que atua como o principal determinante da reatividade de grupo (SANTOS *et al.*, 2002).

Das proteínas não estruturais, NSP4 (28kDa) tem menção especial, por funcionar como um receptor intracelular para partículas virais imaturas e participar na montagem do vírus, além de ser definida como uma enterotoxina, induzindo diarreia. (KATYAL *et al.*, 2000; MORI *et al.*, 2002).

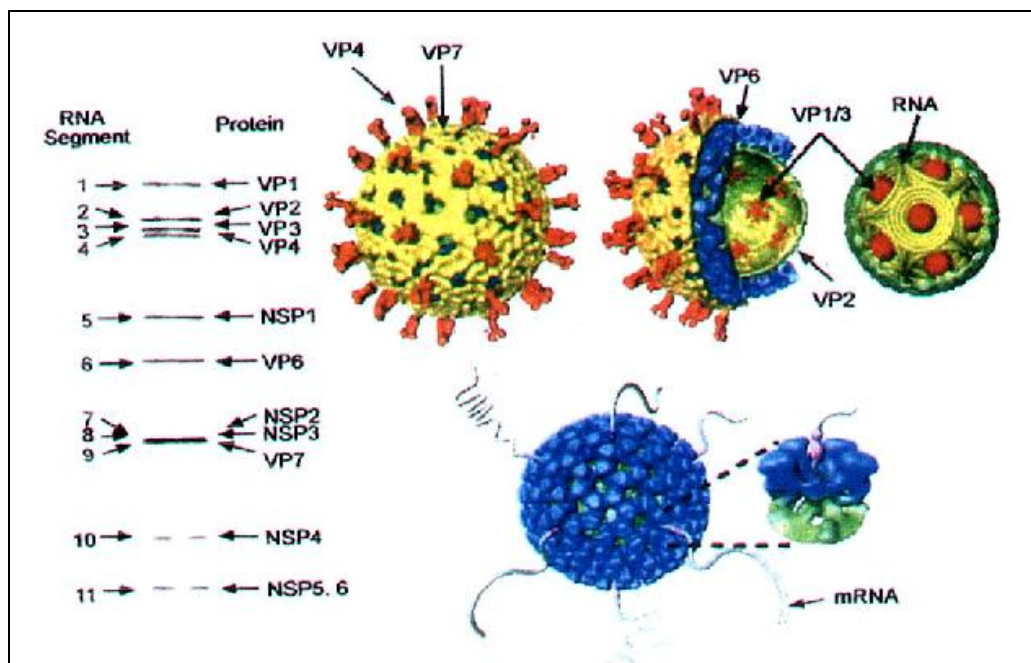


Figura 1 - Representação esquemática dos 11 segmentos genômicos do Rotavírus codificando proteínas estruturais e não-estruturais (JAYARAM *et al.*, 2004).

2.1.2 Classificação

Os Rotavírus são classificados sorologicamente em grupos e subgrupos baseados em determinantes antigênicos da proteína VP6. Até o momento foram descritos 7 grupos, denominados de A a G (SANTOS, GOUVEA, 1997), sendo o grupo A a causa mais comum de diarreia neonatal em animais e humanos (LU *et al.*, 1995).

Os vírus do grupo A são classificados em 4 subgrupos: I, II, I e II, não I-não II e em sorotipos (determinados por reações sorológicas) e/ou genotipos (determinados por análise do ácido nucléico). Os sorotipos foram definidos com base nas proteínas do capsídeo externo VP7 (denominados G, por se tratar de uma glicoproteína) e VP4 (denominados P, devido a sua sensibilidade à proteólise) (SANTOS, GOUVEA, 1997). Até o momento foram descritos 14 sorotipos e genotipos G, 12 sorotipos e 20 genotipos P (KAPIKIAN; CHANOCK, 1996).

Tipos G e P específicos têm sido associados com espécies de animais. Por exemplo, Rotavírus bovino geralmente pertence aos tipos G 6, 8 e 10 e tipo P [1], [5] ou [11] (EL-ATTAR *et al.*, 2002).

2.1.3 Ciclo de Replicação Viral

O receptor celular para os Rotavírus ainda não é conhecido (ESTES, 2001). Estudos recentes têm mostrado que a entrada do Rotavírus na célula hospedeira é um processo de múltiplas etapas envolvendo ácido siálico (AS) (N-acetil-neuramínico) e integrinas ($\alpha v\beta 3$, $\alpha 4\beta 1$, $\alpha 2\beta 1$) presentes nas membranas celulares. Porém, o envolvimento do AS não é uma etapa essencial para todas as cepas do Rotavírus (JAYARAM *et al.*, 2004), uma vez que a maior parte dos Rotavírus animais e humanos são AS independente (CIARLET *et al.*, 2002). Com isso, é sugerido que existam pelo menos dois tipos de receptores: o AS e os glicoconjugados (gangliosídeos, glicolipídio neutro, glicoproteína) (ISÃ *et al.*, 2004).

Após a adsorção, o vírus é internalizado. Os Rotavírus penetram nas células por meio de processos que provavelmente requerem VP4 (através do peptídeo VP5*) e VP7 para otimizar a ligação. A ligação inicial é dependente de sódio e ocorre no pH entre 5,5 e 8,0 (ESTES, 2001; MENDEZ *et al.*, 1999).

As partículas são internalizadas em 60 a 90 minutos por um mecanismo ainda controverso. Estudos com microscopia eletrônica propõem dois mecanismos: endocitose ou penetração direta do vírus através da membrana. Outros estudos demonstram que o desnudamento deve ocorrer pelo efeito das enzimas lisossomais (SANTOS *et al.*, 2002).

A transcrição do genoma acontece dentro de partículas com duplo capsídeo (DLPs). A integridade estrutural da DLP, que é composta das proteínas virais VP1, VP2, VP3 e VP6, é essencial para a transcrição (PRASAD *et al.*, 1996). A síntese do RNA mensageiro (RNAm) é mediada pela proteína VP1, uma RNA polimerase RNA-dependente viral endógena e requer a atividade de uma helicase para desnaturação do RNA e de uma guanililtransferase (VP3) para o capeamento do RNAm (ESTES, 2001).

O exato sítio de transcrição dentro do citoplasma não tem sido precisamente localizado (ESTES, 2001). As fitas de RNAm formadas serão traduzida em proteínas ou servirão como molde para a síntese do RNA fita dupla (RNA f.d.) que irá formar o genoma da progênie viral (SANTOS *et al.*, 2002).

A replicação é um processo assimétrico e semiconservativo. As fitas de polaridade positiva servem de molde para a produção da fita negativa e a fita molde permanece ligada à fita nascente, formando a dupla fita (SANTOS *et al.*, 2002).

A maioria das proteínas estruturais e não-estruturais do Rotavírus são sintetizadas nos ribossomos livres, em contraste a glicoproteína VP7 e NSP4 são sintetizadas nos ribossomos associados com a membrana do retículo endoplasmático rugoso (RER), onde são processadas e inseridas na membrana. A NSP5 é sintetizada nos ribossomos livres e glicosilada no RER. O processamento dessas proteínas acontece exclusivamente no RER, não sendo transportadas para o complexo de Golgi (ESTES, 2001).

O processo de montagem do vírus ocorre de forma coordenada com a replicação. Ele ocorre no citoplasma, inicialmente dentro de estruturas denominadas viroplasmas e,

posteriormente, a partícula sofre maturação dentro do RER, num processo dependente da concentração elevada de íons cálcio (Ca^{++}) para estabilização das proteínas do capsídeo externo (ESTES, 2001).

O ciclo infeccioso termina quando a progênie do vírus é liberada pela lise da célula hospedeira (ESTES, 2001).

2.2 ENTRADA DO VÍRUS E MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS

O vírus penetra no organismo por via oral-fecal e o período de incubação da doença é de, aproximadamente, 48 horas.

O Rotavírus tem tropismo pelas células altamente diferenciadas, apicais, do epitélio das vilosidades do intestino delgado, principalmente as do jejuno e íleo. A replicação viral provoca um processo descamativo destas células, levando à diminuição da capacidade absorptiva do intestino (SANTOS; GOUVEA, 1997).

Estudos de amostras de biópsias do intestino delgado de lactentes e de animais infectados experimentalmente mostram a ocorrência de encurtamento e atrofia das microvilosidades, infiltração de células mononucleares na lâmina própria, distensão da cisterna do retículo endoplasmático, aumento do tamanho e escassez mitocondrial. (KAPIKIAN; CHANOCK, 1996).

O mecanismo pelo qual o Rotavírus causa diarreia não está bem elucidado. O mecanismo clássico proposto sustenta que, face à extensa lesão epitelial, desencadeiam-se fenômenos de má absorção que se exacerbam devido ao sensível declínio no nível das dissacaridasas. O acúmulo de dissacarídeos no lúmen intestinal, por conseguinte, precipitaria quadro diarreico de natureza essencialmente osmótica. Entretanto, experimentos recentes, utilizando-se modelos murinos, demonstraram que a proteína viral NSP4 reserva um caráter enterotoxigênico, induzindo fenômenos secretórios que

culminam com a diarreia (OLIVEIRA; LINHARES, 1999; LUNDGREN *et al.*, 2000; MORI *et al.*, 2002).

Os principais achados clínicos consistem em anorexia, prostração, depressão e vômitos, seguidos por diarreia que varia de aquosa a cremosa. Como consequência da diarreia, há desidratação e perda de peso. A mortalidade dos animais infectados depende da severidade do quadro de diarreia e do grau de desidratação (ANKE, 1989). A morte desses animais pode ocorrer, de 3 a 7 dias após o início da diarreia (COLUCHI; KROEFF, 2000).

2.3 RESPOSTA IMUNOLÓGICA

Os mecanismos imunes responsáveis pela resolução da infecção e proteção contra subseqüentes rotavirose não são bem compreendidos. Correlação entre proteção e títulos de anticorpos contra Rotavírus no soro e intestino têm sido reportado (KAPIKIAN *et al.*, 1983; CHIBA *et al.*, 1986), mas essa correlação não tem sido consistentemente observada (WARD; BERSTEEN, 1995).

Nos sítios de replicação, os Rotavírus são processados pelas células apresentadoras de antígeno e apresentados aos linfócitos T auxiliares (Th) e linfócitos T citotóxicos (CTLs). Posteriormente, os linfócitos Th vírus-específicos, dentro do intestino, liberam fatores de crescimento e diferenciação dos linfócitos B, e surgem anticorpos IgM e IgA específicos contra Rotavírus na superfície da mucosa intestinal. Coincidindo com o aparecimento de linfócitos T e B específicos na circulação, anticorpos IgM e IgA específicos também aparecem no soro 4 a 6 dias após infecção (KATYAL *et al.*, 2000).

Estudos realizados por McNEAL *et al.* (1995) sugeriram três mecanismos de imunidade ao Rotavírus. O primeiro mecanismo parece ser através da atividade da

célula B, presumivelmente por meio de anticorpo. Esse efector foi demonstrado ser necessário para a resolução normal da infecção inicial em camundongos μ Mt (linhagem de camundongos deficiente em células B) e como protetor contra reinfecções em camundongos J_HD (uma segunda linhagem de camundongo nocaute). O mecanismo de proteção por anticorpo não têm sido determinado, mas não deve ser através de neutralização clássica. Diversos estudos têm mostrado forte correlação entre proteção *in vivo* e resposta de anticorpos IgA intestinal e sérico (RUGGERI *et al*, 1998). A resposta imune típica se traduz inicialmente em termos de imunoglobulina M (IgM) específica, sucedendo-se a produção dos anticorpos das classes IgG e IgA. Conquanto seja questionável o papel protetor da imunidade humoral nesse contexto, são múltiplos os estudos associando a IgA secretora à redução na incidência e na gravidade das infecções por esses agentes virais (OLIVEIRA, LINHARES, 1999).

Uma segunda função efetora identificada nesses estudos foi, provavelmente, devido a atividade dos CTLs, que desempenham uma das ações primárias das células CD8+, cuja importância é demonstrada na resposta imune contra muitas infecções virais. Embora, a produção de células CD8+ de memória devam durar por toda a vida, células efectoras têm vida curta, e desse modo considera-se esta associação com a resolução da infecção inicial, mas falta associação com a proteção contra reinfecção. Segundo OLDHAM *et al.* (1993), a população de células CD8+ está envolvida na limitação da infecção primária por Rotavírus.

