

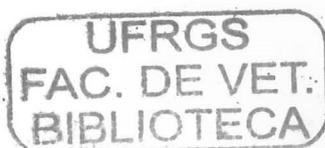
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

**PRODUÇÃO DE ANTICORPOS MONOCLONAIS
CONTRA VÍRUS RÁBICO DE ORIGEM BOVINA E CARACTERIZAÇÃO
DE AMOSTRAS**

Rejane Schaefer

Porto Alegre

1999



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

**PRODUÇÃO DE ANTICORPOS MONOCLONAIS
CONTRA VÍRUS RÁBICO DE ORIGEM BOVINA E CARACTERIZAÇÃO
DE AMOSTRAS**

Rejane Schaefer*

Dissertação apresentada como
requisito ao grau de Mestre em
Ciências Veterinárias, na área de
Medicina Veterinária Preventiva-
Virologia Veterinária

Orientador: Prof. Dr. Paulo Michel Roche

Porto Alegre
1999

*Médica Veterinária, UFRGS 1992/1

S294p Schaefer, Rejane

Produção de anticorpos monoclonais contra vírus rábico de origem bovina e caracterização de amostras. / Rejane Schaefer. – Porto Alegre : UFRGS, 1999.

f. 70 – Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Veterinária, Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Porto Alegre, BR-RS, 1999. Paulo Michel Roehé, Orient.

1. Virologia Veterinária 2. Raiva 3. Anticorpo monoclonal 4. Caracterização antigênica 5. Variante I. Roehé, P.M., Orient. II. Título.

Catálogo na fonte
Preparada pela Biblioteca da Faculdade de
Medicina Veterinária da UFRGS



Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Virologia do Centro de Pesquisa Veterinária Desidério Finamor (CPVDF- FEPAGRO) e no Laboratório de Virologia da Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde (FEPPS - LACEN), sendo financiado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS).

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	6
LISTA DE FIGURAS	7
LISTA DE ABREVIATURAS	8
RESUMO	9
1 INTRODUÇÃO	10
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	12
2.1 O vírus rábico	12
2.1.1 Morfologia do vírus rábico	12
2.1.2 Epidemiologia	14
2.1.3 Patogenia	16
2.1.4 Diagnóstico	19
2.1.4.1 Diagnóstico clínico	19
2.1.4.2 Diagnóstico laboratorial	20
2.1.4.3 Diagnóstico <i>in vivo</i>	21
2.2 Relações antigênicas entre os <i>Lyssavirus</i>	22
2.2.1 Classificação dos <i>Lyssavirus</i>	22
2.2.2 Estabilidade antigênica dos <i>Lyssavirus</i>	24
2.3 Anticorpos monoclonais	26
3 MATERIAIS E MÉTODOS	29

3.1 Camundongos	29
3.2 Amostras de vírus	29
3.2.1 Amostra de vírus padrão	29
3.2.2 Amostra de vírus para produção do antígeno.....	30
3.2.3 Amostras de campo	30
3.3 Produção de antígeno para imunização dos camundongos	31
3.3.1 Purificação do vírus por ultracentrifugação.....	32
3.3.2 Produção de suspensão de cérebro de camundongo não inoculado (CCN)	32
3.4 Imunização dos camundongos	32
3.5 Imunofluorescência indireta para avaliação da resposta dos camundongos imunizados	33
3.6 Produção de anticorpos monoclonais	34
3.6.1 Preparo das células e fusão	36
3.6.2 Seleção dos hibridomas positivos	37
3.6.3 Imunofluorescência indireta para a detecção de anticorpos monoclonais	37
3.6.4 Congelamento dos hibridomas.....	38
3.6.5 Clonagem	38
3.6.6 Determinação do isotipo dos anticorpos monoclonais	39

3.7 Caracterização das amostras de vírus	39
3.7.1 Multiplicação do vírus	39
3.7.2 Anticorpos monoclonais utilizados na caracterização das amostras de campo	40
3.7.3 Determinação dos padrões de reatividade de diferentes amostras de vírus rábico por imunofluorescência indireta	40
4 RESULTADOS	42
4.1 Produção de AcMs contra a amostra 1151	42
4.2 Clonagem dos hibridomas	42
4.3 Isotipagem dos AcMs	43
4.4 Imunofluorescência indireta	44
4.5 Determinação do perfil de reatividade de amostras de vírus rábico frente a AcMs	44
5 DISCUSSÃO	46
6 CONCLUSÕES	53
ANEXO A - Diluentes	54
ANEXO B - Meios para cultura de células	56
BIBLIOGRAFIA CITADA	58
ABSTRACT	68
AGRADECIMENTOS	69

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Padrões de reatividade de AcMs frente aos vírus protótipos dos sorotipos 1 a 6 dos *Lyssavirus*..... 24
- Tabela 2.** Origem das amostras de vírus rábico de campo utilizadas na determinação dos perfis de reatividade dos anticorpos monoclonais 31
- Tabela 3.** Anticorpos monoclonais anti-*Lyssavirus*, utilizados na caracterização de amostras de vírus rábico de rua..... 41
- Tabela 4.** Isotipagem dos anticorpos monoclonais para o vírus rábico (amostra 1151) obtidos através do teste de ELISA..... 43
- Tabela 5.** Padrões de reatividade de amostras de vírus rábico de campo frente a AcMs, por IFI..... 45

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. O vírus rábico..... 13

Figura 2. Esquema de produção de anticorpos monoclonais..... 35

LISTA DE ABREVIATURAS

AcM (s) - anticorpo (s) monoclonal (is)

CVS - "Challenge Virus Standard"

CCN - cérebro de camundongo não inoculado

DI - defectivas interferentes (partículas virais)

DMSO - di-metilsulfóxido

ELISA - ensaio imunoenzimático ligado à enzima

HAT - hipoxantina, aminopterina e timidina

HT - hipoxantina e timidina

IFD - imunofluorescência direta

IFI - imunofluorescência indireta

kb - kilobase

KDa - kiloDalton

PBS - solução salina tamponada com fosfatos

PEG - polietilenoglicol

RNA - ácido ribonucléico

SFB - soro fetal bovino

SNC - sistema nervoso central

RESUMO

PRODUÇÃO DE ANTICORPOS MONOCLONAIS CONTRA VÍRUS RÁBICO DE ORIGEM BOVINA E CARACTERIZAÇÃO DE AMOSTRAS

Foram produzidos três hibridomas secretores de anticorpos monoclonais (AcMs) contra uma amostra do vírus rábico de origem bovina. Os AcMs produzidos foram utilizados na caracterização de amostras do vírus rábico isoladas de três espécies animais (bovinos, caninos e quirópteros), provenientes dos Estados do Rio Grande do Sul, Bahia e São Paulo. O painel de AcMs utilizados na avaliação dos perfis de reatividade das amostras incluiu, além dos AcMs produzidos neste estudo, oito AcMs produzidos contra os vírus relacionados à raiva (King, 1991) e um AcM preparado contra a amostra vacinal CVS-31 (Pantoja, 1995). As amostras foram multiplicadas em camundongos e impressões de cérebro foram examinadas por imunofluorescência indireta, utilizando os AcMs como anticorpos primários. Cinco AcMs reconheceram determinantes antigênicos em todas as amostras analisadas. As amostras provenientes de bovinos e morcegos apresentaram perfis de reatividade distintos das amostras provenientes de caninos, mas semelhantes à amostra CVS-31. Um dos três AcMs produzidos neste estudo foi útil na diferenciação entre as amostras originárias de bovinos daquelas provenientes de caninos.

1 INTRODUÇÃO

A raiva, em vias de controle na população canina, continua causando problemas na população bovina do Estado do Rio Grande do Sul, ocasionando prejuízos econômicos e sanitários significativos.

O vírus que ocasiona a raiva bovina faz parte de um ciclo mantido principalmente em morcegos hematófagos, que servem como reservatório do vírus. Além disso, existe uma população significativa de mamíferos terrestres e morcegos não hematófagos, de onde o vírus tem sido eventualmente isolado, cujo papel na epidemiologia da doença e importância como reservatórios ou vetores da raiva não foi ainda suficientemente analisado (Delpietro et al., 1997).

Os anticorpos monoclonais têm possibilitado a caracterização antigênica de amostras do vírus rábico e, em alguns casos, permitido a diferenciação entre amostras originárias de diferentes espécies e de distintas regiões geográficas (Loza-Rubio et al., 1996; Delpietro et al., 1997). Nos últimos anos, a descoberta de variantes conhecidas em novos hospedeiros e a descrição de novas variantes feitas por vários autores enfatizam a necessidade de se incorporar em estudos epidemiológicos anticorpos monoclonais produzidos contra amostras locais do vírus rábico (King, 1991; Loza-Rubio et al., 1996; Delpietro et al., 1997).

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** O vírus rábico..... 13
- Figura 2.** Esquema de produção de anticorpos monoclonais..... 35

LISTA DE ABREVIATURAS

- AcM (s) - anticorpo (s) monoclonal (is)
- CVS - “Challenge Virus Standard”
- CCN - cérebro de camundongo não inoculado
- DI - defectivas interferentes (partículas virais)
- DMSO - di-metilsulfóxido
- ELISA - ensaio imunoenzimático ligado à enzima
- HAT - hipoxantina, aminopterina e timidina
- HT - hipoxantina e timidina
- IFD - imunofluorescência direta
- IFI - imunofluorescência indireta
- kb - kilobase
- KDa - kiloDalton
- PBS - solução salina tamponada com fosfatos
- PEG - polietilenoglicol
- RNA - ácido ribonucléico
- SFB - soro fetal bovino
- SNC - sistema nervoso central

RESUMO

PRODUÇÃO DE ANTICORPOS MONOCLONAIS CONTRA VÍRUS RÁBICO DE ORIGEM BOVINA E CARACTERIZAÇÃO DE AMOSTRAS

Foram produzidos três hibridomas secretores de anticorpos monoclonais (AcMs) contra uma amostra do vírus rábico de origem bovina. Os AcMs produzidos foram utilizados na caracterização de amostras do vírus rábico isoladas de três espécies animais (bovinos, caninos e quirópteros), provenientes dos Estados do Rio Grande do Sul, Bahia e São Paulo. O painel de AcMs utilizados na avaliação dos perfis de reatividade das amostras incluiu, além dos AcMs produzidos neste estudo, oito AcMs produzidos contra os vírus relacionados à raiva (King, 1991) e um AcM preparado contra a amostra vacinal CVS-31 (Pantoja, 1995). As amostras foram multiplicadas em camundongos e impressões de cérebro foram examinadas por imunofluorescência indireta, utilizando os AcMs como anticorpos primários. Cinco AcMs reconheceram determinantes antigênicos em todas as amostras analisadas. As amostras provenientes de bovinos e morcegos apresentaram perfis de reatividade distintos das amostras provenientes de caninos, mas semelhantes à amostra CVS-31. Um dos três AcMs produzidos neste estudo foi útil na diferenciação entre as amostras originárias de bovinos daquelas provenientes de caninos.

1 INTRODUÇÃO

A raiva, em vias de controle na população canina, continua causando problemas na população bovina do Estado do Rio Grande do Sul, ocasionando prejuízos econômicos e sanitários significativos.