Células T CD8+ têm sido postulado mediar *in vivo*, efeito antiviral por lise direta das células do hospedeiro infectadas por vírus ou pela liberação de citocinas que induzem um efeito antiviral (FRANCO *et al.*, 1997).

Finalmente, quando anticorpos não estão presentes e células CD8+ foram destruídas, outra função efetora parece atuar, pelo menos na resolução da infecção. Esta

se deve à atividade das células *natural killer*, que têm sido reportadas com papel protetor em outras infecções virais (McNEAL *et al.*, 1995).

Mecanismos envolvendo a liberação de citocinas como Interferon-gama (IFN- γ) e Fator de Necrose Tumoral-alfa (TNF- α) também têm atividade antiviral direta (RAMSEY *et al.*, 1993).

2.4 ANTICORPOS MONOCLONAIS

2.4.1 Definição

Anticorpos monoclonais (AcM) são anticorpos de especificidade única, derivados de um único clone de células B e que respondem a um único epítipo.

A tecnologia da produção de AcM foi desenvolvida em 1975, por Georges Köhler e Cesar Milstein tornando-se, rapidamente, uma das ferramentas chave da imunologia. Em essência, a técnica envolve a fusão celular de linfócitos B, que tem a propriedade de produzir anticorpos específicos, mas que vivem poucos dias em culturas *in vitro*, com uma célula de mieloma que tem a propriedade da imortalidade. O produto dessa união é uma célula, denominada hibridoma, que pode secretar anticorpos da especificidade desejada e pode viver por tempo ilimitado (KÖHLER; MISTEIN, 1975).

A cultura contínua de hibridomas para produção de AcM oferece como vantagens um suplemento inesgotável de imunoglobulinas com altos títulos, alta reprodutibilidade e evita o aparecimento de reações cruzadas. Consequentemente, o AcM permite o desenvolvimento de sistemas imunoensaios padronizados e seguros. Logo, AcM servem como poderosas ferramentas para a investigação de macromoléculas e células, e têm provido reagentes efetivos em termos de especificidade para testes diagnósticos clínicos (NELSON *et al.*, 2000).

2.4.2 Anticorpos policlonais versus AcM

Os anticorpos policlonais detectam uma multiplicidade de epítomos e, portanto, reconhece antígenos diferentes, importante, por exemplo, em testes onde multivalência é essencial (imunoprecipitação). Em adição, reagentes policlonais são relativamente simples e baratos de produzir quando comparados com reagentes monoclonais. Além disso, o uso de animais como cavalo, cabra e coelho permite a recuperação de grandes volumes de soro rico em imunoglobulinas. Contudo, existem diferenças na reatividade e títulos dos anticorpos, e sofrem, geralmente, de uma falta de reprodutibilidade, devido a heterogeneidade dos anticorpos (NELSON *et al.*, 2000).

2.4.3 Caracterização de AcM: Propriedades

A caracterização de um AcM promove a análise do anticorpo produzido pelo hibridoma, em termos de reatividade e especificidade. Para tanto, é essencial a reclonagem dos hibridomas para evitar dados ambíguos, resultando em anticorpos de diferentes classes, especificidade e afinidade (NELSON *et al.*, 2000).

Um aspecto crucial da caracterização relaciona o perfil do AcM para diferentes tipos de ensaios. Isso é especialmente pertinente para o potencial do anticorpo como reagente diagnóstico, já que alguns AcM reagem bem em alguns sistemas mas não em outros. Esse fenômeno, chamado de restrição de ensaio, define como um anticorpo reconhece um epítomo alvo no contexto do tipo de ensaio usado, por que os epítomos poderão ser desnaturados ou tornar-se inacessível. Desta forma, é importante testar o AcM contra um amplo painel de antígenos ou preparações tissulares, em diferentes ensaios imunoquímicos (NELSON *et al.*, 2000).

É notável que, embora um hibridoma seja o produto da fusão de uma única célula B e produza um AcM de excelente especificidade, esse mesmo anticorpo pode ter

reação cruzada com outros antígenos ou exibir dupla especificidade. Isto pode ser devido ao reconhecimento de sítios combinados mais do que um determinante antigênico, por alguma similaridade na forma ou composição química. Conseqüentemente, uma rigorosa avaliação de um dado AcM e seus epítomos alvo se faz necessária (NELSON *et al.*, 2000).

2.4.4 Aplicações dos AcM

Os AcM são muito úteis como reagentes imunobiológicos. Algumas das suas aplicações incluem:

a) Imunodiagnóstico: O diagnóstico de muitas doenças infecciosas e sistêmicas baseia-se na detecção de antígenos e/ou de anticorpos particulares na circulação ou nos tecidos (COOK; SELF 1995).

b) Diagnóstico e tratamento de tumores: A produção de AcM contra proteínas presentes na membrana de células tumorais, permite sua utilização para detectar a presença dessas células em um tecido ou órgão ou para elimina-las (COLFOR; HALL, 1995)

c) Identificação de marcadores fenotípicos únicos para tipos celulares em particular: A base da classificação moderna dos linfócitos e de outros leucócitos é a ligação da população específica de AcM. Esses têm sido usados para definir “clusters de diferenciação” (marcadores CD) para os vários tipos celulares (NELSON *et al.*, 2000).

d) Análise funcional de moléculas de superfície celular e secretadas: Na pesquisa imunológica, os AcM que se ligam a moléculas de superfície celular e estimulam ou inibem funções celulares são instrumentos inestimáveis para definir as funções das moléculas de superfície, incluindo os receptores de antígenos (ABBAS *et al.*, 2002).

e) Outros: Cromatografia de afinidade baseada em AcM podem ser usadas como uma etapa na purificação de espécies moleculares que são difíceis para purificação química. Purificação com colunas de AcM têm sido aplicadas com sucesso para antígenos do MHC (complexo de histocompatibilidade principal) (GOLDSBY *et al.*, 2002).

2.4.5 Aplicações no Estudo do Rotavírus

O desenvolvimento de técnicas empregando-se AcM pode ser um dos passos essenciais para a elucidação de pontos, ainda obscuros, na morfologia, ciclo de replicação, imunidade, diagnóstico e prevenção ao Rotavírus (ESTES, 2001).

AcM produzidos contra antígenos virais específicos, têm sido usados extensivamente para definir a estrutura, função dos componentes virais e as interações entre proteínas virais e células hospedeiras. Além disso, AcM podem formar a base de ensaios para o diagnóstico de doenças virais (MCKEATING *et al.*, 1999).

No estudo do Rotavírus os AcM têm sido empregados exhaustivamente. RUGGERI e GREENBERG (1991) identificaram modelos distintos de neutralização quando compararam a atividade neutralizante de um painel de AcM dirigidos contra VP4 e VP7. LOPEZ *et al.* (2000), utilizaram AcM dirigidos contra células MA-104, para identificar moléculas de superfície celular envolvidas no processo de entrada do Rotavírus na célula, e em ensaios imunoenzimáticos (EIA) BIRCH *et al.* (1988), desenvolveram um EIA capaz de sorotipar Rotavírus humano em extratos fecais, permitindo estudos epidemiológicos e AL-YOUSIF *et al.* (2000) mostraram as aplicações diagnósticas de AcM contra Rotavírus bovino. Portanto, os AcM podem ser ferramentas importantes no diagnóstico de doenças e, por isto, nosso trabalho visa a caracterização dos AcM produzidos contra Rotavírus bovino, com o intuito de usá-los na detecção desta virose bovina.

3. OBJETIVO GERAL

Este trabalho teve como objetivo geral a caracterização de anticorpos monoclonais contra Rotavírus bovino e a avaliação do seu uso como ferramenta no diagnóstico da doença em bovinos.

3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

3.1.1 Caracterização imunoquímica dos AcM:

- Isotipificação das imunoglobulinas;
- Avaliação da capacidade dos AcM em detectar antígeno viral por *Dot-blot*;
- Caracterização das proteínas virais reconhecidas pelos AcM por *Western-blot*;
- Avaliação dos AcM na detecção do Rotavírus bovino em cultura de células através de Imunofluorescência indireta (IFI);
- Avaliação da capacidade neutralizante viral;
- Avaliação da capacidade de inibição da hemaglutinação;

3.1.2 Aplicação dos AcM em testes diagnósticos:

- Capacidade dos AcM para detectar antígeno viral, em amostras de fezes, utilizando os testes de ELISA de captura e *Dot-blot*.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 CULTIVOS CELULARES

Os ensaios para a multiplicação e produção do Rotavírus bovino foram realizados em monocamadas confluentes de células de rim de macaco, denominadas MA-104.

Estas células foram adquiridas do Banco de Células da Faculdade de Bioquímica da Universidade Federal do Rio de Janeiro.

Para a multiplicação das células da linhagem MA-104, utilizamos garrafas tipo Roux, mantendo as células em Meio Essencial Mínimo-Eagle (GIBCO) suplementado com 10% de soro bovino (GIBCO). Para o repique da cultura celular, foi utilizada a técnica de desagregação enzimática com tripsina 0,25% (BLAKE; STACEY, 1999).

4.2 VÍRUS

Neste trabalho foi utilizada a cepa de referência Nebraska (Sorogrupo A, sorotipo G6) do Rotavírus bovino, obtido do National Veterinary Services Laboratories (NVSL / USA).

4.2.1. Produção do Vírus

A produção do Rotavírus bovino cepa Nebraska foi realizada em monocamadas confluentes de células MA-104. As células eram lavadas com PBS para remoção do soro bovino e, após a ativação do vírus por 30 minutos a 37°C com tripsina (20 µg/ml de meio), seguia-se a adsorção viral durante 1 hora a 37°C, a uma multiplicidade de infecção (MOI) de 0,6.

Logo após o período de adsorção viral a monocamada infectada era incubada a 37°C com Meio Essencial Mínimo-Eagle (MEM-E) contendo tripsina 2µg/ml, até a produção do efeito citopático total (desprendimento da monocamada de células infectadas), geralmente 24 a 48h. Posteriormente, as garrafas foram submetidas a um ciclo de congelamento (-20°C) e descongelamento, e o sobrenadante e as células infectadas foram centrifugados a 10000g, durante 30 minutos a 4°C. O sobrenadante foi coletado e armazenado (-20°C) até seu posterior uso.

4.2.2. Titulação do Vírus

A titulação do vírus infeccioso, obtido como descrito no item anterior, se realizou por observação do efeito citopático em monocamadas de células MA-104 cultivadas em microplacas de 96 poços (NUNC). A monocamada foi infectada com diluições logarítmicas (fator 10) do vírus em quadruplicata (0,1 ml) e incubada a 37°C em estufa com atmosfera de 5% de CO₂. A leitura do título do vírus foi realizada após 72 horas, observando-se o efeito citopático e calculando-se o título infeccioso em DICT₅₀/ml (Dose Infecciosa em Cultivo de Tecidos) segundo o método de REED; MUENCH (1938). O título infeccioso do vírus foi de 10^{5,48} DICT₅₀/ml.

4.2.3. Concentração do Vírus

Ao sobrenadante do vírus, obtido segundo o item 4.2.1, foi adicionado Polietilenoglicol 8000 (PEG, Sigma) numa concentração de 8% e Cloreto de Sódio a 2,3% (NaCl, Sigma), sob agitação constante a 4°C durante toda a noite. Esse material foi centrifugado a 10000 g durante 30 minutos a 4°C. O sobrenadante foi desprezado e o vírus sedimentado ressuspense em 100X do volume inicial em solução NET (Tris HCl 50mM, EDTA 1mM e Cloreto de Sódio 100mM), centrifugado novamente durante 20 minutos a 5000 g e o novo sobrenadante foi coletado e congelado a -20°C para posterior ultracentrifugação.

O volume viral obtido na fase de concentração (100X) foi submetido a uma ultracentrifugação (140000g) em 55 Ti (Beckman), por 2 horas e 30 minutos, a 4°C. O pellet obtido foi ressuspense em 10X do volume inicial em solução NET.

4.2.4. Dosagem Protéica Viral

A dosagem de proteína foi estimada utilizando um kit comercial baseado no método de Lowry (BIO-RAD) seguindo as indicações do fabricante.

4.2.5 Padrão eletroforético das proteínas virais

As amostras de vírus ultracentrifugado (Materiais e métodos 4.2.3) foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida a 7,5% na presença de SDS (SDS-PAGE) (LAEMMLI, 1970). Inicialmente as amostras foram diluídas (1:4) em tampão desnaturizante de Laemmli (62,5 mM Tris-HCL, pH 6,8; SDS 2%; β -Mercaptoetanol 5%; glicerol 20%; azul de bromofenol 0,5%) e levadas a 100°C durante 3 minutos em banho-maria. A corrida eletroforética das proteínas virais se realizou durante 3 horas a 100 volts.

Foram colocados aproximadamente 50 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ de proteína viral por poço e usou-se como padrão de peso molecular proteínas de diferentes pesos moleculares (AMERSHAM PHARMACIA BIOTECH): Fosforilase B (97 kDa), Albumina Sérica Bovina (66 kDa), Ovalbumina (45 kDa), Anidrase Carbônica (30 kDa), Inibidor de Tripsina de Soja (20 kDa) e α -Lactalbumina (14 kDa). Os pesos moleculares das proteínas virais foram calculados usando-se o RF (Distância em centímetros de migração da proteína a partir do gel de corrida / distância da migração do corante *Coomassie blue* a partir do gel de corrida) (Figura 2-A).

4.2.6 Microscopia Eletrônica por Contrastação Negativa

O vírus ultracentrifugado foi fixado com glutaraldeído a 5% e tampão cocodilato de sódio 0,1M (1:2). Esta suspensão foi colocada numa grade de níquel por 10 min e, após remoção do excesso com papel de filtro, adicionou-se acetato de uranila (AU) a

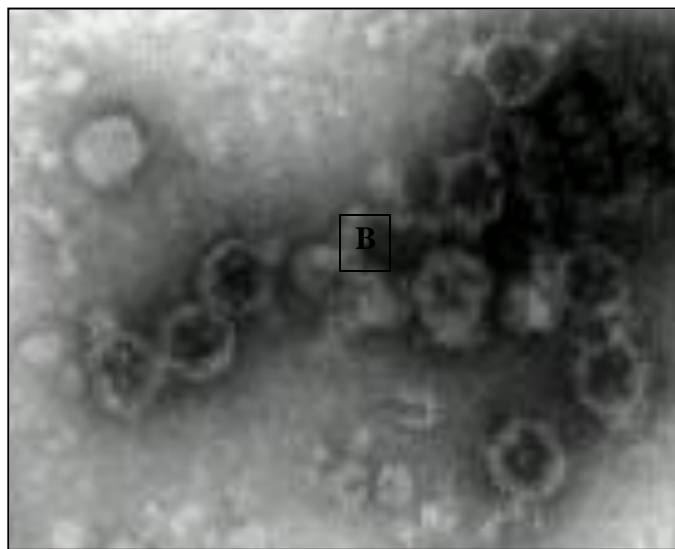
1% por 10 s (NAKATA *et al.*, 1987). A grade foi observada ao Microscópio eletrônico de transmissão (ZEISS EM-109) e fotografada (Figura 2-B).

4.2.7 Padrão eletroforético do RNA viral

A técnica de SDS-PAGE tem sido identificada como método de referência para identificação e caracterização molecular dos rotavírus (HERRING *et al.*, 1982).

Para extração do RNA viral utilizou-se o método Fenol-Clorofórmio (Promega Corporation, Madison, EUA). Primeiro, as fezes foram diluídas em solução salina tamponada (PBS) 20% (v/v) e centrifugadas a 3000 g durante 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi tratado com solução de SDS 10% e uma solução de ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) 100mM e aquecido a 56°C durante 20 minutos. Em seguida, foi adicionado Fenol-Clorofórmio em um volume igual ao do sobrenadante das fezes tratadas e este material foi centrifugado a 12000 g durante 10 minutos a 4°C, sendo coletado a fração aquosa. A este sobrenadante foram adicionados 100µl de Acetato de Sódio 3M e 1 ml de etanol a 95%, sendo deixado a -20°C por toda noite, para precipitação do RNA. Posteriormente, foi centrifugado a 12000 g por 15 minutos a 4°C, descartado o sobrenadante, e o precipitado foi ressuspenso em 16µl do tampão desnaturizante de Laemmli. O RNA extraído foi submetido à técnica de SDS-PAGE a 7,5% e, posteriormente, submetido a uma coloração com uma solução de Nitrato de Prata 7mM, para visualizar as bandas correspondentes aos segmentos de RNA viral (Figura 3).

A



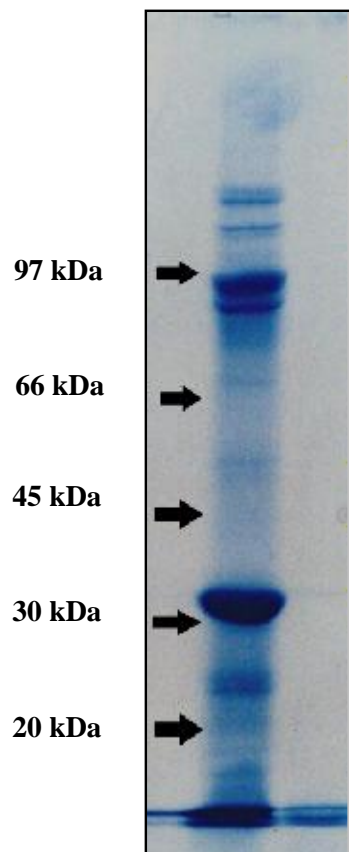


Figura 2:

A: Perfil eletroforético das proteínas do Rotavírus. Eletroforese em gel de poliacrilamida 7,5% na presença de SDS (SDS-PAGE) das proteínas de RTV bovino e coloração de Coomassie blue. As proteínas virais foram obtidas a partir do vírus concentrado e ultracentrifugado. Os pesos moleculares estão indicados a esquerda.

B: Microscopia Eletrônica por contrastação negativa do Rotavírus bovino ultracentrifugado. O vírus fixado foi colocado numa grade de níquel por 10 min e, após remoção do excesso com papel de filtro, adicionou-se acetato de uranila (AU) a 1% por 10 s. A grade foi observada ao microscópio eletrônico de transmissão e fotografada.

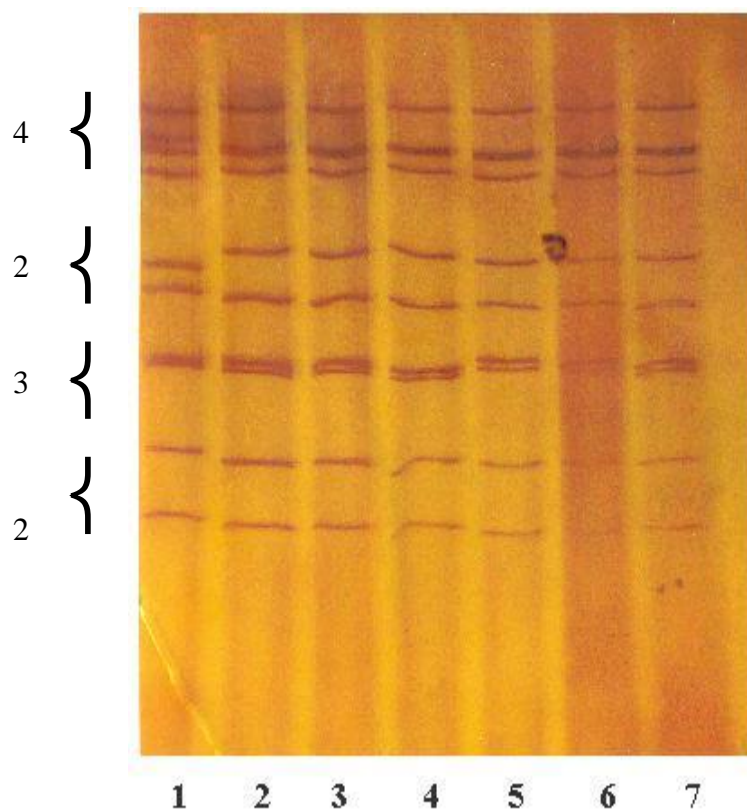


Figura 3 – Perfil eletroforético do RNA de Rotavírus extraído de suspensão de fezes. Eletroforese em Gel de Poliacrilamida a 7,5% na presença de SDS (SDS-PAGE) do RNA viral em isolados de amostras fecais. Coluna 1, fezes humana; 2-7, fezes bovinas. Observa-se a presença dos 11 segmentos genômicos de RNA f.d.

4.3 CARACTERIZAÇÃO IMUNOQUÍMICA DOS AcM

Foram utilizados neste trabalho, 05 (cinco) AcM produzidos no Laboratório de Virologia, ICS-UFBA Os AcM empregados foram: 1G5, 4F7, 1E12, 4F3 e 3C12 sob as formas de sobrenadante de cultura de células hibridomas e líquido ascítico (FONTES, 2003).

4.3.1 Isotipificação

Para determinar a classe de imunoglobulina presente nos sobrenadantes dos clones produtores de AcM e no líquido ascítico, utilizou-se um kit comercial (BIO RAD Catalog 172-2055), baseado na técnica de ELISA indireto.

A placa de 96 poços (NUNC-MAXISORP TM) foi sensibilizada com vírus ultracentrifugado 1:100 (v/v, PBS) e incubada por 1h a 25°C. Em seguida, a placa foi lavada com PBS-Tween 20 (PBS-T) e bloqueada com uma solução de soroalbumina bovina em PBS (BSA-PBS) a 1% por 30 min. A lavagem foi repetida e adicionou-se os sobrenadantes (1:100) e os líquidos ascíticos (1:1000) diluídos previamente em PBS-T. Incubou-se por 1h a 25°C, lavou-se novamente e, posteriormente, adicionou-se anticorpo de coelho anti-camundongo com diferentes padrões de imunoglobulinas (IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3, IgA e IgM, cadeia leve κ e λ). Incubou-se por mais 1h a 25°C e acrescentou-se anticorpo de cabra anti-coelho marcado com peroxidase 1:3000 (v/v, PBS-T). Após incubação de 1h a 25°C, a lavagem foi repetida e a reação revelada com uma solução de fosfato dissódico 0,2M, ácido cítrico 1M e uma pastilha de TMB (3,3,5,5-tetrametilbenzidina – SIGMA CHEMICAL CO), na presença de 0,015% (v/v) de peróxido de hidrogênio por 15 min a 25°C em ausência de luz e lida em um espectrofotômetro (Microplate Reader BIO-RAD Model 550) a 630 nm.

4.3.2 Detecção do RTV em diferentes concentrações: Dot-blot

A sensibilidade de detecção do Rotavírus pelos AcM foi determinada através de *Dot-blot*. Adicionou-se vírus ultracentrifugado (Materiais e métodos 4.2.3) à uma membrana de nitrocelulose (AMERSHAM PHARMACIA BIOTECH 0,45µm), em diluições seriadas, com concentração protéica variando de 0,1 a 3,8 µg, utilizando-se o Multifiltro *Dot-blot*. Cortou-se a membrana longitudinalmente, em fitas com aproximadamente 5 mm de largura, e bloqueou-se, para evitar sítios livres de reação, com uma solução de PBS com 5% de leite em pó desnatado (PBS-Leite 5%) por 1 h a temperatura ambiente, sob agitação. Em seguida, colocou-se as fitas em sacos plásticos selados, adicionou-se individualmente sobrenadante dos AcM 1:5 (v/v, PBS-Leite 0,5%), e deixou-se por toda noite. No dia seguinte, lavou-se as fitas 3 vezes com PBS-T 0,05% e adicionou-se anticorpo de ovelha anti-IgG de camundongo 1:500 (v/v, PBS) marcado com peroxidase (SIGMA CHEMICAL CO), incubou-se por 1h a 37°C. Lavou-se as fitas 3 vezes com PBS-T 0,05%. A revelação da reação foi realizada com uma solução de DAB (3,3'- Diaminobenzidina – SIGMA CHEMICAL CO) na presença de 0,015 % (v/v) de peróxido de hidrogênio. A reação foi interrompida com sucessivas lavagens em PBS e as membranas foram secas e fotografadas.