O vírus que ocasiona a raiva bovina faz parte de um ciclo mantido principalmente em morcegos hematófagos, que servem como reservatório do vírus. Além disso, existe uma população significativa de mamíferos terrestres e morcegos não hematófagos, de onde o vírus tem sido eventualmente isolado, cujo papel na epidemiologia da doença e importância como reservatórios ou vetores da raiva não foi ainda suficientemente analisado (Delpietro et al., 1997).

Os anticorpos monoclonais têm possibilitado a caracterização antigênica de amostras do vírus rábico e, em alguns casos, permitido a diferenciação entre amostras originárias de diferentes espécies e de distintas regiões geográficas (Loza-Rubio et al., 1996; Delpietro et al., 1997). Nos últimos anos, a descoberta de variantes conhecidas em novos hospedeiros e a descrição de novas variantes feitas por vários autores enfatizam a necessidade de se incorporar em estudos epidemiológicos anticorpos monoclonais produzidos contra amostras locais do vírus rábico (King, 1991; Loza-Rubio et al., 1996; Delpietro et al., 1997).

A raiva em morcegos hematófagos é um problema restrito à América Latina. O estudo das amostras que infectam esta espécie constitui-se em problema que deve ser analisado apropriadamente, com pesquisadores e tecnologia localmente disponíveis. Por este motivo, o presente estudo teve como objetivo específico a produção de anticorpos monoclonais contra uma amostra de vírus rábico de origem bovina, isolada no Estado do Rio Grande do Sul, e caracterização de algumas amostras de vírus obtidas de diferentes espécies, provenientes dos Estados de São Paulo, Rio Grande do Sul e Bahia.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 O vírus rábico

O vírus da raiva pertence à família *Rhabdoviridae*, sendo o protótipo do gênero *Lyssavirus* (Campbell, 1988). Possui um genoma de RNA de fita simples (aproximadamente 12 kb; Tordo et al., 1986), não segmentado e de polaridade negativa, com peso molecular de $4,6 \times 10^6$ KDa (Koprowski, 1991).

O gênero *Lyssavirus* inclui o vírus da raiva e os vírus relacionados com a raiva que são os vírus Lagos bat, Mokola, Duvenhage, EBL1 e EBL 2 (European Bat Lyssavirus 1 e 2) (King, 1993).

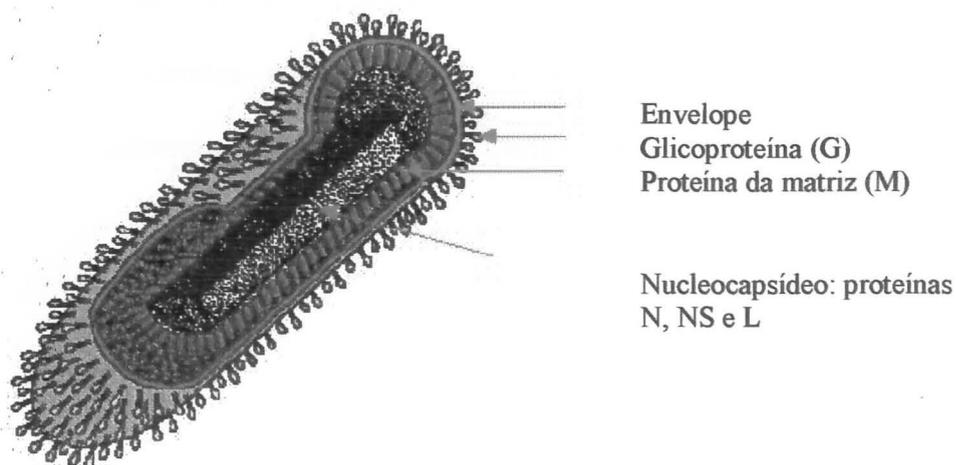
2.1.1 Morfologia do vírus rábico

Os vírions possuem uma forma de bala de revólver com uma extremidade arredondada e uma planar, comprimento médio de 180 nm (130 a 200 nm) e diâmetro de 75 nm (60 a 110 nm). Cada partícula contém um nucleocapsídeo helicoidal circundado por um envelope glicoprotéico (Murphy apud Wunner, 1991). A superfície exterior do vírion é coberta, exceto a terminação planar, com projeções de superfície espiculares, ou peplômeros, de 9 nm de comprimento, distribuídos a

intervalos de 5 nm, e ancorados na bicamada lipídica (Figura 1). Variações observadas no comprimento são devido a diferenças na amostra viral ou presença de partículas interferentes defectivas (DI; Crick apud King, 1993).

Segundo Wunner (1991), o RNA genômico contém cinco genes que codificam cinco proteínas. A nucleoproteína “N”, que envolve o RNA, a transcriptase viral “L” (do inglês “large”), a proteína associada à transcriptase “NS” (originalmente “non- structural”), a proteína da matriz “M” e a glicoproteína “G”, esta última constituinte dos peplômeros.

As proteínas N, NS e L, junto ao RNA genômico, formam o nucleocapsídeo, também denominado ribonucleoproteína (RNP). A proteína M, a proteína G e a bicamada lipídica formam o envelope viral.



Fonte: <http://fiona.umsmed.edu/~yar/zoo.html>

Figura 1. O vírus rábico: as projeções da glicoproteína G aparecem estendendo-se do envelope lipídico que envolve o nucleocapsídeo. A proteína da matriz M é vista acompanhando o envelope e interagindo com a glicoproteína.

As proteínas G e N são as mais extensivamente estudadas. A glicoproteína G é a principal responsável pela indução de anticorpos neutralizantes e estimulação de células T, propriedades que lhe tem conferido um papel importante no estabelecimento da imunidade frente ao vírus rábico (Koprowski, 1991).

A análise de um grande número de amostras do vírus rábico revelou que estas diferem consideravelmente na estrutura antigênica dos aminoácidos constituintes da glicoproteína G. Essa divergência pode ter como consequência alterações nas propriedades antigênicas, patogênicas ou imunogênicas do vírus (Wunner, 1991).

Ao contrário da glicoproteína G, a nucleoproteína N analisada através da reatividade a AcMs apresenta uma menor variação antigênica do que a apresentada pela glicoproteína. Esta maior homologia entre as proteínas N das amostras do vírus rábico permite que anticorpos monoclonais contra ela possam ser usados como ferramentas em estudos epidemiológicos, estabelecendo diferentes padrões de reatividade ou diferentes perfis antigênicos (Wiktor et al., 1980; Dietzschold et al., 1988).

2.1.2 Epidemiologia

A doença é frequentemente observada em carnívoros silvestres e domésticos (caninos e felinos), embora qualquer animal de sangue quente seja suscetível à raiva, em maior ou menor grau. O vírus é mantido na natureza em dois ciclos inter-relacionados: o ciclo urbano e o ciclo silvestre.

A raiva urbana tem como principal transmissor o cão, enquanto a raiva silvestre é caracterizada pelo envolvimento de uma ou duas espécies principais (King, 1993).

Na Europa, a raposa vermelha (*Vulpes vulpes*) é considerada o principal reservatório da doença, enquanto o guaxinim (*Nyctereutes procyonoides*) e o lobo cinzento (*Canis lupus*) são reservatórios em regiões mais ao norte da Eurásia. A raiva canina é prevalente na África, embora seja encontrada raiva silvestre na África do Sul, no mangusto amarelo (*Cynictis penicillata*) e no chacal (*Canis sp*).

Na América do Norte, programas de vacinação reduziram enormemente a raiva em cães e gatos, porém a doença é enzoótica em raposas (*Vulpes vulpes*), gambás (*Mephitis mephitis*) e guaxinins (*Procyon lotor*). Além disso, a raiva em morcegos insetívoros representa 10 a 15% do total de casos relatados nos animais e no homem, e a transmissão da doença a partir do morcego para animais terrestres ocorre ocasionalmente.

A participação dos morcegos na cadeia de transmissão da raiva foi registrada pela primeira vez no início do século XX (Baer, 1991b). Uma ligação definitiva entre mordidas de morcegos hematófagos e raiva paralítica nos bovinos foi estabelecida por Haupt e Rehaag em 1921, e a raiva em morcegos não hematófagos foi diagnosticada pela primeira vez em espécies frugívoras e insetívoras em Trinidad, em 1931 (Pawan apud King, 1990). Porém, só foi dada atenção à doença em morcegos não hematófagos a partir de um caso de raiva humana causado pela mordida de um morcego insetívoro raivoso (*Lasiurus intermedius*), em 1953, na Flórida (Venters apud Smith et al., 1986).

No Brasil, o ciclo silvestre da raiva é mantido por morcegos hematófagos (transmitindo a doença aos bovinos e ocasionalmente ao homem), e o ciclo urbano, pelo cão (Wiktor apud Montano, 1988; Preto; Germano, 1990). Como em outros países da América Latina, o principal vetor da doença é o morcego hematófago *Desmodus rotundus*. Do ponto de vista epidemiológico, os morcegos hematófagos são um dos reservatórios mais importantes do vírus, constituindo o segundo transmissor mais frequente da raiva humana no Brasil (Manual da Fundação Nacional de Saúde, 1996). No entanto, outras espécies de quirópteros são também passíveis de transmitir o agente (Germano, 1994).

A distribuição epidemiológica da raiva no Brasil é atualmente muito heterogênea. Nos últimos anos, cerca de 70% dos casos humanos foram registrados na região Nordeste. O ciclo urbano da enfermidade continua sendo o mais importante. Do total de casos humanos, 83,2% foram transmitidos por cães durante o período de 1980 a 1990 (Schneider et al., 1996). Embora seja bem controlada nos centros urbanos, por meio das campanhas de vacinação, a doença continua seu ciclo nos animais silvestres. Aparentemente, a julgar pelos casos que vêm ocorrendo nesta década no Brasil, a raiva ainda não está sob controle, apesar do desenvolvimento de tecnologias de profilaxia eficientes (Romijn, 1998).

2.1.3 Patogenia

A maioria das infecções pelo vírus rábico é causada pela mordida de animais raivosos ou contato com ferimentos abertos e, raramente, através de membranas mucosas ou transplante de órgãos (córnea) (King, 1993).

O período de incubação da doença, a partir de amostras de vírus de campo, pode variar de 2 a 12 semanas. Entretanto, períodos extremamente longos, superiores a 1 ano, já foram relatados (Smith et al., 1991a). Após a infecção natural, foi demonstrado que o vírus pode replicar-se nas células musculares, próximas ao local da inoculação, antes de invadir o sistema nervoso central (SNC). Esta replicação representa um passo de multiplicação necessário à invasão do sistema nervoso (Murphy e Bauer apud King, 1993; Tsiang, 1993). Contudo, em outras ocasiões pode ocorrer a entrada direta do vírus no SNC sem replicação prévia no músculo (Coulon apud Baer e Lentz, 1991; Shankar et al., 1991).

A fixação do vírus rábico à célula hospedeira é mediada pela glicoproteína G e receptores da superfície celular, resultando na entrada do vírus na célula por fusão com a membrana plasmática (Superti apud Tsiang, 1993) ou por endocitose (White apud Baer e Lentz, 1991). A fusão do envelope com membranas endossomais da célula hospedeira libera o genoma viral no citosol, onde ocorre a transcrição e a replicação.