4.3.3 Caracterização das proteínas virais: Western-blot

A reatividade dos AcM com proteínas virais foi determinada através de *Western-blot*. As proteínas do RTV bovino ultracentrifugado (Materiais e métodos 4.2.3) diluídas em tampão desnaturizante de Laemmli ou em tampão não-desnaturizante (62,5 mM Tris-HCL, pH 6,8; glicerol 20%; azul de bromofenol 0,5%) fracionadas por SDS-PAGE a 7,5%, foram eletrotransferidas a uma membrana de nitrocelulose (AMERSHAM PHARMACIA BIOTECH 0,45µm), por 1h a 100 mA. A verificação da eletrotransferência e identificação das proteínas virais se realizaram com a técnica de

coloração de vermelho de *Ponceau* 10%. Uma vez constatada a transferência, a membrana de nitrocelulose foi descorada, cortada longitudinalmente e bloqueada (Materiais e métodos 4.3.2). Posteriormente as fitas foram incubadas com soro hiperimune de coelho ou camundongo 1:500 (v/v, PBS-L 0,5%) (FONTES, 2003) ou líquido ascítico dos AcM 1:5 (v/v, PBS-L 0,5%), durante toda a noite. Ao fim deste tempo, foram lavadas com PBS-T 0,05% (10 minutos cada lavado) e incubadas durante 1 hora a 37°C, com um anticorpo de ovelha anti-IgG de camundongo ou de cabra anti-coelho conjugado à peroxidase 1:500 (v/v, PBS) (SIGMA CHEMICAL CO)). Em seguida, foram feitas lavagens com PBS-T 0,05%. A revelação das bandas foi realizada com uma solução de DAB como mencionado anteriormente (Materiais e métodos 4.3.2).

4.3.4 Avaliação dos AcM na detecção do Rotavírus bovino em cultura de células: Imunofluorescência indireta (IFI)

Lamínulas com cultura de células MA-104, cultivadas em tubos, foram infectadas com Rotavírus bovino (Materiais e métodos 4.2.1). As lamínulas contendo as células infectadas foram retiradas da estufa em tempos diversos (3h, 5h, 7h e 24h) pós-infecção, juntamente com respectivo controle de células não-infectadas. As lamínulas foram fixadas em acetona por 10min a -20°C. A cada conjunto de lamínulas, adicionou-se sobrenadante de clones produtores de AcM puro ou soro hiperimune de camundongo 1:500 (v/v, PBS) (FONTES, 2003). Incubou-se por 1h a 37°C, lavou-se com PBS e adicionou-se anticorpo de ovelha anti-camundongo 1:30 (v/v, PBS) marcado com FITC (isotiocianato de fluoresceína –SIGMA CHEMICAL CO). Incubou-se por 1h a 37°C e ao fim deste tempo repetiu-se as lavagens. As lamínulas foram lavadas com uma solução de azul de Evans (0,1%) durante 3 min e montadas em lâminas com glicerina,

observadas em microscópio de fluorescência (ZEISS AXIOLAB HBO 50) e fotografadas.

4.3.5 Avaliação da Capacidade Neutralizante

As amostras de líquido ascítico foram diluídas seriadamente 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64 (v/v, meio MEM-E com tripisina 2µg/ml) e misturadas, em volumes iguais, com 100 DICT₅₀ /ml de Rotavírus ativado (Ver Materiais e métodos 4.2.1). Posteriormente, foram incubadas durante 1h e 30 min a 37°C e , em seguida, 30 min a 4°C. Uma alíquota da mistura AcM-Rotavírus (100µl) foi inoculada em monocamadas de células MA-104 em microplaca de 96 poços e monocamadas em lamínulas. Incubou-se, finalmente, durante 96 horas a 37°C e 5% de CO₂. O resultado foi expresso como positivo ou negativo segundo a capacidade do AcM de neutralizar 100 DICT₅₀/ml de RTV em 50% dos poços inoculados (REED; MUENCH, 1938). As lamínulas foram fixadas em acetona por 10 min para posterior realização de IFI.

4.3.6 Avaliação da Capacidade de Inibição da Hemaglutinação

Teste de hemaglutinação (HA) e inibição da hemaglutinação (IHA) foram realizados em microplacas de fundo “U” (NUNC). Utilizou-se, para tanto, PBS (pH 7,2) contendo 0.1% de soroalbumina bovina (BSA-PBS), como diluente e hemáceas humanas grupo O numa suspensão a 0,5% (INABA *et al.*, 1977; FAUVEL *et al.*, 1978; HOSHINO *et al.*, 1983).

- Hemaglutinação (HA): Em uma placa, colocou-se 50 µl da suspensão de vírus (Materiais e métodos 4.2.1) e realizou-se diluições seriadas base dupla. Posteriormente, acrescentou-se 50 µl da suspensão de hemáceas e incubou-se por

1 h a 37°C. O título HA foi expresso como inverso da maior diluição do vírus com completa hemaglutinação.

- Inibição da Hemaglutinação (IHA): Para o teste de IHA, 200 µl de soro hiperimune de coelho foi inativado a 56°C por 30 min.

Numa placa colocou-se, individualmente, 25 µl de sobrenadante de clones produtores de AcM 1:5 (v/v, BSA-PBS) ou 25 µl de soro hiperimune de coelho inativado (controle positivo) e realizou-se diluições seriadas. Em seguida, adicionou-se 25 µl da diluição do vírus contendo 8 unidades hemaglutinantes (UHA). Incubou-se por 1h a 37°C e após este tempo, adicionou-se 50 µl da suspensão de hemáceas. Incubou-se por mais 1h a 37°C (INABA *et al.*, 1977). O título IHA foi o resultado do cálculo do inverso da maior diluição do AcM ou soro hiperimune de coelho com completa inibição da hemaglutinação vezes o título hemaglutinante viral .

4.4 APLICAÇÃO DOS AcM EM TESTES DIAGNÓSTICO

As amostras de fezes diarréicas bovinas e humanas foram diluídas a 20% em PBS e clarificadas por centrifugação a 2000 g por 15 minutos a 4°C, conforme a metodologia descrita por Pereira *et al.* (1985) para seu uso nos testes.

4.4.1 ELISA de Captura

As placas de 96 poços (NUNC-MAXISORP TM) foram sensibilizadas com soro hiperimune de coelho 1:2000 diluído em tampão carbonato-bicarbonato (Na₂CO₃ 1,7g/l, NaHCO₃ 2,86g/l) 0,05M pH 9,6, e incubadas durante toda a noite a 4°C, em câmara úmida. No dia seguinte lavou-se com PBS-T 0,05% e bloqueou-se com solução de PBS-Leite a 5%, por 1h a 37°C. Após o bloqueio, lavou-se as placas com PBS-T 0,05% e adicionou-se 100 µl de suspensão de fezes clarificadas. Incubou-se por mais 1 h a 37°C,

quando então, repetiu-se a lavagem e acrescentou-se os sobrenadantes dos clones produtores de AcM. Incubou-se durante toda a noite a 4°C em câmara úmida, e ao final desse tempo, lavou-se novamente as microplacas com PBS-T 0,05%. Adicionou-se Ig de ovelha anti-IgG de camundongo 1:5000 (v/v, PBS) marcado com peroxidase (SIGMA CHEMICAL CO) e incubou-se a 37°C por 1 h. Por último, as placas foram lavadas e revelou-se a reação com uma solução de TMB (SIGMA CHEMICAL CO) na presença de 0,015% (v/v) de peróxido de hidrogênio. A reação foi lida em espectrofotômetro com filtro de 630 nm após 10 minutos.

Utilizou-se como controle positivo soro hiperimune de camundongo 1:100 (v/v, PBS) e AcM 2H6 e como controle negativo Meio MEM-E a 10% SFB.

4.4.2 Dot-blot

Adicionou-se, individualmente, numa membrana de nitrocelulose sobrenadantes de clones produtores de AcM 1:5 (v/v, PBS-L 0,5%). Cortou-se a membrana longitudinalmente e bloqueou-se como descrito anteriormente (Materiais e métodos 4.3.2). Em seguida, colocou-se a suspensão de fezes clarificadas em cada fita e incubou-se por 1h a 37°C. Ao fim deste tempo, lavou-se as fitas com PBS-T 0,05% sob agitação e adicionou-se soro hiperimune de coelho 1:2000 (v/v, PBS), incubou-se por mais 1h a 37°C. Em seguida, repetiu-se a lavagem e acrescentou-se Ig de cabra anti-IgG de coelho 1:1000 (v/v, PBS) marcado com peroxidase (SIGMA CHEMICAL CO) e incubou-se por 1h a 37°C. Por último, as fitas foram lavadas com PBS-T 0,05%. A revelação da reação foi realizada com uma solução de DAB (Materiais e métodos 4.3.2).

5. RESULTADOS

5.1 CARACTERIZAÇÃO IMUNOQUÍMICA DOS ACM

5.1.1 Isotipificação

Na Tabela 1, apresenta-se os resultados obtidos na reação de isotipificação dos AcM. Esta reação revelou que todos os AcM foram do isotipo IgG2a e apresentaram cadeia leve do tipo κ .

5.1.2 Dot-blot

O resultado do *Dot-blot* é mostrado na Figura 4. O AcM 1G5 detectou RTV bovino numa concentração de até 0,1 μ g de proteínas virais, enquanto os AcM 4F7, 1E12 e 4F3 detectaram o vírus numa concentração de até 0,2 μ g de proteínas virais. O 3C12 não detectou o vírus nestas condições.

5.1.3 Western-blot

O resultado da técnica de *Western-blot* é mostrado na Figura 5. Os AcM 4F3 e 1E12 reconheceram proteínas virais através desta técnica. O 4F3 reagiu somente em condições não-desnaturantes e o 1E12 reagiu em condições não-desnaturantes e desnaturantes. Os AcM 1G5, 4F7 e 3C12 não reconheceram proteínas virais com esta metodologia.

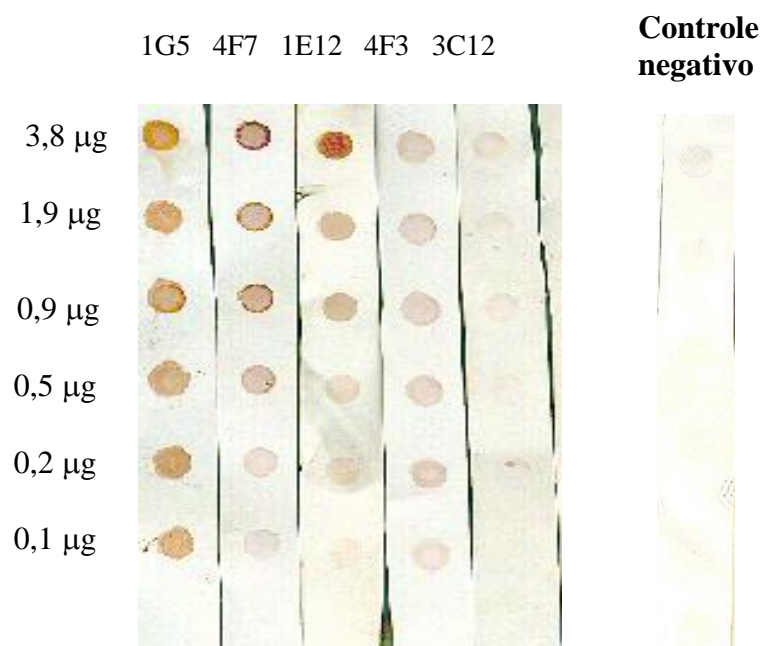


Figura 4 – Dot-blot. Avaliação da capacidade dos AcM em detectar RTV bovino. Em membranas de nitrocelulose, colocou-se vírus ultracentrifugado em diferentes concentrações e, em seguida, os sobrenadantes dos hibridomas produtores de AcM (1/5). Posteriormente, adicionou-se imunoglobulina de ovelha anti-IgG de camundongo marcada com peroxidase. A reação foi revelada com uma solução de DAB.

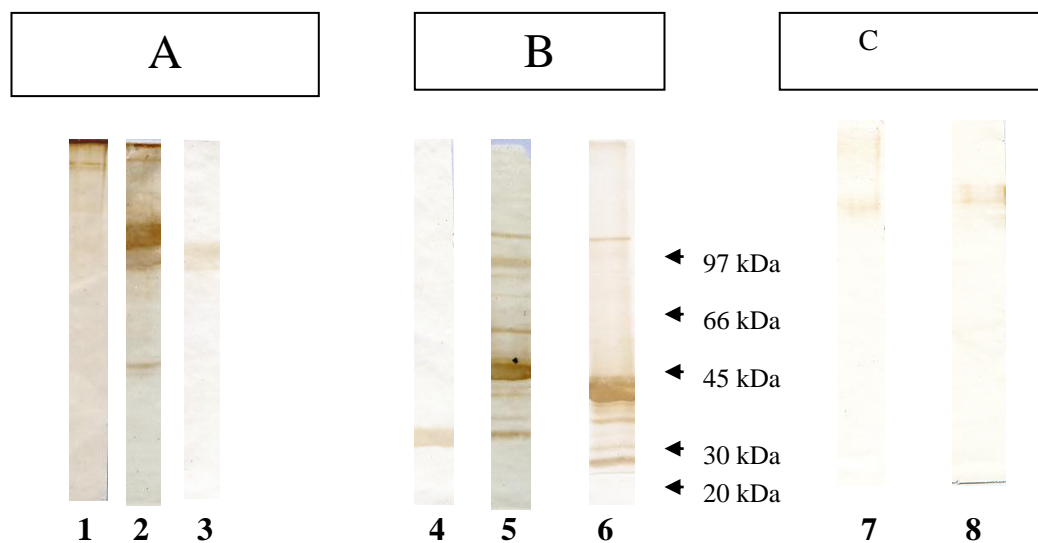


Figura 5 - Western-blot. Identificação de proteínas do Rotavírus bovino (RVB-P) por anticorpo monoclonal e policlonal.

A) RVB-P em condições não-desnaturantes com AcM 4F3 (1), soro policlonal de camundongo (2), AcM 1E12 (3); **B)** RVB-P em condições desnaturantes com AcM 1E12 (4), soro policlonal de camundongo (5), soro policlonal de coelho (6); **C)** Células MA-104 lisadas não-infectadas, com soro policlonal de coelho (7), soro policlonal de camundongo (8). As setas à direita indicam as posições do marcador de peso molecular.

5.1.4 Imunofluorescência indireta (IFI)

A IFI foi realizada em diferentes tempos pós-infecção, para demonstração, no decorrer da infecção viral, da capacidade dos AcM em reconhecerem proteínas virais na cultura de células.

Os AcM 4F7, 1E12, 4F3 e 3C12 foram claramente positivos na reação de IFI, com a produção de uma forte fluorescência citoplasmática. Na IFI do AcM 1G5 foi observada uma fluorescência citoplasmática fraca (Tabela 1).

Observou-se que os AcM 1E12, 4F3, 4F7 e 1G5 reconheceram proteínas desde as 3h pós-infecção, sugerindo proteínas virais iniciais da replicação viral, enquanto o 3C12 reconheceu proteínas virais a partir de 5h pós-infecção, possivelmente sintetizadas mais tardiamente no ciclo de replicação. Notou-se, também, que as células infectadas apresentavam as inclusões citoplasmáticas ou viroplasmas (local onde ocorre a montagem final do vírus prévio a sua liberação) bem delimitados, ao redor do núcleo. Após, 7h pós-infecção, estas inclusões apresentavam-se de forma mais difusa no citoplasma celular e em um número maior de células. Finalmente, 24h pós-infecção, as inclusões aparecem difundidas nas células por todo o citoplasma, sugerindo proximidade de lise celular (Figuras 6-A e 6-B).

Tabela 1 – Perfil imunológico dos AcM contra Rotavírus bovino

| AcM | Isotipificação | Dot-blot | W.B. | IFI | NT | IHA |
|-------------|----------------|----------|------|-----------|----|-----|
| 1G5 | IgG 2a, κ | + | – | + (fraca) | – | – |
| 4F7 | IgG 2a, κ | + | – | + | – | – |
| 1E12 | IgG 2a, κ | + | + | + | – | – |
| 4F3 | IgG 2a, κ | + | + | + | – | + |
| 3C12 | IgG 2a, κ | – | – | + | – | – |

Os resultados foram expressos como positivos (+) e negativos (–).

WB = Western-blot; IFI = Imunofluorescência indireta; NT = Neutralização; IHA = Inibição da Hemaglutinação.

A

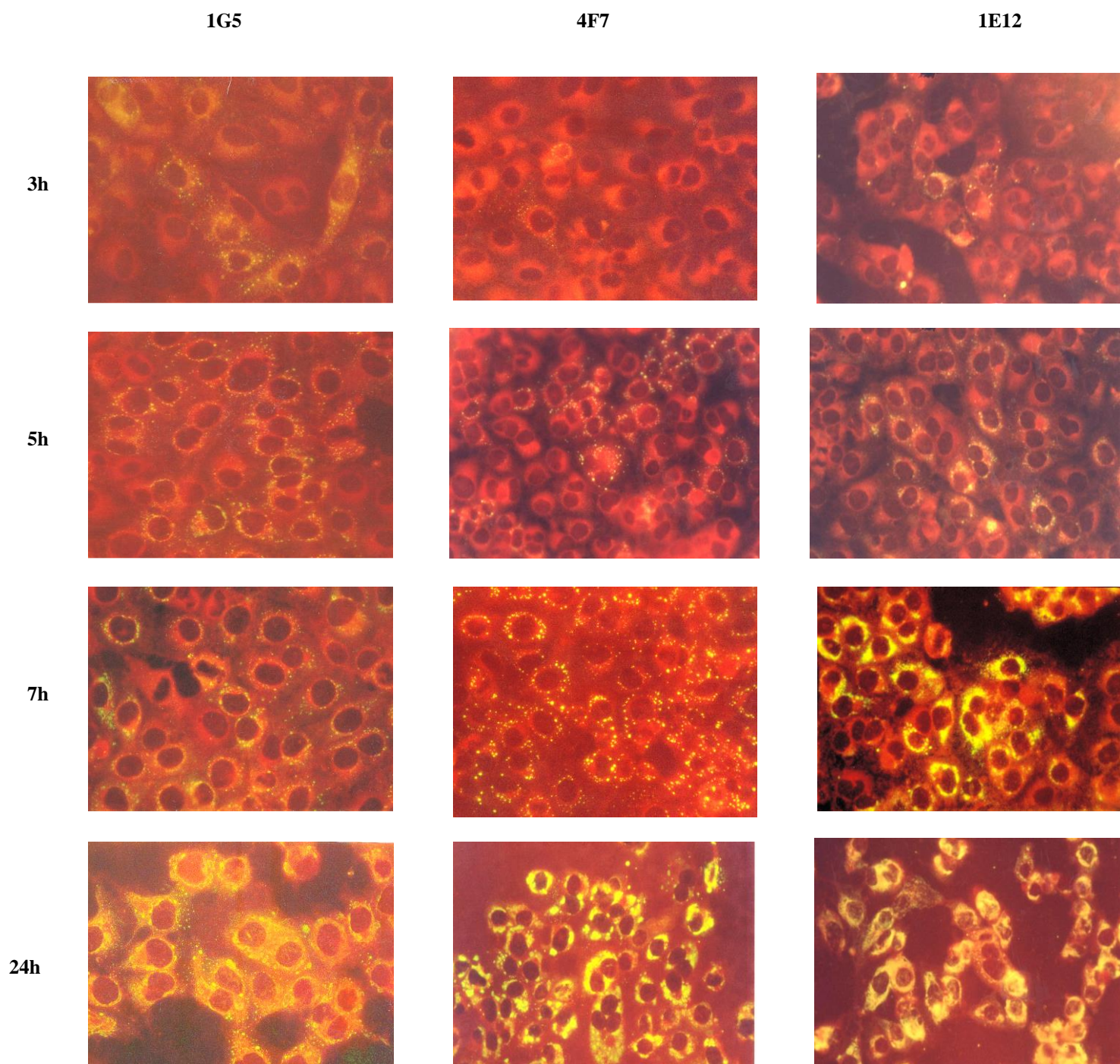


Figura 6 A e B - Imunofluorescência indireta (IFI). Células MA-104 foram infectadas com Rotavírus bovino e fixadas com acetona, em diferentes tempos pós-infecção. Adicionou-se sobrenadantes dos hibridomas produtores de AcM ou soro hiperimune de camundongo (1:500) (controle positivo) e, posteriormente, imunoglobulina de ovelha anti-IgG de camundongo (1/30) marcada com FITC. Em seguida, corou-se com azul de Evans (0,1%) por 3 min e observou-se ao microscópio de fluorescência.

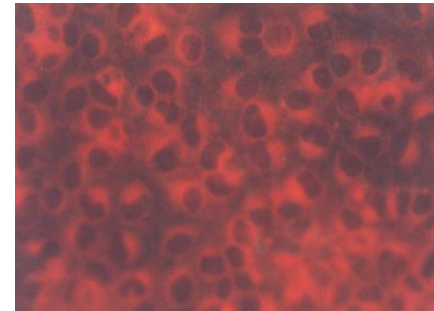
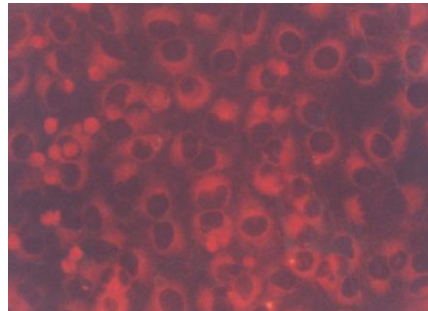
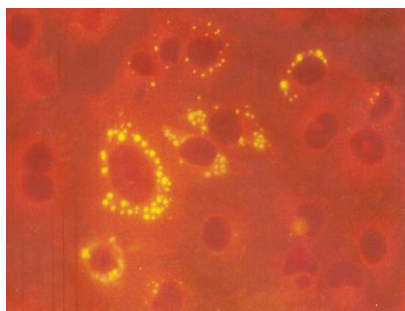
B

4F3

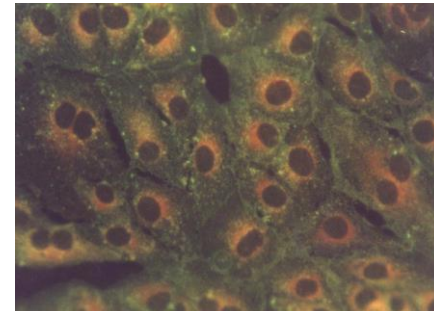
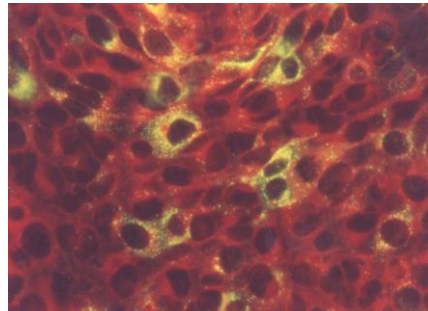
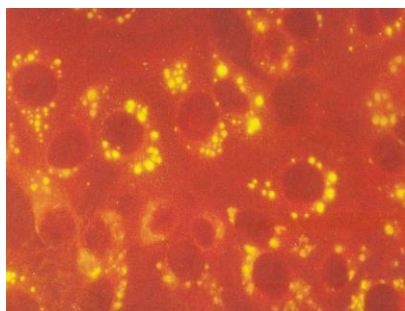
3C12

Controle

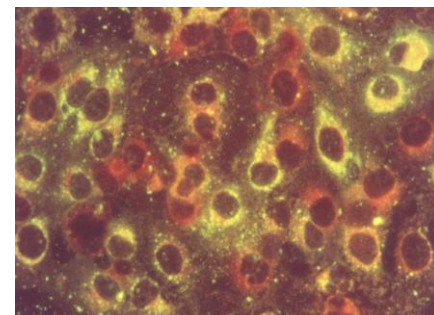
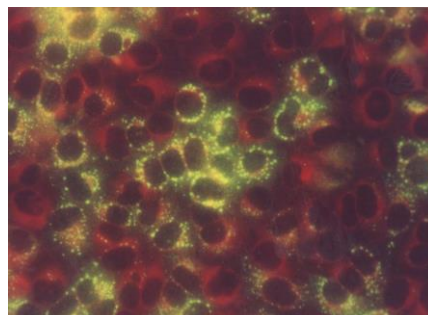
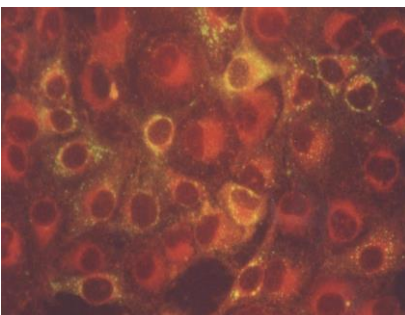
3h