A entrada do vírus nos nervos periféricos ocorre provavelmente através de receptores, entre eles o receptor de acetilcolina (AChR; Lentz et al., 1982), presente na placa motora terminal, na junção neuromuscular (Watson et al., 1981; Lentz apud Tsiang, 1993). Desta forma, o vírus pode ser conduzido, via terminações nervosas motoras, aos nervos periféricos, alcançando assim o SNC. A infecção de miotubos de embrião de pinto com o vírus rábico é parcialmente inibida com o tratamento prévio dos mesmos com α -bungarotoxina (α -BTX) ou D-turbocurarina, antagonistas do AChR. Contudo, a observação de que certos tipos celulares *in vitro* não expressam o AChR, e são também altamente suscetíveis a infecção pelo vírus rábico, sugere a

existência de outros receptores ou utilização de mecanismos de entrada não relacionados a receptores específicos. Recentemente, foi demonstrado *in vitro* e *in vivo* a utilização de outros receptores celulares pelo vírus rábico, representados pelas moléculas de adesão celular neuronal (NCAM; Thoulouze et al., 1998). Assim constatou-se até o momento que, o vírus pode utilizar no mínimo dois diferentes receptores, AchR e NCAM, para invadir o hospedeiro.

Uma vez dentro dos nervos periféricos, o vírus progride ao sistema nervoso central (SNC) por transporte axoplásmico retrógrado (Tsiang apud King, 1993). De acordo com Baer (1991a), os vírus existentes fora do sistema nervoso periférico podem replicar-se nos gânglios espinhais e a partir daí atingir o cérebro via medula espinhal.

No sistema nervoso, a disseminação viral resulta da combinação de fluxo axoplásmico retrógrado, transmissão célula-célula via junções sinápticas e passagem livre do vírus através de ligações intercelulares (Iwasaki, 1991).

Após a infecção do sistema nervoso, o vírus se distribui pelos nervos periféricos de forma centrífuga para os tecidos não nervosos, já tendo sido detectado em células da epiderme, retina, córnea, glândulas lacrimais, glândulas salivares, pulmões, músculo cardíaco, mucosa gástrica e intestinal, pâncreas, parênquima renal, glândulas adrenais, tecidos neuroepiteliais dos ureteres, bexiga e uretra (Charlton, 1988; Germano et al., 1988a). A replicação do vírus rábico nas glândulas salivares e posterior excreção através da saliva representa o principal mecanismo de perpetuação do vírus na natureza (Schneider, 1991).

Os sinais clínicos aparecem somente após o envolvimento do SNC e a morte ocorre devido ao comprometimento de centros nervosos vitais.

2.1.4 Diagnóstico

2.1.4.1 Diagnóstico clínico

O diagnóstico clínico da raiva em muitos países subdesenvolvidos continua sendo o único existente (King, 1993).

Os sinais iniciais da doença podem não ser notados, mas mudanças no temperamento são observadas tanto nos animais domésticos como nos silvestres.

Os sinais clínicos em cães duram de 2 a 5 dias e em 75% dos casos ocorre progressão para a raiva paralítica, sendo que os 25% restantes desenvolvem a forma furiosa da doença. Paralisia e morte ocorrem nas duas formas da doença cerca de 4 a 8 dias após o início dos sinais clínicos (Bedford apud King, 1993). O vírus pode estar presente na saliva dos cães raivosos muitos dias antes do aparecimento dos sinais clínicos, podendo ser intermitentemente secretado até a morte do animal (Fekadu et al., 1982; King, 1993).

A doença nos bovinos é caracterizada por incoordenação motora, anorexia e sialorréia. Nos estágios finais são observados sinais de apnéia, paroxismo terminal e morte (Baer, 1991b).

A doença clínica no homem, em 80% dos casos é caracterizada por hidrofobia e aerofobia, evoluindo para paralisia e morte (Warrell apud King, 1993).

2.1.4.2 Diagnóstico laboratorial

O diagnóstico laboratorial da raiva baseia-se essencialmente na detecção de antígenos virais em cortes ou fragmentos de tecido nervoso suspeito, ou no isolamento viral.

As técnicas mais utilizadas para a detecção de antígeno viral são a imunofluorescência direta (Goldwasser e Kissling, 1958), a identificação histológica do corpúsculo de Negri (Sureau et al., 1991) e o isolamento viral em camundongos e em cultivos celulares. Também são empregadas técnicas imunoenzimáticas como imunoperoxidase, ensaio imunoadsorvente ligado a enzima (ELISA) e imunodiagnóstico enzimático rábico rápido (RREID; Perrin apud King, 1993).

Vários tipos celulares podem se utilizados para o isolamento viral. Células CER (“chicken embryo-related”), BHK e células de neuroblastoma (NA) podem substituir os camundongos no isolamento viral e diminuir o tempo necessário para o diagnóstico.

O isolamento viral em camundongos é feito através da inoculação intracerebral de animais desmamados (3 a 4 semanas de idade) ou lactentes (menos de 4 dias de idade), sendo que os últimos são mais suscetíveis à infecção pelo vírus rábico (Bagnaroli et al., 1970).

Provas moleculares permitem a detecção do RNA viral no cérebro por “dot blot”, e hibridização *in situ* (Tsiang, 1993). Técnicas de amplificação do ácido nucléico viral pela reação da polimerase em cadeia (PCR) associada a sequenciamento e análise por enzimas de restrição têm sido utilizadas em estudos

epidemiológicos (Sacramento et al., 1992; Bourhy et al., 1992). Estas últimas, entretanto, não são geralmente utilizadas no diagnóstico de rotina.

Para avaliação do estado imune do hospedeiro ou obtenção de informações epidemiológicas são utilizados métodos sorológicos, que detectam anticorpos produzidos em resposta à infecção.

Os testes para a detecção de anticorpos anti-rábicos podem ser divididos em três categorias: (1) testes que medem diretamente a interação entre o antígeno e o anticorpo (ensaios imunoenzimáticos, imunofluorescência indireta e radioimunoensaio), (2) testes que dependem da capacidade do anticorpo, ao interagir com o antígeno, de realizar alguma função não relacionada ao vírus (fixação do complemento, hemaglutinação passiva, contraimunoeletroforese e imunodifusão radial simples), e (3) testes que medem a capacidade do anticorpo de bloquear alguma função viral específica (soroneutralização e inibição da hemaglutinação) (Smith, 1991b).

2.1.4.3 Diagnóstico *in vivo*

Os testes *in vivo* são pouco sensíveis para o diagnóstico da raiva nos animais, sendo úteis somente em casos humanos de encefalite de etiologia viral desconhecida (Smith, 1996). Desta forma, o diagnóstico *in vivo* pode ser realizado a partir da detecção de antígeno viral por IFD em biópsias de pele, impressões de córnea, mucosa oral e nasal (Trimarchi e Debbie, 1991).

2.2 Relações antigênicas entre os *Lyssavirus*

2.2.1 Classificação dos *Lyssavirus*

Com base em estudos de soroneutralização e análise por anticorpos monoclonais, os *Lyssavirus* foram subdivididos em 4 sorotipos. O sorotipo 1 é composto pelo vírus da raiva propriamente dito, cuja amostra protótipo é a “challenge virus standard-24” (CVS-24), derivada da amostra Pasteur (Sacramento et al., 1992), e inclui amostras de vírus fixo e selvagem, além de vírus isolados em morcegos das Américas. Os vírus relacionados com a raiva são o Lagos bat (sorotipo 2), Mokola (sorotipo 3) e Duvenhage (sorotipo 4) (Bourhy et al., 1993a). Recentemente, estudos filogenéticos feitos através da análise de sequências de nucleotídeos ou aminoácidos permitiram o delineamento do gênero *Lyssavirus* em 6 linhagens geneticamente distintas (Bourhy et al., 1993b; Amengual et al., 1997). Além dos 4 sorotipos previamente caracterizados, que são equivalentes aos genótipos 1 - 4, os lissavírus de morcegos europeus (EBL 1 e EBL 2) foram identificados e classificados como genótipos 5 e 6.

O sorotipo 1 tem distribuição mundial, sendo o único até o momento isolado nas Américas. Os sorotipos 2 a 6 estão até o momento identificados no continente africano e Europa.

O vírus Lagos bat foi isolado pela primeira vez em 1956 a partir de morcegos frugívoros (*Eidolon helvum*) da Nigéria (Boulger e Porterfield, 1958), sendo somente caracterizado em 1970 (Smith, 1996). Em 1968, foi identificado o vírus Mokola, isolado de camundongos silvestres (*Crocidura sp*) em Ibadan, África do Sul (Shope

apud King e Crick, 1988). Em 1971, foi isolado o vírus Duvenhage a partir de um caso humano ocorrido na República da África do Sul. A vítima morreu 5 semanas após ter sido mordida no lábio por um morcego insetívoro (Meredith et al., 1971).

A raiva em morcegos europeus foi relatada pela primeira vez em 1954, porém somente em 1985 a doença foi confirmada em um número substancial de morcegos. A maioria dos casos foram detectados na Holanda, norte da Alemanha e Dinamarca, contudo a distribuição geográfica da doença sugere que a mesma está presente há muito tempo, não diagnosticada. O vírus EBL 1 foi isolado de um caso humano na União Soviética, estando associado a morcegos insetívoros da espécie *Eptesicus serotinus*. O EBL 2 foi identificado a partir da morte de um biólogo na Finlândia em 1985 e está associado a espécie *Myotis dasycneme* (Lumio et al., 1986).

King et al. (1990) produziram AcMs dirigidos contra o nucleocapsídeo dos vírus relacionados com a raiva, Lagos bat, Mokola, Duvenhage e de vírus provenientes de morcegos da Dinamarca (Denmark bat, atualmente denominado de EBL 1). Com eles, os autores analisaram amostras de vírus rábico provenientes de morcegos hematófagos, insetívoros e frugívoros das Américas, África, Europa e União Soviética, e compararam estes isolados com aqueles originados de espécies terrestres, incluindo o homem. Os resultados confirmaram a presença do biotipo II (EBL 2) em morcegos europeus. Os perfis de reatividade de alguns destes AcMs frente às amostras protótipos dos sorotipos dos *Lyssavirus* são mostrados na Tabela 1.

Tabela 1. Padrões de reatividade de AcMs frente aos vírus protótipos dos sorotipos 1 a 6 dos *Lyssavirus*.*

Sorotipos	AcMs								
	L		DB			D	M		
	3	18	1	3	4	9	3	11	
1- CVS-24	+		+	+	+				
2- Lagos bat	+	+	+	+	+				
3- Mokola				+	+			+	
4- Duvenhage	+		+	+	+		+		
5- EBL 1			+	+	+	+	+		
6- EBL 2			+	+	+		+	+	

+ = Reação positiva, espaço branco = reação negativa.

Na tabela original (King, 1991), EBL 1 foi denominado "Denmark bat" e EBL 2 de "Finman".

L= Lagos bat

DB= Denmark bat

D= Duvenhage

M= mokola

EBL= European Bat Lyssavirus

*Adaptado de King (1991).

2.2.2 Estabilidade antigênica dos *Lyssavirus*

O vírus da raiva foi considerado como um único sorotipo até que análises com AcMs revelaram considerável variação nos determinantes antigênicos das proteínas G e N (Wiktor e Koprowski, 1978). Contudo, o significado desta variação e os mecanismos que a promovem não estão ainda completamente definidos.

Diferenças antigênicas encontradas entre amostras do vírus rábico isoladas de várias espécies animais e áreas geográficas distintas, frente a AcMs, poderiam ser explicadas pelo acúmulo de mutações espontâneas e modificações virais que ocorreriam por mecanismo de seleção imune no hospedeiro (Rupprecht et al., 1991).

Infecções virais persistentes em cultura de célula heteróloga, ou passagens seriadas em animais, poderiam alterar o fenotipo viral original e introduzir “artefatos laboratoriais” nas análises (Koprowski, Wiktor, Prabhakad apud Rupprecht, 1991). Estas limitações poderiam comprometer a validade da classificação atual dos *Lyssavirus*, o diagnóstico, e a pesquisa epidemiológica com AcMs.

Para avaliar a estabilidade antigênica das variantes do vírus rábico de campo foram realizados experimentos, e analisada a estabilidade dessas variantes após infecção seriada de várias espécies animais, cultivo de células, recuperação do vírus após falha vacinal aparente, e isolamento do vírus do cérebro e glândula salivar de animais naturalmente infectados (Rupprecht et al., 1991). Os resultados demonstraram que as amostras mantiveram-se estáveis antígenicamente após infecções contínuas em vários tipos de cultivo celular, assim como após um número limitado de transmissão experimental interespecies (Rupprecht et al., 1991). Foi considerado que os dados existentes nas caracterizações de amostras feitas em várias partes do mundo enfatizam a "estabilidade inerente dos vírus rábicos em situações experimentais ou naturais", e ainda, que "o grau limitado de variações induzidas por procedimentos laboratoriais parece ter pouco impacto sobre as conclusões tiradas de tais análises antigênicas" (Wiktor, Koprowski, 1982; Dietzschold et al., 1988; Rupprecht et al., 1991).

Por outro lado, segundo Domingo (1985), a variação antigênica observada entre amostras do vírus rábico pode também ser explicada pela natureza de quasispécie dos vírus RNA, na qual populações clonadas (ou não) dos vírus RNA não consistem de uma única espécie genômica de sequência definida, mas de misturas heterogêneas de genomas relacionados (ou quasispécies), que compartilham

uma sequência de consenso, mas diferem uma da outra e da sequência consenso por uma ou muitas mutações. Desta forma, a heterogeneidade do vírus rábico foi demonstrada pela descoberta de sete sequências distintas na glicoproteína do vírus isolado do cérebro de um cão raivoso (Benmansour et al., 1992). Além disso, foi documentada a seleção de uma variante antigênica de um isolado humano que havia sido adaptada para crescimento em cultivo celular, mostrando que a variação antigênica do vírus da raiva não resulta necessariamente de seleção imune (Domingo et al., 1993).

2.3 Anticorpos monoclonais

O desenvolvimento dos anticorpos monoclonais teve início em 1975 quando Köhler e Milstein demonstraram que clones individuais de células secretoras de anticorpos normais poderiam ser imortalizados pela fusão com células de mieloma (Goding, 1980).

Os primeiros AcMs contra o vírus rábico foram produzidos por Wiktor e Koprowski (1978) após a imunização de camundongos BALB/c com vacina inativada contra a raiva. Em experimentos de neutralização viral, utilizando esses AcMs, foi demonstrado que existiam diferenças na composição antigênica de amostras de vírus rábico fixo e de rua. Os AcMs utilizados em testes de imunofluorescência, radioimunoensaio e proteção cruzada foram capazes de proteger camundongos frente a um desafio letal com o vírus rábico e reconhecer determinantes antigênicos da glicoproteína e do nucleocapsídeo, comuns à glicoproteína e proteínas do nucleocapsídeo e de especificidade desconhecida.

A disponibilidade de um painel composto por AcMs para a caracterização antigênica de isolados do vírus da raiva tem permitido a classificação de amostras de vírus de acordo com seu padrão de reatividade frente aos AcMs em provas de imunofluorescência indireta e neutralização viral (Schneider, 1982; Dietzschold et al., 1988). Isto possibilitou a elaboração de perfis antigênicos que podem confirmar a existência de variantes de determinadas amostras (Antezac apud Germano et al., 1988b). AcMs dirigidos contra a proteína G do vírus rábico têm sido usados na diferenciação entre vírus da raiva fixo e de rua (isolados de campo) (Flamand et al., 1980b; Dietzschold et al., 1988; Schneider apud Umoh et al., 1990a). AcMs dirigidos contra o nucleocapsídeo têm sido utilizados para diferenciar vírus da raiva e outros lissavírus a ele relacionados (Wiktor et al., 1980; Flamand et al., 1980a; Dietzschold et al., 1988). Estes anticorpos também têm sido úteis em estudos epidemiológicos, permitindo a análise da distribuição geográfica de amostras de vírus e sua associação com determinados hospedeiros, fornecendo informações sobre a estabilidade genética das amostras de vírus *in vivo* (Sureau et al., 1983) e sugerindo fontes potenciais de exposição para o homem e os animais domésticos (Rupprecht et al., 1987).

Desta forma, a caracterização de amostras do vírus rábico de três casos humanos fatais, sem qualquer história de exposição prévia desde a imigração para áreas dos Estados Unidos, pôde ser feita levando à conclusão de que a infecção havia ocorrido fora dos EUA e o período de incubação havia sido de 4 anos, 6 anos e 16 meses. A caracterização dos isolados dos três casos através de painéis de anticorpos monoclonais e por sequenciamento parcial do ácido nucleico viral após a amplificação de parte do genoma pela reação da polimerase em cadeia (PCR)

mostrou que as amostras infectantes foram semelhantes daquelas circulantes em cães dos países de origem das vítimas: Laos, Filipinas e México (Smith et al., 1991a).

Aghomo e Rupprecht (1990), analisando isolados do vírus rábico de cães vacinados que haviam morrido de raiva, provaram que a infecção não havia sido causada pela vacina. A comparação do perfil antigênico das amostras do vírus rábico provenientes dos animais e da vacina administrada, frente a um painel de AcMs anti-glicoproteína, mostrou diferenças entre estes isolados do vírus rábico e a amostra vacinal utilizada na profilaxia da doença.

A utilização de AcMs na caracterização de amostras do vírus rábico tornou possível a determinação de características epidemiológicas da doença pela demonstração da variabilidade antigênica do vírus rábico em diferentes regiões do mundo (Loza-Rubio et al., 1996). Alguns autores sustentam que esta variabilidade estaria associada à espécie animal que alberga o vírus (Rupprecht et al., 1987; Umoh et al., 1990b; Pantoja, 1995), à área geográfica de origem (Sureau et al., 1983) ou a ambos (Smith et al., 1986; Dietzschold et al., 1988; Umoh et al., 1990a; King et al., 1990). Todavia, outros autores não encontraram nenhuma associação (Germano et al., 1990).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

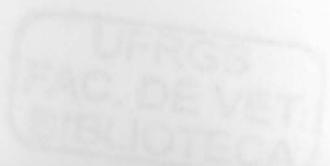
3.1 Camundongos

Os camundongos utilizados neste trabalho foram obtidos do biotério da Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde (FEPPS). Para a multiplicação de amostras do vírus rábico foram utilizados camundongos suiço-albinos da linhagem CF1 com 3 a 4 semanas de idade e peso entre 11 e 14 g. Para a produção dos anticorpos monoclonais foram utilizados camundongos BALB/c com 6 semanas de idade.

3.2 Amostras de vírus

3.2.1 Amostra de vírus padrão

A amostra CVS-31 foi obtida do Laboratório de Virologia da Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde (FEPPS), utilizada com uma passagem na inoculação dos camundongos usados como controle positivo na comparação dos perfis de reatividade das diferentes amostras de vírus.



3.2.2 Amostra de vírus para produção do antígeno

A amostra de vírus rábico denominada 1151, originada de um caso de raiva bovina ocorrido na cidade de Camaquã-RS, foi obtida do Centro de Pesquisa Veterinária Desidério Finamor (CPVDF- FEPAGRO). Esta amostra foi submetida a sete passagens em camundongos CF1 e utilizada na imunização dos camundongos para a produção de anticorpos monoclonais (AcMs), bem como para o preparo de lâminas.

3.2.3 Amostras de campo

Para a análise do perfil de reatividade dos AcMs foram utilizadas 14 amostras de vírus rábico de campo obtidas do CPVDF, isoladas de casos de raiva bovina ocorridos no Estado do Rio Grande do Sul. Além destas, foram utilizadas 2 amostras isoladas de quirópteros não hematófagos no Estado de São Paulo e 3 amostras oriundas de caninos provenientes do Estado da Bahia. As amostras foram utilizadas com uma passagem em cérebro de camundongos e estão listadas na Tabela 2.



Tabela 2. Origem das amostras de vírus rábico de campo utilizadas na determinação dos perfis de reatividade dos anticorpos monoclonais.

Amostra (*)	Espécie de origem	Cidade	Estado
01 (2138)	Quiróptera	São Paulo	SP
02 (1024)	Quiróptera	São Paulo	SP
03 (166)	Bovina	Sto Antonio da Patrulha	RS
04 (069)	Bovina	Gramado	RS
05 (168)	Bovina	Osório	RS
06 (086)	Bovina	Osório	RS
07 (201)	Bovina	Nova Petrópolis	RS
08 (083)	Bovina	Vale do Sol	RS
09 (062)	Bovina	Nonoai	RS
10 (187)	Bovina	Osório	RS
11 (189)	Bovina	Osório	RS
12 (207)	Bovina	Vera Cruz	RS
13 (148)	Bovina	Vale do Sul	RS
14 (117)	Bovina	Bom Retiro do Sul	RS
15 (158)	Bovina	Venâncio Aires	RS
16 (075)	Bovina	Osório	RS
17 (556)	Canina	Plataforma	Ba
18 (577)	Canina	7 de Abril	Ba
19 (028)	Canina	Lamarão de Passé	Ba

As amostras de vírus isoladas de quirópteros não hematófagos foram obtidas do Centro de Controle de Zoonoses CCZ-4 (SP), gentilmente cedidas pela Med. Vet. Elizabeth Amatuzzi da Costa Aguiar e Marilene Almeida. As de caninos foram doadas pelo Laboratório Central de Saúde Pública (Ba) pela Med. Vet. Conceição Nagatta e as de bovinos oriundas do CPVDF- FEPAGRO (RS).

*Número das amostras segundo protocolo dos laboratórios de origem.

3.3 Produção de antígeno para imunização dos camundongos

Cérebros de 50 camundongos, com 4 semanas de idade, inoculados com a 7ª passagem do vírus 1151, com título de 10^6 DL50/ 0,03 ml foram coletados, pesados, diluídos em PBS pH 7,4 (ANEXO A) e triturados em homogeneizador ("Omni Mixer", Sorvall) a 16000 rotações por minuto por 4 ciclos de 4 minutos por 1 de intervalo. O material homogeneizado foi diluído a 2% (2g de cérebro em 100ml de diluente) em PBS pH 7,4 e centrifugado a 2500 x g durante 10 minutos. Ao

sobrenadante coletado foi adicionado beta-propiolactona (1: 4000), fenol (1: 1000) e timerosal (1: 10000). A suspensão foi distribuída em frascos de 10 ml e mantida a 4° C.

3.3.1 Purificação do vírus por ultracentrifugação

A suspensão viral foi clarificada por 2 ciclos de centrifugação a 18000 x g durante 20 minutos. O sobrenadante coletado foi colocado sobre um colchão de sacarose a 45% e centrifugado a 100.000 x g durante uma hora (Sorvall, rotor AH629). O “pellet” formado foi ressuspendido em PBS pH 7,4 e conservado a -70°C .