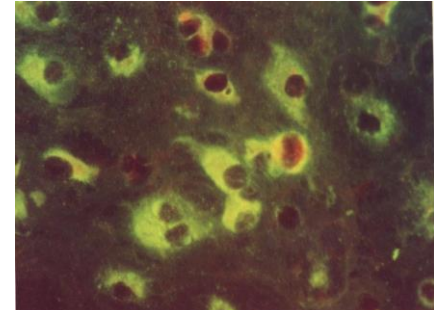
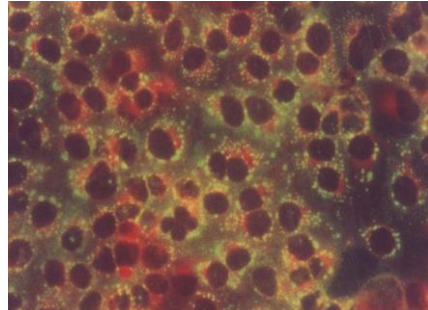
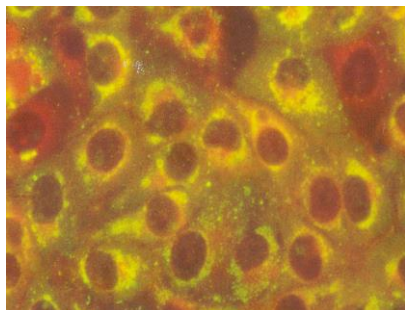
5h



7h



24h



5.1.5 Atividade Neutralizante

Na técnica de soroneutralização, empregou-se os líquidos ascíticos dos AcM, por possuírem uma maior concentração de imunoglobulina. Todos os AcM testados mostraram não possuir atividade neutralizante contra RTV bovino (Tabela 1). Notou-se, no entanto, que as primeiras diluições dos AcM modificavam o efeito citopático característico produzido pelo RTV com desprendimento total da monocamada, apenas era visto um arredondamento celular. Devido a este fato, empregou-se a técnica de IFI, para confirmar a presença do vírus nas células. Observou-se que todas as células apresentaram fluorescência citoplasmática, que aumentava esta progressivamente com a diluição dos líquidos ascíticos e coincidentemente com o efeito citopático.

5.1.6 Inibição da Hemaglutinação (IHA)

A Hemaglutinação tem sido demonstrada em algumas cepas de Rotavírus animal, que aglutinam eritrócitos de humanos e animais, sendo a proteína VP4 responsável por esta propriedade. Neste caso, o RTV bovino mostrou ter atividade hemaglutinante com eritrócitos de humano, obtendo-se um título igual a 128 UHA.

A Figura 7 mostra os resultados obtidos no teste de IHA. O soro hiperimune de coelho demonstrou a propriedade de inibir a hemaglutinação (título = 1280). Dos cinco AcM testados, apenas o 4F3 apresentou esta propriedade (título = 80) com uma leve diferença com respeito ao controle e aos outros AcM com títulos iguais a 40, considerado negativo.

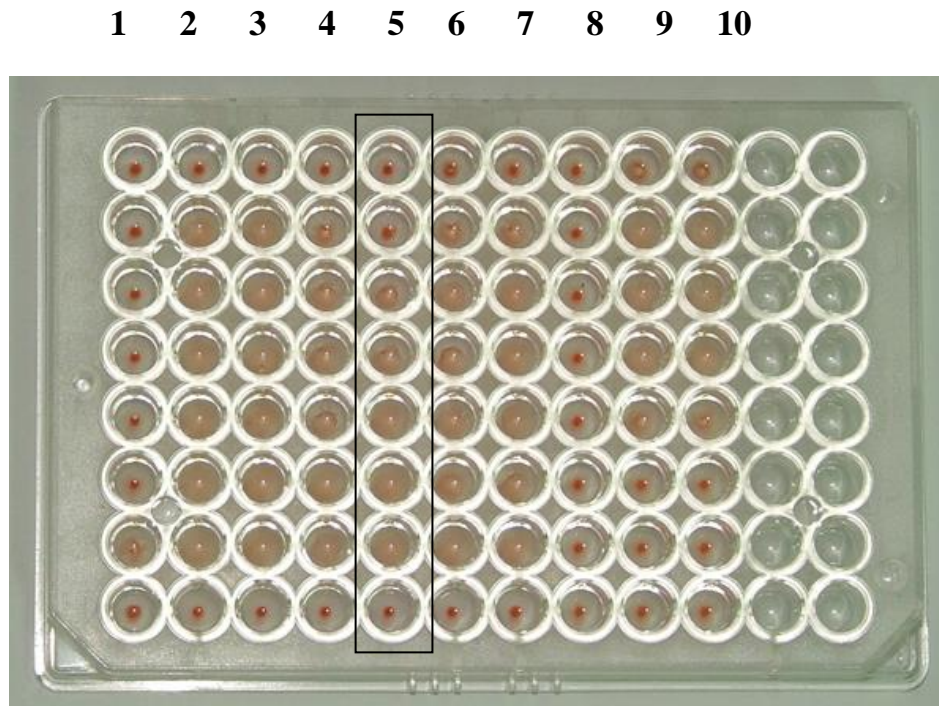


Figura 7 - Inibição da Hemaglutinação (IHA). Colocou-se sobrenadantes dos hibridomas produtores de AcM (1/5) e diluiu-se progressivamente em PBS com 0,1% de soroalbumina bovina. Adicionou-se RTV bovino (8 UHA) e, posteriormente hemáceas humanas do grupo O (0,5%). Coluna 1: Soro hiperimune de coelho (controle positivo); 2: 1G5; 3: 4F7; 4: 1E12; 5: 4F3; 6: 3C12; 7: Meio de cultura com 10% SFB (controle negativo); 8: Controle de hemáceas; 9 e 10: Titulação do vírus por UHA.

5.2 APLICAÇÃO DOS AcM EM TESTES DIAGNÓSTICO

5.2.1 ELISA de captura

Na Tabela 2 são apresentados os resultados das amostras fecais analisadas com o teste de ELISA de captura.

Os AcM 1G5, 4F7, 1E12, 4F3 e 3C12 reconheceram antígenos de RTV bovino e humano nas amostras de fezes (Figura 8). No total de amostras analisadas (n=20), 12 foram positivas para RTV com os AcM 1G5 e 4F7 e 8 foram negativas. Alternativamente, com o uso do AcM 1E12, detectou-se 13 amostras positivas e 7 negativas. Disto surge que, apesar deste teste de ELISA, ter sido utilizado para análises preliminares sobre os AcM, observou-se alta concordância entre os resultados encontrados, quando empregou-se os AcM 1G5, 4F7 e 1E12 ($\kappa = 0,9$; $p < 0,05$) e aqueles obtidos no SDS-PAGE (técnica de referência). O resultado divergente apresentado no SDS-PAGE na amostra de número 8 pode ser em consequência da degradação do RNA viral por ação enzimática, o que dificultou sua detecção. Notou-se baixa concordância entre os resultados obtidos no SDS-PAGE e no teste de ELISA, quando utilizou-se os AcM 4F3 e 3C12 ($\kappa = 0,5$; $p < 0,05$).

Tabela 2 – Reatividade dos AcM contra Rotavírus bovino.

Deteccão de Rotavírus em fezes bovinas e humanas por ELISA de captura, utilizando sobrenadantes de clones produtores de anticorpos monoclonais.

| Fezes | SDS-PAGE | Anticorpos monoclonais (ELISA) | | | | |
|-------|----------|--------------------------------|-----|------|-----|------|
| | | 1G5 | 4F7 | 1E12 | 4F3 | 3C12 |
| 01 | + | + | + | + | + | + |
| 02 | + | + | + | + | + | + |
| 03 | + | + | + | + | + | + |
| 04 | + | + | + | + | + | + |
| 05 | + | + | + | + | + | + |
| 06 | + | + | + | + | + | + |
| 07 | + | + | + | + | - | - |
| 08 | - | + | + | + | - | + |
| 09 | - | - | - | - | - | - |
| 10 | - | - | - | - | - | - |
| 11 | - | - | - | - | - | - |
| 12 | - | - | - | - | + | - |
| 13 | - | - | - | - | + | - |
| 14 | - | - | - | - | + | - |
| 15 | + | + | + | + | - | - |
| 16 | + | + | + | + | + | - |
| 17 | + | + | + | + | + | + |
| 18 | + | + | + | + | - | - |
| 19 | - | - | - | - | + | - |
| 20 | - | - | - | + | - | - |

Os resultados foram expressos como positivos (+) e negativos (-).

O SDS-PAGE foi realizado após extração de RNA viral a partir de fezes e, quando visualizada a presença dos 11 segmentos do RNA viral a amostra era considerada como positiva (+).

Fezes 01 a 14 bovinas; 15 a 20 humanas.

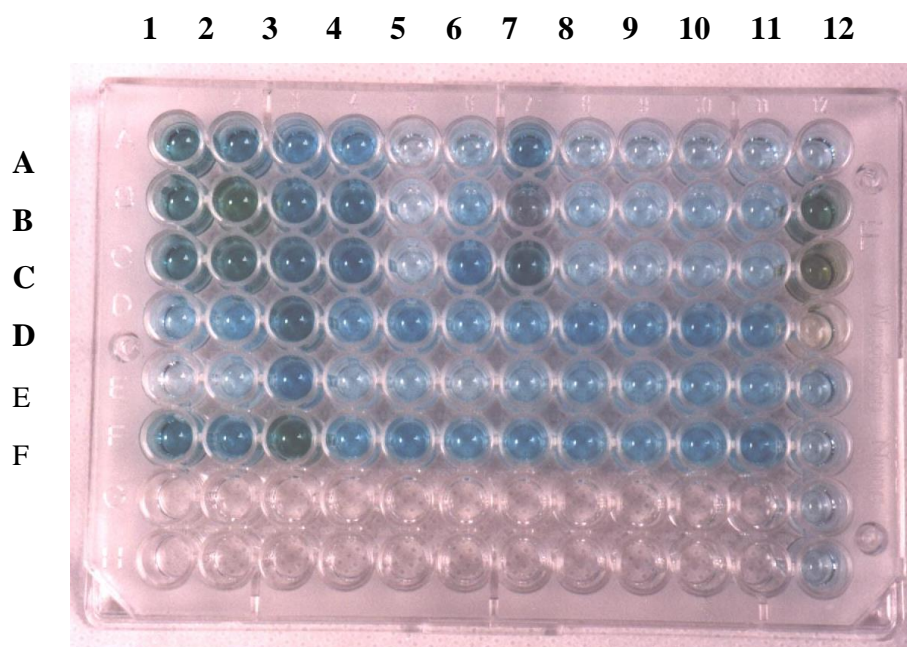


Figura 8 - ELISA de captura. Sensibilizou-se as placas com soro hiperimmune de coelho anti-Rotavírus bovino (1:2000), adicionou-se suspensão de amostras de fezes humanas (1 a 6) e bovinas (7 a 11), controle negativo (12A), controle positivo (12B e F) e, posteriormente, os sobrenadantes dos clones produtores de AcM e imunoglobulina de ovelha anti-IgG de camundongo marcada com peroxidase. A reação foi revelada com uma solução de TMB e lida em espectrofotômetro. Linha A: 1G5; B: 4F7; C:1E12; D: 4F3; E: 3C12.

5.2.2 DOT-BLOT

A Figura 9 mostra os resultados obtidos através da técnica de *Dot-blot* realizada com amostras de fezes bovinas. Os AcM 4F7, 1E12 e 1G5 detectaram antígenos virais nas fezes. Notou-se, porém, que o 4F7 apresentou resultados coincidentes com os apresentados no teste de ELISA indireto. No entanto, os AcM 4F3 e o 3C12 não detectaram o RTV por esta técnica, nas amostras analisadas.