3.3.2 Produção de suspensão de cérebro de camundongo não inoculado (CCN)

Para controle negativo do teste de imunofluorescência indireta (IFI), cérebros de 5 camundongos não infectados, com 4 semanas de idade, foram coletados, pesados e diluídos a 2% (p/v) em PBS pH 7,4 e centrifugados a 2500 x g durante 10 minutos. A suspensão foi armazenada a -20°C.

3.4 Imunização dos camundongos

Dois grupos de camundongos da linhagem BALB/c com 6 semanas de idade foram imunizados com doses de 0,5 ml dos antígenos descritos anteriormente, por via intraperitoneal, nos dias 0, 21 e 28. O primeiro grupo foi imunizado com o

antígeno vacinal não purificado (item 3.3), inativado. O segundo grupo foi imunizado com o antígeno purificado (item 3.3.1), não inativado. O antígeno vacinal foi emulsionado com adjuvante incompleto de Freund somente na primeira dose para ambos os grupos. O sangue dos camundongos foi coletado 7 a 10 dias após a 3^a dose e os soros analisados por IFI. Os camundongos com maior título de anticorpos foram separados para as primeiras fusões e as amostras de soro coletadas foram estocadas a -20°C e usadas como controles positivos. Os camundongos selecionados receberam uma dose de reforço (0,5ml) do antígeno, via intraperitoneal, 3 dias antes da fusão.

3.5 Imunofluorescência indireta para avaliação da resposta dos camundongos imunizados

Impressões em lâminas para imunofluorescência foram feitas com cortes transversais do encéfalo de camundongos infectados com a amostra 1151. As lâminas foram fixadas em acetona a -20°C por 30 minutos. Diluições das amostras de soro (1: 200 a 1: 1600) foram distribuídas sobre as lâminas e incubadas em câmara úmida a 37°C por 30 minutos. Foram incluídos como controles soro policlonal positivo (1: 1000) e negativo, preparados em CCN 2% em PBS pH 7,4 (em uma etapa prévia ao teste de IFI amostras de soro controle positivo e negativo foram incubadas com CCN (1: 5) durante 30 minutos em estufa a 37°C, para a adsorção de anticorpos não específicos). Após a incubação as lâminas foram lavadas em PBS pH 7,4 (1x10 e 1x5 minutos) e água destilada (1x5 e 1x2 minutos), para retirada de anticorpos não adsorvidos, e secadas com ar quente. A seguir, foi adicionado o conjugado (anti-imunoglobulina de camundongo/ fluoresceína; Dako), previamente

titulado, diluído a 1: 240 em PBS pH 8,5 (ANEXO A) contendo azul de Evans a 1: 100.000. Após a 2ª etapa de incubação e lavagens com PBS pH 8,5 e água destilada, foi adicionada uma lamínula sobre uma gota de glicerol a 50% em PBS pH 8,5 e as lâminas levadas ao microscópio de imunofluorescência (Axiolab, Carl Zeiss).

3.6 Produção de anticorpos monoclonais

Os hibridomas secretores de AcMs contra o vírus rábico foram obtidos através da fusão de células de mieloma SP₂O-Ag14 com esplenócitos de camundongos BALB/c (Harlow e Lane, 1988) imunizados com a amostra 1151, conforme descrito a seguir e demonstrado pela Figura 2.

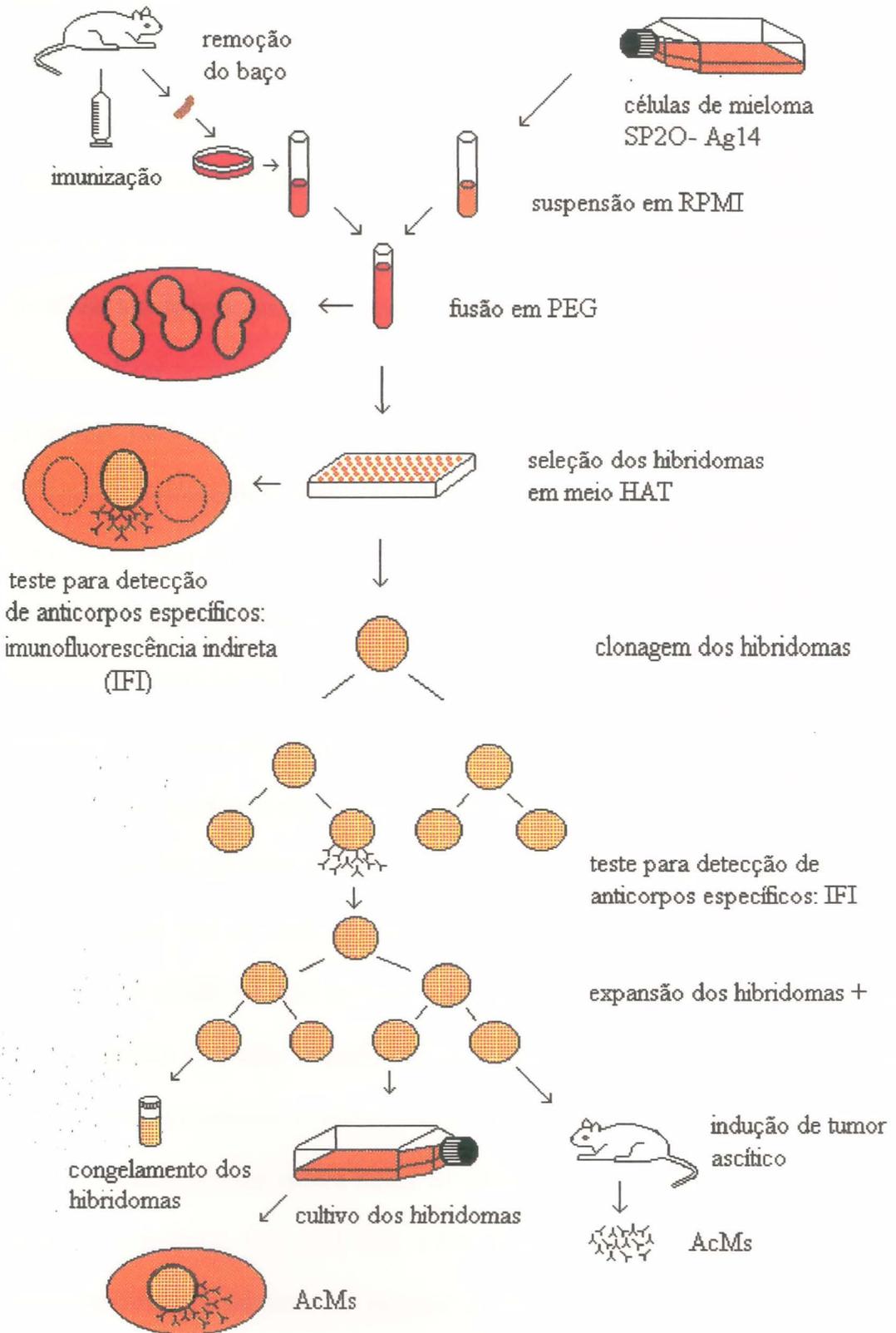


Figura 2. Esquema de produção de anticorpos monoclonais

3.6.1 Preparo das células e fusão

As células de mieloma SP₂O-Ag14 foram obtidas do Laboratório de Virologia da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), mantidas em cultura, em meio RPMI-1640 (ANEXO B) suplementado com 8% de soro fetal bovino (SFB) e divididas à proporção de 1: 20 a cada três dias.

Para o procedimento de fusão, as células, com repique de 24 horas à proporção de 1: 2, foram coletadas, lavadas duas vezes em meio RPMI-1640/ sem SFB por centrifugações a 650 x g durante 10 minutos, ressuspensas em 10 ml de meio e contadas em câmara de Neubauer. Paralelamente, os esplenócitos foram extraídos do baço, do camundongo imunizado, momentos antes do procedimento da fusão, ressuspensos em 10 ml de meio RPMI-1640 e transferidos para um tubo de centrífuga. A seguir, foram lavados duas vezes em meio RPMI-1640 e contados. As células SP₂O-Ag14 e os esplenócitos foram misturados nas proporções 1: 4 a 1: 8 e lavados uma vez em meio RPMI. O sobrenadante foi descartado e sobre o “pellet” foi adicionado 1ml de uma solução de polietilenoglicol (PEG), diluído em RPMI (50% v/v). A adição do PEG foi feita gota a gota com o tubo imerso em banho-maria a 37°C durante 1 minuto, seguidos de mais 1 minuto de agitação com movimentos leves, de forma a permitir o choque e fusão das células.

Imediatamente após a fusão, as células foram diluídas em 15ml de RPMI, sendo acrescentados: 1ml, 2ml, 4ml, e 8ml, a cada minuto. A suspensão celular foi então centrifugada durante 10 minutos a 650 x g, e o “pellet” ressuspensado delicadamente em meio HAT (ANEXO B) com 20% SFB. As células foram

distribuídas em 5 microplacas de 96 poços (100ul/ poço), e incubadas a 37°C em estufa umidificada contendo 5% CO₂.

3.6.2 Seleção dos hibridomas positivos

Os hibridomas foram mantidos em meio HAT com 20% SFB durante 14 dias, com adição de meio (50ul/ poço) no 3º dia e trocas de meio (75ul) a cada 3 ou 4 dias. Após este período o meio foi substituído por meio HT (ANEXO B) com 10% SFB durante mais 4 trocas, e a seguir foi utilizado apenas meio RPMI com 10% SFB. A partir do 7º dia as placas foram observadas em microscópio invertido e os poços contendo células em proliferação foram registrados. A partir do momento em que o crescimento celular atingiu um terço do poço da microplaca (por volta do 10º-14º dia de cultivo) foi iniciada a coleta dos sobrenadantes (75ul) para a seleção inicial dos hibridomas secretores de anticorpos, através do teste de IFI.

Os hibridomas positivos foram expandidos sequencialmente para placas de 24 e 6 poços, quando teve início o processo de clonagem. A cada etapa de expansão os hibridomas foram reavaliados quanto à secreção de anticorpos específicos.

3.6.3 Imunofluorescência indireta para a detecção de anticorpos monoclonais

Sobrenadantes de cultura de hibridomas puros foram colocados sobre lâminas previamente preparadas com impressões de encéfalo infectado. Como controle negativo do teste foi utilizado o sobrenadante de um hibridoma reativo para o BHV-1 e 5 (herpesvírus bovino 1 e 5; Silva, 1995). O restante do teste seguiu o mesmo protocolo utilizado para a detecção dos anticorpos policlonais (item 3.5). Foi

considerado positivo o sobrenadante de cultivo que apresentou fluorescência detectável ao microscópio.

3.6.4 Congelamento dos hibridomas

Para a etapa de congelamento, as células foram centrifugadas, e o “pellet” celular ressuspense em meio de congelamento de células contendo 90% de soro fetal bovino e 10% de DMSO (dimetilsulfóxido) (Dawson, 1992). A seguir as células foram distribuídas em frascos de congelamento, mantidas por 4 horas a 4° C, durante à noite a -70°C e após, transferidas ao Nitrogênio líquido.

3.6.5 Clonagem

Foram selecionados para clonagem os hibridomas positivos à IFI. A clonagem dos hibridomas foi feita por diluição limitante, a partir da placa de 6 poços, como segue: as células híbridas a serem clonadas foram contadas, diluídas em meio RPMI-1640 suplementado com 20% SFB e 5% de meio condicionado (ANEXO B) de forma a conter 2, 1 e 0,5 células por 100 ul, distribuídas em placas de 96 poços (um terço da placa por diluição) e incubadas. Os hibridomas foram selecionados pelo teste de IFI e clonados duas vezes até que todos os clones testados mostrassem estar secretando o anticorpo desejado. Paralelamente, cada hibridoma clonado foi expandido em garrafa de 25 cm² e congelado.