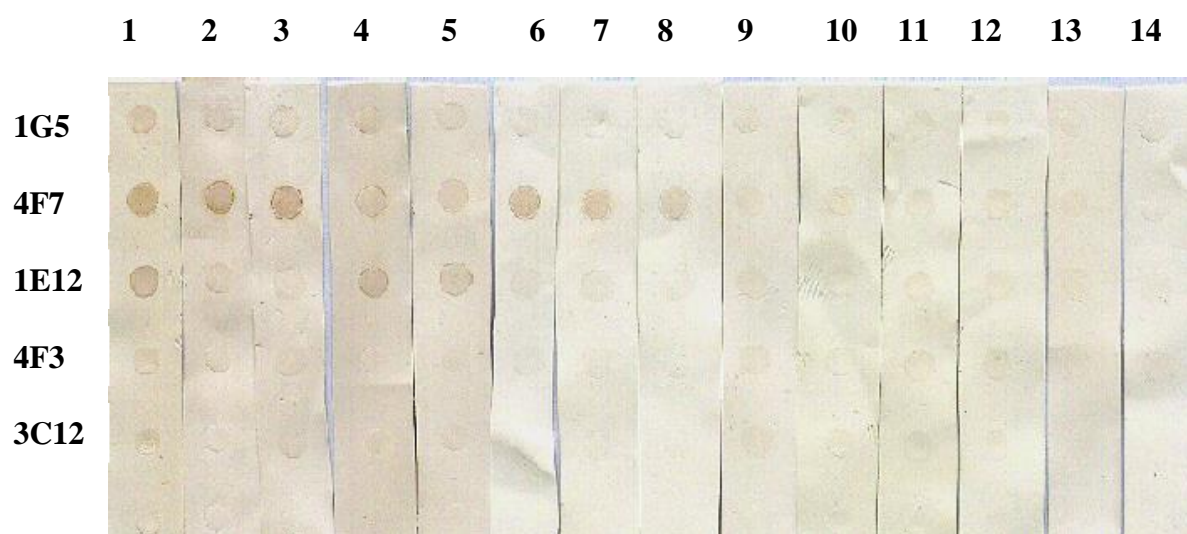


Figura 9 - Dot-blot. Avaliação da capacidade dos AcM para detectar antígenos virais em amostras de fezes bovinas (1 a 14). Em membranas de nitrocelulose, colocou-se sobrenadantes de hibridomas produtores de AcM (1/5), adicionou-se suspensão de fezes e, em seguida, soro hiperimune de coelho (1/2000) e imunoglobulina de cabra anti-IgG de coelho marcada com peroxidase. A reação foi revelada com uma solução de DAB.

6. DISCUSSÃO

Um diagnóstico acurado, efetivo e rápido do RTV bovino é fundamental para se estabelecer medidas terapêuticas e profiláticas, uma vez que o quadro diarreico grave estabelecido em animais, por esta virose, acarreta graves prejuízos econômicos. O diagnóstico laboratorial baseia-se na detecção das partículas virais ou de antígenos virais em material fecal, uma vez que o cultivo do Rotavírus é demorado para estes casos (SANTOS, GOUVEA, 1997). Considerando isto, imunoenaios com anticorpos monoclonais poderiam constituir eficientes ferramentas de diagnóstico, principalmente por serem monoespecíficos, reconhecendo apenas um determinante antigênico ou epítopo nas moléculas, evitando resultados falso-positivos.

Neste estudo, cinco AcM produzidos contra RTV bovino foram caracterizados, utilizando-se técnicas de *Dot-blot*, *Western-blot*, IFI, ELISA de captura, ensaios de isotipificação, atividade neutralizante e inibição da hemaglutinação. Estes AcM apresentaram perfis imunquímicos diferentes nos testes empregados, possivelmente devido às diversas formas de apresentação das proteínas virais e/ou modificação na conformação protéica. Desta forma, identificamos dois grupos de AcM, um formado pelo 4F7, 1E12 e 1G5 para possível uso na detecção de antígeno viral em fezes, e outro pelo 4F3 e 3C12 que podem ser usados na detecção de antígeno viral em cultura de células.

É conhecido que as proteínas podem sofrer alterações durante o processamento das técnicas diagnósticas, o que torna as vezes difícil as interações com os anticorpos, principalmente, com epítomos conformacionais, produzindo resultados negativos (NELSON *et al.*, 2000). Este fato, possivelmente aconteceu durante a aplicação da técnica de *Western-blot* para caracterização das proteínas virais reconhecidas pelos AcM. A corrida eletroforética das proteínas e posterior transferência à membrana de nitrocelulose, mostrou que dos cinco AcM, unicamente os AcM 4F3 e 1E12,

conseguiram reconhecer as proteínas virais em estado desnaturante ou não-desnaturante através desta técnica. Destes dois AcM foi o 4F3 que reagiu em estado não-desnaturante, obedecendo quiçá ao reconhecimento de um epítopo conformacional. Por outro lado, foi o único a demonstrar capacidade de inibir a hemaglutinação, o que apoiaria a hipótese de reconhecer um epítopo exposto na superfície, tipo conformacional. Isto sugere, a possibilidade deste AcM estar reagindo contra a proteína VP4, localizada no capsídeo externo do vírus, responsável pela propriedade de hemaglutinação (NAKAGOMI *et al.*, 1992; KAPIKIAN; CHANOCK, 1996) e que pode ser especificamente bloqueada por anticorpos dirigidos contra seus determinantes antigênicos, inibindo o fenômeno da hemaglutinação (FUKUDOME *et al.*, 1989). Porém, ao utilizá-lo para a detecção do vírus nas fezes infectadas de forma natural, sua performance foi questionada e o fato dele estar reconhecendo um epítopo conformacional apoiaria a discordância de resultados com os outros AcM.

Entretanto, tivemos o AcM 1E12 que, diferente do 4F3, reagiu com proteínas desnaturadas e não desnaturadas, mostrando que o epítopo reconhecido por ele, possivelmente, seja uma seqüência de aminoácidos localizados em uma proteína viral, a qual não sofre, em demasia, as conseqüências das metodologias empregadas, independente do estado do vírus (infectante ou não). Este fato é confirmado pela observação de que este AcM se destaca em todos os testes diagnósticos realizados com RTV (*Dot-blot*, IFI e ELISA). Resultado semelhante foi observado com o AcM 4F7, cuja performance também foi destacável, obtendo-se resultados mais alentadores (diluição de uso e forte sinal nos testes) em todos os testes utilizados, à exceção do *Western-blot*. O outro AcM 1G5 também participa do grupo de AcM reativos, porém, a IFI demonstra que houve leve diminuição da sua reatividade, quando comparado com o 4F7 e 1E12. Como resultante destes AcM podemos perceber que um grupo formado

pelos três AcM 4F7, 1E12 e 1G5 tiveram resultados alentadores em vários dos testes empregados, e os outros 4F3 e 3C12 de resultados divergentes. A este respeito, o 3C12 apresentou pobres resultados nos testes realizados, apesar de obter-se uma fluorescência citoplasmática forte em cultura de células infectadas, quando empregou-se este AcM, podendo, então, ser uma alternativa válida para seu uso como reagente para IFI.

Portanto, neste trabalho pode-se observar que a caracterização imunológica destes AcM contra RTV resultou na eleição de um grupo de AcM como o 4F7, 1E12 e 1G5 fortes candidatos ao seu uso em testes de diagnóstico de antígenos virais em fezes, através de ELISA de captura, enquanto os outros dois AcM 4F3 e 3C12 não tiveram resultados animadores para seu uso na detecção do Rotavírus em fezes, mas seriam de eleição ao se tratar de detectar antígeno viral em culturas de células através de IFI, no caso de confirmar o isolamento viral.

Pode-se notar, também, que todos os AcM reagiram positivamente com fezes humanas, o que poderia indicar que estes estariam reconhecendo antígenos de grupo e teriam reatividade cruzada. Proteínas contendo determinantes que geram estas reações têm sido investigadas no gênero Rotavírus, e entre elas, a VP6 é considerada a principal responsável por este tipo de reação, talvez por constituir mais da metade do vírion. Em adição, a reatividade cruzada dos AcM dirigidos contra outras proteínas como VP4 e VP7 também tem sido reportada (SHAW *et al.*, 1986; TANIGUCHI *et al.*, 1987; CHEN *et al.*, 1992).

Desta forma, pode-se concluir que através dos testes imunquímicos propostos, conseguimos caracterizar as respostas destes AcM para seu uso na pesquisa de antígeno viral do Rotavírus bovino, de importância quando os kits disponíveis comercialmente, são utilizados primariamente para diagnóstico em humanos e não são apropriados para o diagnóstico em animais.

7. CONCLUSÕES

- Os AcM caracterizados, neste estudo, reagem positivamente nos testes de Imunofluorescência indireta, ELISA de captura e *Dot-blot* para detecção de antígeno viral;
- A presença de reação positiva no teste de *Western-blot*, com o AcM 1E12, utilizando-se proteínas virais desnaturadas, sugere o reconhecimento de epítomos lineares e com o AcM 4F3, utilizando-se proteínas virais não-desnaturadas e desnaturadas, sugere o reconhecimento de epítomo conformacional por este AcM.
- Os AcM 4F7, 1E12 e 1G5 podem ser utilizados como ferramentas em testes diagnósticos, para detecção de antígenos virais em amostras de fezes, baseados no ELISA de captura, enquanto o 4F3 e 3C12 podem ser empregados em testes para confirmação do isolamento viral em culturas de células, através de IFI.

ESTUDOS FUTUROS:

Com base neste trabalho, futuros projetos de pesquisa serão desenvolvidos para:

- Validar os testes propostos, empregando os AcM como ferramenta, para o diagnóstico das rotavirose bovina, já que o principal ponto de estrangulamento, neste aspecto, é o número de amostras;
- Caracterizar o reconhecimento de epítopos de grupo por estes AcM;
- Identificar a reatividade cruzada, destes AcM, com outras espécies animais (canina, caprina e suína, por exemplo).

Assim, poderemos conhecer mais profundamente as características destes AcM e seu uso na pesquisa de antígeno viral para, posteriormente, utilizá-los em testes diagnósticos com fins comerciais.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A. H.; POBER, J. S. **Imunologia Celular e Molecular**, 4ª ed. Rio de Janeiro: Revinter, 2003. cap 3, p.41-62.

AI-YOUSIF, Y.; AL-MAJHDI, F.; CHARD-BERSTROM, C.; ANDERSON, J.; KAPIL, S. Development, Characterization, and Diagnostic Applications of Monoclonal Antibodies against Bovine Rotavirus. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, 7 (2): 288-292, 2000.

ANKE, B. H. Protecting calves from viral diarrhea. **Veterinary Medicine**, 84 (1): 803-810, 1989.

BIRCH, C. J.; HEATH, R. L.; GUST, I. D. Use of Serotype-Specific Monoclonal Antibodies to Study the Epidemiology of Rotavirus infection. **Journal of Medical Virology** 24:45-53, 1988.

BLAKE, K; STACEY, A. Cell Culture in **Virus Culture – A Practical Approach**. Oxford University Press, Nova York 1: 1-32, 1999.

BRITO, W. M. E. D.; MUNFORD, V.; VILLAÇA, A. M.; CARUZO, T. A. R.; RACZ, M. L. Characterization of mixed infections with different strains of bovine rotavirus in na outbreak of diarrhea in dairy herds in Goiás, Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology** 31(2): 140-145,2000.

CHEN, D.; ESTES, M. K.; RAMIG, R. F. Specific Interactions between Rotavirus Outer Capsid Proteins VP4 and VP7 Determine Expression of a Cross-Reactive, Neutralizing VP4-Specific Epitope. **Journal of Virology**, v.66, n.1, p.432-439, 1992.

CHIBA, S.; YOKOYAMA, T.; NAKATA, S.; MORITA, Y. *et al.* Protective effects of naturally acquired homotypic and heterotypic rotavirus antibodies. **Lancet** 2, p. 417-421, 1986.