Os hibridomas clonados foram mantidos em garrafas de 80 cm² até a morte celular. A retirada das células mortas foi feita por centrifugação, e o sobrenadante coletado e conservado a 4°C para testes subsequentes.

3.6.6 Determinação do isotipo dos anticorpos monoclonais

Foi utilizado um “kit” anti-isotipo de camundongo, adquirido comercialmente (Sigma). O teste utilizado foi do tipo ELISA de captura, executado de acordo com as recomendações do fabricante.

3.7 Caracterização das amostras de vírus

3.7.1 Multiplicação do vírus

A multiplicação do vírus das amostras de vírus rábico de campo foi feita através da inoculação intracerebral de uma suspensão a 10% de cada amostra original (10g cérebro infectado pelo vírus rábico em 100ml diluente), em 4 camundongos de 3 a 4 semanas de idade (0,03ml). Os camundongos foram observados diariamente para a presença dos sinais clínicos da raiva e, quando em grau máximo de prostração, foram sacrificados, e seus cérebros conservados a -20°C.

3.7.2 Anticorpos monoclonais utilizados na caracterização das amostras de campo

Além dos AcMs produzidos neste estudo foram utilizados 8 AcMs dirigidos contra a nucleoproteína do vírus rábico, gentilmente cedidos pelo Dr. Arthur King e o AcM E5A7 (CVS-2) produzido contra a amostra padrão CVS-31 em estudo prévio (Pantoja, 1995) (Tabela 3).

3.7.3 Determinação dos padrões de reatividade de diferentes amostras de vírus rábico por imunofluorescência indireta

A determinação dos padrões de reatividade foi feita pelo teste de IFI, como descrito no item 3.5. Foram preparadas lâminas contendo impressões do encéfalo dos camundongos inoculados com as diferentes amostras de vírus rábico e sobre elas foram distribuídas diluições dos AcMs selecionados por King (1991), em PBS pH 7,4, e sobrenadantes de cultura dos AcMs CVS-2, 5A3, 5G2 e 7C1 (puros). Para controle das reações, lâminas com a amostra de vírus 1151 e CVS-31 acompanharam todos os testes. As reações foram classificadas em + (presença de fluorescência) e - (sem reação).

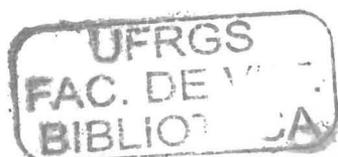


Tabela 3. Anticorpos monoclonais anti- *Lyssavirus*, utilizados na caracterização de amostras de vírus rábico de rua.

<i>Lyssavirus</i>	AcMs
Raiva clássica	5A3 ¹ , 5G2 ¹ , 7C1 ¹ e CVS-2 ²
Lagos bat	L3 ³ e L18 ³
Mokola	M11 ³
Duvenhage	D3 ³
Denmark bat	DB1 ³ , DB3 ³ , DB4 ³ e DB9 ³

¹AcMs desenvolvidos neste estudo

²AcM desenvolvido por Pantoja, 1995

³AcMs selecionados por King, 1991.

4 RESULTADOS

4.1 Produção de AcMs contra a amostra 1151

Foram obtidos $1,38 \times 10^8$ esplenócitos e misturados a $1,91 \times 10^7$ SP₂O-Ag14 (proporção 1 : 7). Após a fusão, as células foram distribuídas em 5 placas de 96 poços (100ul/ poço). No 11º dia foram contados 186 poços contendo hibridomas, dos quais 107 foram testados, e 39 (36,4%) foram positivos (secretores de imunoglobulina para o vírus rábico) no teste de IFI. Destes, 11 hibridomas foram clonados e 4 selecionados para os estudos aqui descritos.

4.2 Clonagem dos hibridomas

Os 4 hibridomas selecionados foram clonados duas vezes, expandidos e congelados em Nitrogênio líquido. Os hibridomas selecionados foram denominados 5A3, 5G2, 7C1 e 6C4, de acordo com a origem dos mesmos nas placas.

4.3 Isotipagem dos AcMs

Os AcMs produzidos mostraram pertencer à classe IgG, subclasse 1 e 2a (Tabela 4).

Tabela 4. Isotipagem dos anticorpos monoclonais para o vírus rábico (amostra 1151) obtidos através do teste de ELISA.

AcMs	Classe/ Subclasse de imunoglobulinas
5A3	IgG 2a
5G2	IgG 1
7C1	IgG 1
6C4	IgG 1

4.4 Imunofluorescência indireta

Os AcMs 5A3 e 5G2 mostraram reação positiva forte no teste de IFI. O AcM 7C1 mostrou reação de média intensidade e o AcM 6C4 mostrou reação extremamente fraca sendo, portanto, excluído da determinação dos perfis de reatividade.

4.5 Determinação do perfil de reatividade de amostras de vírus rábico frente a AcMs

Os resultados da análise das amostras de vírus de campo frente aos AcMs 5A3, 5G2, 7C1 e CVS-2 e aos AcMs anti-*Lyssavirus* são mostrados na tabela 5.

Para cada amostra foram feitas no mínimo duas repetições do teste. No caso do segundo teste ser diferente do primeiro foram feitas mais repetições, sendo considerada para fins de análise, como padrão, o perfil de reatividade que mais apareceu. Reações extremamente fracas não foram consideradas neste estudo.

Os AcMs 5A3, 5G2, CVS-2, L3 e DB1, identificaram determinantes antigênicos em todas as amostras testadas. Os AcMs DB9, D3 e M11 não apresentaram reação frente a nenhuma amostra analisada. O AcM L18 reagiu frente a uma amostra originária de morcego. Os AcMs DB3 e DB4 reagiram às amostras provenientes de bovinos, morcegos e CVS-31 e não reagiram com as amostras originárias de caninos. O AcM 7C1 reconheceu determinantes antigênicos em todas as amostras provenientes de bovinos e de morcegos e somente em uma das amostras caninas.

Tabela 5. Padrões de reatividade de amostras de vírus rábico de campo frente a AcMs, por IFI.

AMOSTRA Nº	5A3	5G2	7C1	CVS-2	L3	L18	DB1	DB3	DB4	DB9	D3	M11
Morcego 01	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
Morcego 02	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-
Bovino 03	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-
Bovino 04	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-
Bovino 05	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-
Bovino 06	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-
Bovino 07	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-
Bovino 08	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-
Bovino 09	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-
Bovino 10	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-
Bovino 11	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-
Bovino 12	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-
Bovino 13	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-
Bovino 14	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-
Bovino 15	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-
Bovino 16	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-
Canino 17	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-
Canino 18	+	+	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-
Canino 19	+	+	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-
CVS-31	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-
1151	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-

+ = Reação positiva; - = Reação negativa.

5 DISCUSSÃO

Os anticorpos monoclonais têm sido utilizados na determinação de padrões de reatividade de distintas amostras de vírus rábico, permitindo, entre outros, estudos de prevalência e distribuição geográfica de variantes antigênicas e sua transmissão entre diferentes espécies animais (Loza-Rubio et al., 1996; Delpietro et al., 1997). A possibilidade do surgimento de tais variantes faz com que sejam necessários métodos de diagnóstico e caracterização de amostras rápidos e eficientes, de forma a detectá-las o mais cedo possível, para a implementação de medidas de controle cabíveis. Como exemplo, na América do Norte, foi recentemente isolada uma variante de morcegos, cuja principal característica biológica é a capacidade de replicação em temperaturas mais baixas, como a temperatura encontrada nas células da epiderme. Desta forma, uma pequena quantidade de vírus, superficialmente administrada, poderia ser suficiente para causar infecção e doença mortal (Morimoto et al., 1996).

Diversos autores relatam a necessidade de se incorporar em estudos epidemiológicos AcMs contra amostras locais (King, 1991; Loza-Rubio et al., 1996; Delpietro et al., 1997). Por este motivo, foram produzidos, pela primeira vez no nosso país, anticorpos monoclonais contra uma amostra do vírus rábico de campo, de origem bovina, proveniente do Estado do Rio Grande do Sul.

A primeira etapa do trabalho foi a escolha da amostra a ser utilizada nas imunizações. Considerando ser o morcego o segundo animal transmissor da raiva para o homem (Manual da Fundação Nacional de Saúde, 1996), os relatos de falha vacinal e casos exóticos, como o citado anteriormente, com infecção por amostras originárias de morcegos, há interesse de que sejam produzidos AcMs contra este tipo de amostra. Entretanto, as amostras de morcegos hematófagos, submetidos para diagnóstico de raiva são raras, enquanto as amostras de bovinos são relativamente abundantes. Além disso, a presença de sinais de mordidas de morcegos hematófagos em bovinos, hospedeiro terminal do vírus na natureza, indica que sua fonte primária é o morcego. Assim sendo, a amostra 1151 foi selecionada a partir de um caso de raiva bovina.

O próximo passo foi a produção de um antígeno viral com título adequado à imunização dos camundongos destinados às fusões. É conhecida a dificuldade de obtenção de altos títulos de vírus com amostras de campo. Por isso, foram feitas 7 passagens a fim de se obter um imunógeno satisfatório, capaz de estimular eficientemente a resposta imune nos camundongos. Este procedimento implicou em um risco, que foi considerado. A natureza de quasispécie do vírus rábico leva a que ocorram mutações durante seus ciclos replicativos (Domingo et al., 1985). Assim sendo, existia um risco de induzir alterações genômicas, que poderiam se refletir em alterações antigênicas na amostra, ocasionando o surgimento de determinantes antigênicos não presentes nas amostras originais. Embora outros autores tenham levantado os problemas potencialmente advindos destas múltiplas passagens, referindo-se particularmente a métodos de identificação de vírus baseados em ampliações genômicas (Sacramento et al., 1992), o vírus rábico tem sido

reconhecido como um vírus muito estável antígenicamente após infecções contínuas em vários tipos de cultivo celular, assim como após um número limitado de transmissão experimental interespecies (Rupprecht et al., 1991). Por essa razão, e considerando que sem um número adequado de passagens não seria possível alcançar um título mínimo imunogênico, maior que 10^5 DL50/0,03ml (Habel, 1976), optou-se pelas passagens da amostra 1151 em camundongo até que fosse obtido um título aproximado de 10^6 DL50/0,03ml.

As primeiras fusões realizadas tiveram baixa eficácia, com um número muito pequeno de células híbridas e ausência de células secretoras. Este fato fez com que fosse tentada a purificação do antígeno, conforme recomendado por outros autores (Wiktor e Koprowski, 1978), com o objetivo de aumentar as chances de obtenção de hibridomas de interesse. A purificação levou a uma maior eficácia na fusão, tendo sido obtido uma proporção de cerca de 36,4% de células secretoras de anticorpos anti-rábicos. Contudo, em um segundo teste, 10 hibridomas pararam de secretar anticorpos. Este fato, é um evento comum durante a produção de hibridomas sendo explicado por sua instabilidade quanto à secreção de anticorpos, provavelmente em razão da configuração instável dos cromossomos, muitas vezes apresentada pelas células híbridas após a fusão (Harlow e Lane, 1988).

A escolha do teste para avaliação dos soros e sobrenadantes dos hibridomas foi feita com base no trabalho de Pantoja, (1995), que considerou a IFI como o teste ideal para a seleção dos hibridomas, o mesmo no qual os AcMs serão utilizados posteriormente, tendo em vista ter obtido 2 AcMs selecionados pelo teste de ELISA, que não reagiram à IFI. Entretanto, para a seleção de hibridomas, a IFI evidenciou limitações, principalmente decorrente do grande número de amostras a ser testada

diariamente.

Devido à limitação encontrada, decidiu-se que nos próximos trabalhos os primeiros testes de seleção dos hibridomas, quando o número de amostras a testar for muito grande, deverão ser feitos pelo teste de ELISA indireto, que tem a vantagem de ser mais rápido. A seguir, as amostras positivas deverão ser testadas quanto à sua reação ao teste de IFI, que será aquele a ser usado nas caracterizações.

No presente estudo não foi possível determinar em que proteínas do vírus encontram-se os epitopos reconhecidos pelos AcMs obtidos. Esta caracterização deverá ser objeto de trabalhos futuros. Com base em estudos prévios (Wiktor e Koprowski, 1978), reações puntiformes observadas à IFI, tais como as observadas com os anticorpos aqui obtidos, sugerem que os mesmos reconhecem determinantes antigênicos do nucleocapsídeo. Reações difusas indicariam a presença de anticorpos contra a glicoproteína do envelope viral. Como os AcMs aqui obtidos apresentaram reações puntiformes claras sobre os esfregaços, é muito provável que os mesmos sejam anticorpos anti-proteínas do nucleocapsídeo. Contudo, esta hipótese deverá ser futuramente confirmada em testes de Western blot, radioimunoprecipitação, ou similares (Smith, 1991b).

Ao analisar os resultados obtidos na IFI, um dos 4 AcMs produzidos (6C4) apresentou reação extremamente fraca, mostrando resultados duvidosos em várias ocasiões, não sendo por isso incluído na caracterização das amostras do vírus rábico. Este AcM, embora claramente reconheça antígenos específicos, deverá ser melhor estudado de forma a avaliar sua utilidade em estudos futuros.

Uma vez preparados os AcMs, procurou-se avaliar o perfil de reatividade frente a todas as amostras disponíveis de vírus rábico. Contudo, devido as limitações

de tempo impostas para a execução deste projeto, não foi possível obter mais amostras de laboratórios de diagnóstico da raiva, o que levou a que apenas um pequeno número de amostras fosse examinado. Para a determinação da utilidade dos AcMs obtidos em testes sobre amostras de campo, foram somados aos AcMs aqui produzidos um AcM produzido contra a amostra padrão CVS-31 (Pantoja, 1995) e 8 AcMs produzidos contra vírus representantes dos diversos sorotipos do gênero *Lyssavirus* (King, 1991). Estes últimos foram acrescentados por serem em sua maioria úteis na caracterização de amostras do sorotipo 1 (King, 1991), o único identificado no Brasil até o presente. Como comentado adiante, a inclusão destes AcMs foi importante para revelar algumas nuances dos perfis de reatividade observados frente a algumas amostras de vírus de campo. Assim, foram caracterizadas 19 amostras de vírus rábico de campo, frente a 12 AcMs. Graças à gentileza da Dra. Elisabeth Amatuzzi da Costa Aguiar e Dra. Marilene Almeida (Centro de Controle de Zoonoses CCZ-4, SP), duas delas eram amostras de morcegos não hematófagos, sendo que uma delas, mais tarde, revelou um perfil de reatividade com reação a um dos AcMs não encontrada nas outras amostras.

Na análise dos perfis de reatividade obtidos, as amostras de vírus rábico de campo foram utilizadas com somente uma passagem em cérebro de camundongos. Não foram utilizadas amostras originais, porque a presença de uma maior quantidade de partículas virais resultantes da multiplicação facilita a observação de reações de fluorescência (Pantoja, 1995). A caracterização antigênica de amostras a partir de tecido original ou após um número mínimo de passagens em animais de laboratório ou cultura de tecidos tem sido recomendada para evitar a seleção de variantes que não refletiriam em sua totalidade as características dos isolados de campo (Wiktor et

al., 1980).

Os resultados da análise dos perfis de reatividade obtidos com os AcMs 5A3, 5G2, CVS-2, L3 e DB1, permitiram a identificação de determinantes antigênicos comuns nas 19 amostras de vírus rábico examinadas. A ausência de determinantes reconhecidos pelos AcMs DB9, D3 e M11 não foi inesperada, já que estes AcMs identificam somente antígenos detectados em lissavírus ainda não identificados no Brasil (Tabela 1), observação também feita por Pantoja (1995).

Ao analisar as amostras originárias de bovinos e de morcegos, observou-se que as mesmas mostraram perfis semelhantes ao apresentado pela amostra de vírus fixo padrão CVS-31. A semelhança entre os padrões de uma amostra de vírus fixo e amostras de origem bovina foi relatada anteriormente para a amostra ERA (Montaño; Polack, 1988; Dietzschold et al., 1988).

Com base nos padrões de reatividade obtidos, com os AcMs DB3, DB4 e 7C1, as amostras de campo puderam ser divididas em dois grupos, o primeiro correspondendo aos vírus originário de bovinos e morcegos e, o outro, às amostras de origem canina. Estes resultados confirmam achados anteriores (Pantoja, 1995; Roehle et al., 1997), onde a caracterização de amostras brasileiras com AcMs permitiu a diferenciação entre o vírus rábico proveniente de bovinos e eqüinos daquele originário de outras espécies analisadas. A existência de um ciclo separado de transmissão da raiva em morcegos (principal responsável pela raiva bovina), independente daquele em caninos, observado na América Latina, foi relatada por vários autores (Wiktor et al., 1982; Dietzschold et al., 1988; Smith, 1989). Além disso, padrões de reatividade idênticos, como observado com as amostras originárias de bovinos e morcegos, sugerem transmissão interespecies (Smith, 1989).

A reação apresentada pelo AcM L18 frente a uma amostra originária de um morcego não hematófago foi uma surpresa neste trabalho, tendo em vista que até o presente, este AcM mostrou reagir somente com amostras do sorotipo 2 (Lagos bat). Esta reatividade sugere algumas hipóteses. Uma delas seria que o vírus isolado apresenta determinantes antigênicos comuns com amostras do sorotipo 2. A segunda seria que o vírus isolado de morcegos talvez seja uma variante antigênica do vírus rábico. Uma terceira seria a de que a reação observada poderia tratar-se de erro técnico, hipótese pouco provável, por terem sido feitas 4 repetições para confirmar os resultados, apresentando sempre reação claramente positiva. Estas questões mostram a importância da continuidade desta linha de pesquisa, porque vão ao encontro de alguns dos objetivos aqui propostos, que incluem a identificação de variantes antigênicas e seu papel na natureza. A verdadeira importância deste achado somente poderá ser avaliada com a continuação destes estudos.

Muitos hibridomas potencialmente secretores de anticorpos específicos tiveram que ser congelados, devido às limitações impostas pelo tempo necessário à execução deste projeto. Futuramente, estes hibridomas deverão ser avaliados.

Para se obter mais informações a respeito das amostras de vírus rábico circulantes no Brasil, deverão ser produzidos mais AcMs contra diferentes espécies animais e analisado, antigênica e molecularmente, um número maior de amostras provenientes de diferentes regiões.

6 CONCLUSÕES

Foram obtidos três AcMs, dos quais um deles foi capaz de contribuir para a diferenciação entre as amostras de vírus rábico isoladas de bovinos e caninos.

As amostras de bovinos e morcegos apresentaram perfis de reatividade distintos das amostras provenientes de caninos, mas semelhantes à amostra CVS-31.

É necessário que sejam produzidos mais AcMs contra amostras de vírus rábico isoladas de diferentes espécies animais, e que sejam examinadas um número maior de amostras de vírus obtidas de diferentes regiões do país, a fim de permitir um delineamento mais preciso das características antigênicas de amostras de vírus que ocorrem no Brasil.

ANEXO A

DILUENTES**Diluyente para vírus**

Albumina bovina fração V	0,75g
Solução de antibióticos*	1,00ml
PBS pH 7,4 q.s.p	100ml

* Solução de antibióticos: 200.000 UI de penicilina sódica e 200mg de estreptomicina, por mililitro.

Solução salina tamponada com fosfatos (PBS) pH 7,4 10x

NaCl	85,0g
Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O	15,5g
NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O	2,3g
H ₂ O destilada q.s.p	1 litro

A solução de PBS pH 7,4, para uso, foi preparada diluindo a solução estoque dez vezes, como segue : 100ml da solução estoque 10x em 900ml de água destilada.

Solução salina tamponada com fosfato (PBS) pH 8,5 10x

NaCl	85,00g
Na ₂ HPO ₄	94,64g
KH ₂ PO ₄	1,16g

Foram preparadas três soluções: solução A (solução NaCl a 0,85% - 85g em 1litro de água destilada) , solução B (94,64g de Na₂HPO₄ em 990ml da solução A) e solução C (1,16g de KH₂PO₄ em 10ml da solução A).

As soluções B e C foram misturadas e homogenizadas e uma alíquota retirada para medir o pH. Para uso, o PBS pH 8,5 foi utilizado diluído 10x.

ANEXO B

MEIOS DE CULTURA PARA AS CÉLULAS

RPMI-1640

O meio RPMI-1640 (INLAB) foi preparado com os suplementos listados abaixo:

RPMI-1640	10,00g
Glutamina	0,30g
Piruvato de sódio	0,11g
Dextrose	6,00g
Hepes sal sódico	2,3g
Bicarbonato de sódio	2,00g
Gentamicina	50ug /ml
Água tridestilada q.s.p	1 litro

Após homogeneização, foi feito o ajuste do pH a 7,2, e filtração em membrana esterilizante (0,22um). Em seguida ao teste bacteriológico e adição do antibiótico o meio foi conservado a 4°C.

Meio Seletivo HAT

O meio seletivo HAT (hipoxantina, aminopterin e timidina), 50 vezes concentrado (50x) (Sigma), foi reconstituído em meio RPMI-1640 (10ml), e diluído no meio a ser usado nas células 1: 50, suplementado com 20% SFB.

Meio de transição HT

O meio HT (hipoxantina e timidina) 50x (Sigma) foi reconstituído em meio RPMI-1640 (10ml), e diluído 1: 50 para uso em RPMI-1640 suplementado com 10% SFB.

Meio condicionado (Cultivo de linfócitos do baço de camundongos BALB/c)

Os linfócitos do baço de um camundongo foram coletados, lavados em 10ml de meio RPMI-1640 sem soro. A suspensão formada foi centrifugada a 650 x g durante 10 minutos e o pellet ressuspendido em 20 ml de meio RPMI-1640 com 10% SFB. Após um período de 7 dias de incubação em estufa a 37°C o sobrenadante foi coletado, centrifugado para a retirada das células e passado em filtro esterilizante (0,22µm). O meio condicionado pronto para uso é conservado em freezer a -20°C.