CIARLET, M.; CRAWFORD, S. E.; CHENG, E.; BLUTT, S. E.; RICE, D. A.; BERGELSON, J. M.; ESTES, M. K. VLA-2 ($\alpha 2\beta 1$) Integrin Promotes Rotavirus Entry into Cells but Is Not Necessary for Rotavirus Attachment. **Journal of Virology**, v.76, n.3, p. 1109-1123, 2002.

COLFOR, A.; HALL, P.A. Monoclonal Antibodies - Production, Engineering and Clinical Application. **Monoclonal antibodies in oncology: diagnostic pathology**. In LADYMAN & RITTER (Eds.) Cambridge: University Press, 1995. p. 209-246.

COLUCHI, N. B.; KROEFF, S. S. **Rotavírus**, 2000. Disponível em: <<http://icb.usp.br/~mlracz/virus/rota/rotavirus.htm>>. Acesso em: 23 de out. 2004.

COOK, D. B.; SELF, C. H. Monoclonal Antibodies - Production, Engineering and Clinical Application. **Monoclonal antibodies in diagnostic immunoassays**. In LADYMAN & RITTER (Eds.) Cambridge: University Press, 1995. p. 180-208.

EL-ATTAR, L.; DHALIWAL, W.; ITURRIZA-GÓMARA, M.; BRIDGER, J. C. Identification and Molecular Characterization of a Bovine G3 Rotavirus Which Causes Age-Independent Diarrhea in Cattle. **Journal of Clinical Microbiology**, v.40, n.3, p. 937-942, 2002.

ESTES, M. K. Rotaviruses and Their Replication. In FIELDS, B.N.; KNIPE, D.M.; HOWLEY, P.M.; CHANOCK, R.M.; MELNICK, J.L.; MONAH, T.P.; ROIZMAN, B.; STRAUS, S.E. **Virology**, 4th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2001. cap. 54, p. 1747-1785.

FAUVEL, M.; SPENCE, L.; BABIUK, L. A.; PETRO, R.; BLOCH, S. Hemagglutination and Hemagglutination-Inhibition Studies with a Strain of Nebraska Calf Diarrhea Virus (Bovine Rotavirus). **Intervirology** 9: 95-105, 1978.

FONTES, Lia Vale de Queiroz. **Produção de Anticorpos Monoclonais contra Rotavírus Bovino**. 2003. 81f. Dissertação (Mestrado em Imunologia) – PPGIm, ICS, UFBA, Salvador.

FRANCO, M. A.; TIN, C.; GREENBERG, H. B. CD8⁺ T Cells Can Mediate Almost Complete Short-Term and Partial Long-Term Immunity to Rotavirus in Mice. **Journal of Virology**, v.71, n.5, p. 4165-4170, 1997.

FUKUDOME, K.; YOSHIE, O.; KONNO, T. Comparison of Human, Simian, and Bovine Rotaviruses for Requirement of Sialic Acid in Hemagglutination and Cell Adsorption. **Virology** 172: 196-205, 1989.

GREENBERG, H. B.; VALDESUSO, J.; KATHLEEN, W.; MIDTHUN, K. *et al.* Production and preliminary Characterization of Monoclonal antibodies directed at Two surface proteins of Rhesus Rotavirus. **Journal of Virology** 47(2):267-275, 1983.

GOLDSBY, R.A., KINDT, T.J., OSBORNE B.A. **Kuby Immunologia**. 4^a ed. Rio de Janeiro: Revinter, 2002.

HERRING, A.J.; INGLIS, N.F.; OJHEH, 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 Clinical Microbiology** 16 (3), p. 473-477, 1982.

HOSHINO, Y.; WYATT, R. G.; GREENBERG, H. B.; KALICA, A. R.; FLORES, J.; KAPIKIAN, A. Z. Serological Comparison of Canine Rotavirus with Various Simian and Human Rotaviruses by Plaque Reduction Neutralization and Hemagglutination Inhibition Tests. **Infection and Immunity** 41, p.169-173, 1983.

INABA, Y.; SATO, K.; TAKAHASHI, E.; KUROGI, H.; SATODA, K.; OMORI, T.; MATUMOTO, M. Hemagglutination with Nebraska Calf Diarrhea Virus. **Microbiology Immunology** 21 (9), p.531-534, 1977.

ISÃ, P.; REALPE, M.; ROMERO, P.; LOPEZ, S.; ARIAS, C. F. Rotavirus RRV associates with lipid membrane microdomains during cell entry. **Virology** 322:370-381, 2004.

JAYARAM, H.; ESTES, M. K.; PRASAD, B. V. V. Emerging Themes in Rotavirus Cell Entry, Genoma Organization, Transcription and Replication. **Virus Research**, v101, p.67-81, 2004.

KAPIKIAN, A. Z.; CHANOCK, R. M. Rotaviruses. In FIELDS, B.N.; KNIPE, D.M.; HOWLEY, P.M.; CHANOCK, R.M.; MELNICK, J.L.; MONAH, T.P.; ROIZMAN, B.; STRAUS, S.E. **Virology**, 3th ed. Philadelphia: Lippincott-Raven Press, 1996. cap. 55, p.1657-1708.

KAPIKIAN, A. Z.; WYATT, R. G.; LEVINE, M. M. *et al.* Oral administration of human rotavirus to volunteers: Induction of illness and correlates of resistance. **Journal of Infectious Diseases** 147: 95-106, 1983.

KATYAL, R.; RANA, S. V.; SINGH, K. Rotavirus Infections. **Acta virologica** 44: 283-288, 2000.

KOHLER, G.; MILSTEIN, C. Continuous cultures of cells secreting antibody of defined specificity. **Nature**, 256: 495-497, 1975.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature** 227: 680-685, 1970.

LOPEZ, S.; ESPINOSA, R.; ISA, P. *et al.*, Characterization of a Monoclonal Antibody Directed to the Surface of Ma104 Cells That Blocks the Infectivity of Rotaviruses. **Virology** 273:160-168, 2000.

LU, W.; DUHAMEL, G. E.; HOSHINO, Y.; BENFIELD, D. A.; NELSON, E. A.; HESSE, R. A. Characterization of the Bovine Group A Rotavirus Strain Neonatal Calf Diarrhea Virus-Cody (NCDV-Cody). **Journal of Clinical Microbiology**, v. 33, n.4, p. 990-994, 1995.

LUDERT, J. E.; RUIZ, M. C.; HIDALGO, C.; LIPRANDI, F. Antibodies to Rotavirus Outer Capsid Glycoprotein VP7 Neutralize Infectivity by Inhibiting Virion Decapsulation. **Journal of Virology**, p. 6643-6651, 2002.

LUNDGREN, O., PEREGRIN, A. T., PERSSON, K., UHNOO, I., SVENSSON, L. Role of Enteric Nervous System in the Fluid and Electrolyte Secretion of Rotavirus Diarrhea. **Science**, v. 287, p. 491-494, 2000.

McCRAE, M. A.; McCORQUODALE, J. G. The Molecular Biology of Rotaviruses. **Virology** 117:435-443, 1982.

MCKEATING, J.; SHOTTON, C.; VALERI, M. Antiserum production and monoclonal antibodies in **Virus Culture – A Practical Approach**. Oxford University Press, New York 7: 181-200, 1999.

McNEAL, M. M.; BARONE, K. S.; RAE, M. N.; WARD, R. L. Effector Functions of Antibody and CD8+ Cells in Resolution of rotavirus Infection and Protection against Reinfection in mice. **Virology** 214, p. 387-397, 1995.

MENDEZ, E.; LOPEZ, S.; CUANDRAS, M. A.; ROMERO, P.; ARIAS, C. F. Entry of rotaviruses is a multistep process. **Virology**, 263:450-459, 1999.

MORI, Y.; BORGAN, M.A.; ITO, N.; SUGIYAMA, M.; MINAMOTO, N. Diarrhea – Inducing Activity of Avian Rotavirus NSP4 Glycoproteins, which Differ Greatly from Mammalian Rotavirus NSP4 Glycoproteins in Deduced Amino acid Sequence, in Suckling Mice. **Journal of Virology**, v76, n11, p 5829-5834, 2002.

NAKAGOMI ,O.; MOCHIZUKI, M.; ABOUDY,Y.; SHIF, I.; SILBRESTEIN, I.; NAKAGOMI, T. Hemagglutination by a Human Rotavirus Isolate as Evidence for Transmission of Animal Rotaviruses to Humans. **Journal of Clinical Microbiology**, v30, n4, p.1011-1013, 1992.

NAKATA, S.; PETRIE, B.E.; CALOMENI, E.P.; ESTES, M.K. Electron Microscopy Procedure Influences Detection of Rotaviruses. **Journal of Clinical Microbiology**, v25, n10, p.1902-1906, 1987.

NELSON, P. N.; REYNOLDS, G. M.; WALDRON, E. E.; WARD, E.; GIANNOPOULOS, K.; MURRAY, P. G. Monoclonal antibodies. **Journal Clinical of Pathology** 53:111-117, 2000.

OLDHAM,G., BRIDGER,J.C., HOWARD,C.J., PASON,S,K.R., In Vivo Role of Lymphocyte Subpopulations in the Control of Virus Excretion and mucosal Antibody Responses of Cattle Infected with Rotavirus. **Journal of Virology**, v.67, n.8, p.5012-5019, 1993.

OLIVEIRA, C. S.; LINHARES, A. C. Rotavírus: aspectos clínicos e prevenção. **Jornal de Pediatria**, S91-102, 1999.

PEREIRA, H. G.; AZEREDO, R. S.; LEITE, J. P. G.; ANDRADE, Z. P.; CASTRO, L. A. Combined Enzyme Immunoassay for Rotavirus and adenovirus. **Journal of Virological Methods** 10:21-28, 1985.

PRASAD, B. V. V.; ROTHNAGEL, R.; ZENG, C. Q. Y.; JAKANA, J.; LAWTON, J. A.; CHIU, W.; ESTES, M. K. Visualization of ordered genomic RNA e localization of transcriptional complexes in rotavirus. **Nature**, v.382, 1996.

RAMSEY, A.J.; RUBY, J.;RAMSHAW, I. A. A case for cytokines or effector molecules in the resolution of virus infection. **Immunology Today** 14, p. 155-157, 1993.

REED, L. J.; MUENCH, H. A. Simple method of estimating 50 per cent and point. **American Journal of Hygiene** 27: 493-497, 1938.

RUGGERI, F. M.; GREENBERG, H. B. Antibodies to the trypsin cleavage peptide VP8* neutralize rotavirus by inhibiting binding of virions to target cells in culture. **Journal of Virology**, v.65, p.2211-2219, 1991.

RUGGERI, F. M.; JOHANSEN, K.; BASILE, G.; KRAEHENBUHL, J. P.; SVENSSON, L. Antirovirus Immunoglobulin A Neutralizes Virus In Vitro after Transcytosis through Epithelial Cells and Protects Infant Mice from Diarrhea. **Journal of Virology**, v.72. n. 4, p.2708-2714, 1998.

SANTOS, N.; GOUVEIA, V. Rotavirus infection: an overview. **Jornal Brasileiro de Patologia**, vol. 33, no.2, p 94-102, 1997.

SANTOS, N. S. O.; ROMANOS, M. T. V.; WIGG, M. D. **Introdução à Virologia Humana**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002 cap. 6, p.59-63.

SHAW, R. D.; VO, P. T.; OFFIT, P. A.; COULSON, B. S; GREENBERG, H. B. Antigenic mapping of the surface proteins of rhesus rotavirus. **Virology**, 155: 434-451, 1986.

SILVA, R. R.; BARROS, D. M.; SOUZA, R. K. A.; MOREIRA, A. H.; FIGUEIREDO, H. F. Pesquisa de Rotavírus em Bezerros Bovinos no Município de Igarapé- açu (PA). **Revista Ciência Agrária**, Belém, n 36, p 121-129, 2001.

TANIGUCHI, K.; MORITA, Y.; URASAWA, T.; URASAWA, S. Cross-reactive neutralization epitopes on VP3 of human rotavirus: analysis with monoclonal antibodies and antigenic variants. **Journal of Virology**, 61: 1726-1730, 1987.

WARD, R.L.; BERNSTEIN, D. I. Lack of correlation between serum rotavirus antibody titers and protection following vaccination with reassortant RRV vaccines. **Vaccine** 13, p. 1226-1232, 1995.