BIBLIOGRAFIA CITADA

- 1 AGHOMO, H.O.; RUPPRECHT, C.E. Antigenic characterization of virus isolates from vaccinated dogs dying of rabies. **Tropical Animal Health Production**, v. 22, p. 275-280, 1990.
- 2 AMENGUAL, B.; WHITBY, J.E.; KING, A.A.; COBO, J.S.; BOURHY, H. Evolution of european bat lyssavirus. **Journal of General Virology**, v. 78, p. 2319-2328, 1997.
- 3 BAER, G.M. Overview. In: BAER, G.M. (Ed.). **The Natural History of Rabies**. 2.ed. Boca Raton, USA: CRC Press, 1991a. p. 103-104.
- 4 BAER, G.M. Vampire bat and bovine paralytic rabies. In: BAER, G.M. (Ed.). **The Natural History of Rabies**. 2.ed. Boca Raton, USA: CRC Press, 1991b. p. 389-403.
- 5 BAER, G.M.; LENTZ, T.L. Rabies pathogenesis to the central nervous system. In: BAER, G.M. (Ed.). **The Natural History of Rabies**. 2.ed. Boca Raton, USA: CRC Press, 1991. p. 105-120.
- 6 BAGNAROLI, R.A.; LARGHI, O. P.; MARCHEVSKY, N. Susceptibilidad de ratones lactentes y adultos al virus rábico demostrada por inmunofluorescencia. **Boletín de la Oficina Sanitaria Panamericana**, v. 68, n. 5, p. 388-392, mayo 1970.
- 7 BENMANSOUR, A.; BRAHIMI, M.; TUFFEREAU, C.; COULON, P.; LAFAY, F.; FLAMAND, A. Rapid sequence evolution of street rabies glycoprotein is

related to the highly heterogeneous nature of the viral population. **Virology**, v. 187, p. 33-45, 1992.

- 8 BOULGER, L.R.; PORTERFIELD, J.S. Isolation of a virus from Nigerian fruit bats. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 52, n. 5, Sept. 1958.
- 9 BOURHY, H.; KISSI, B.; LAFON, M.; SACRAMENTO, D.; TORDO, N. Antigenic and molecular characterization of bat rabies virus in Europe. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 30, n. 9, p. 2419-2426, 1992.
- 10 BOURHY, H.; KISSI, B.; TORDO, N. Taxonomy and evolutionary studies on Lyssaviruses with special reference to Africa. **Onderstepoort Journal of Veterinary Research**, v. 60, p. 277-282, 1993a.
- 11 BOURHY, H.; KISSI, B.; TORDO, N. Molecular diversity of the lyssavirus genus. **Virology**, v. 194, p. 70-81, 1993b.
- 12 DAWSON, M. Production and maintenance of hybridomas. In: BUTLER, M.; DAWSON, M.(Eds.). **Cell Culture**. Oxford, United Kingdom: Bios Scientific Publishers, 1992. p. 59-73.
- 13 CAMPBELL, J.B. Rabies. In: DARAI, G.(Ed.). **Virus Diseases in Laboratory and Captive Animals**. Boston, USA: Martinus Nijhoff Publishers, 1988. p. 472-489.
- 14 CHARLTON, K.M. The pathogenesis of rabies. In: CAMPBELL, J.B.; CHARLTON, K.M. (Eds.). **Rabies**, Boston, USA: Klumer Academic Publishers, 1988. p. 101-150.
- 15 DELPIETRO, H.A.; GURY-DHOMEN, F.; LARGHI, O.P.; MENA-SEGURA, C.; ABRAMO, L. Monoclonal antibody characterization of rabies virus

- strains isolated in the River Plate Basin. **Journal of Veterinary Medicine**, v. B44, p. 477-483, 1997.
- 16 DIETZSCHOLD, B.; RUPPRECHT, C.E.; TOLLIS, M.; LAFON, M.; MATTEL, J.; WIKTOR, T.J.; KOPROWSKI, H. Antigenic diversity of glycoprotein and nucleocapsid proteins of rabies and rabies related viruses: Implications for epidemiology and control of rabies. **Reviews of Infectious Diseases**, v. 10, supplement 4, p. S785-S798, Nov. 1988.
- 17 DOMINGO, E.; MARTINEZ-SALAS, E.; SOBRINO, F.; TORRE, J.C.; PORTELA, A.; ORTIN, J.; LOPEZ-GALINDEZ, C.; PEREZ-BRENA, P.; VILLANUEVA, N.; NAJERA, R.; VANDEPOL, S.; STEINHAEUER, D.; DEPOLO, N.; HOLLAND, J. The quasispecies (extremely heterogeneous) nature of viral RNA genome populations: biological relevance- a review. **Gene**, v. 40, p. 1-8, 1985.
- 18 DOMINGO, E.; DIEZ, J.; MARTINEZ, M.A.; HERNANDEZ, J.; HOLGUIN, A.; BORREGO, B.; MATEU, M.G. New observations on antigenic diversification of RNA viruses. Antigenic variation is not dependent on immune selection. **Journal of General Virology**, v. 74, p. 2039-2045, 1993.
- 19 FEKADU, M.; SHADDOCK, J.H.; BAER, G.M. Excretion of rabies virus in the saliva of dogs. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 145, n. 5, p. 715-719, May 1982.
- 20 FLAMAND, A.; WIKTOR, T.J.; KOPROWSKI, H. Use of hybridoma monoclonal antibodies in the detection of antigenic differences between rabies and rabies-related virus proteins. I. The nucleocapsid protein. **Journal of General Virology**, v. 48, p. 97-104, 1980a.
- 21 FLAMAND, A.; WIKTOR, T.J.; KOPROWSKI, H. Use of hybridoma monoclonal antibodies in the detection of antigenic differences between

- rabies and rabies-related virus proteins. II. The glycoprotein. **Journal of General Virology**, v. 48, p. 105-109, 1980b.
- 22 GERMANO, P.M.L., MIGUEL, O.; ISHIZUKA, M.M.; SILVA, E.V. Avaliação de três cepas de vírus rábico, antigenicamente distintas em camundongos. II-Estudo de disseminação viral, por diferentes órgãos. **Revista de Saúde Pública**, v. 22, n. 6, p. 473-478, 1988a.
- 23 GERMANO, P.M.L.; SILVA, E.V.; SUREAU, P. Determinação do perfil antigênico de três cepas de vírus rábico isoladas no Brasil, através da técnica dos anticorpos monoclonais antinucleocapside. **Revista da Faculdade de Medicina Veterinária Zootécnica**, Univ. São Paulo, v. 2, n. 25, p. 199-205, 1988b.
- 24 GERMANO, P.M.L.; SILVA, E.V.; SILVA, E.V.; MIGUEL, O.; SUREAU, P. Variantes antigénicas del virus de la rabia aisladas en el Nordeste y Sudeste del Brasil. Estudio preliminar. **Boletín de la Oficina Sanitaria Panamericana**, v. 108, n. 1, p. 39-45, 1990.
- 25 GERMANO, P.M.L. Avanços na pesquisa da raiva. **Revista de Saúde Pública**, v. 28, n. 1, p. 86-91, 1994.
- 26 GODING, J.W. Antibody production by hybridomas. **Journal of Immunological Methods**, n. 39, p. 285-308, 1980.
- 27 GOLDWASSER, R.A.; KISSLING, R.E. Fluorescent antibody staining of street and fixed rabies virus antigens. **Proceedings Society for Experimental Biology and Medicine**, v. 98, p. 219-223, 1958.
- 28 HABEL, K. Consideraciones generales sobre fabricacion de vacuna. In: KAPLAN, M.M.; KOPROWSKI, H. (Eds.). **La Rabia**: tecnicas de laboratorio. 3. ed. Genebra, 1976. p. 199-201.

- 29 HARLOW, E.; LANE, D. **Antibodies: a laboratory manual**. New York, USA: Cold Spring Harbor, 1988. 358p.
- 30 IWASAKI, Y. Spread of virus within the central nervous system. In: BAER, G.M. (Ed.). **The Natural History of Rabies**. 2.ed. Boca Raton, USA: CRC Press, 1991. p. 121-132.
- 31 KING, A.A.; CRICK, J. Rabies-related viruses. In: CAMPBELL, J.B.; CHARLTON, K.M. (Eds.). **Rabies**. Boston, USA: Klumer Academic Publishers, 1988. p. 177-199.
- 32 KING, A.A.; DAVIES, P.; LAWRIE, A. The rabies viruses of bats. **Veterinary Microbiology**, v. 23, p. 165-174, 1990.
- 33 KING, A.A. **Studies of the antigenic relationships of rabies and rabies-related viruses using anti- nucleoprotein monoclonal antibodies**. Tese. (Doutorado em Ciências Veterinárias)-University of Surrey, Guilford, U.K., 1991. 254 p.
- 34 KING, A.A.; TURNER, G.S. Rabies. A review. **Journal of Comparative Pathology**, v. 108, n. 1, p. 1- 39, 1993.
- 35 KÖHLER, G.; MILSTEIN, C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. **Nature**, v. 256, p. 495-497, Aug. 1975.
- 36 KOPROWSKI, H. Overview. In: BAER, G.M. (Ed.). **The Natural History of Rabies**. 2.ed. Boca Raton, USA: CRC Press, 1991. p. 27-29.
- 37 LENTZ, T.L.; BURRAGE, T.G.; SMITH, A. L.; CRICK, J.; TIGNOR, G.H. Is the acetylcholine receptor a rabies virus receptor ? **Science**, v. 215, p. 182-184, Jan. 1982.

- 38 LOZA-RUBIO, E.; VARGAS, R.; HERNANDEZ, E.; BATALLA, D.; AGUILLAR, A. Investigation of virus rabies strains in Mexico with a panel of monoclonal antibodies used to classify lyssavirus. **Bull.Pan.Am.Health Organ.**, v. 30, n. 1, p. 31-35, 1996.
- 39 LUMIO, J.; HILLBOM, M.; ROINE, R.; KETONEN, L.; HALTIA, M.; VALLE, M.; NEUVONEN, E.; LAHDEVIRTA, J. Human rabies of bat origin in Europe. **The Lancet**, p. 378, Feb. 1986.
- 40 Manual da Fundação Nacional de Saúde. Ministério da Saúde. 1996. p. 30-36.
- 41 MEREDITH, C.D.; ROSSOUW, A P.; KOCH, H.V.P. An unusual case of human rabies thought to be of chiropteran origin. **South African Medical Journal**, v. 45, p. 767-769, July 1971.
- 42 MONTAÑO, J.A.; POLACK, G.W. Characterization of rabies virus isolated from bovines in Parana (Brazil) by using monoclonal antibodies. **Arquivos de Biologia e Tecnologia**, v. 31, n. 4, p. 595-601, Nov. 1988.
- 43 MORIMOTO, K.; PATEL, M.; CORISDEO, S.; HOOPER, D.C.; FU, Z.F.; RUPPRECHT, C.E.; KOPROWSKI, H.; DIETZSCHOLD, B. Characterization of a unique variant of bat rabies responsible for newly emerging human cases in North America. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, v. 93, n. 11, May 1996.
- 44 PANTOJA, L.D. **Caracterização de amostras brasileiras de vírus rábico com anticorpos monoclonais**. Dissertação. (Mestrado em Ciências Veterinárias)- Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1995. 96 p.
- 45 PRETO, A A.; GERMANO, P.M.L. Evaluation of the rabies vaccine, PV/ BHK origin, against rabies virus strains of canine and bovine origin. **Arquivos de biologia e Tecnologia**, v. 33, n. 1, p. 241-245, 1990.

- 46 ROEHE, P.M.; PANTOJA, L.D.; SCHAEFER, R.; NARDI, N.B.; KING, A.A.
Analysis of brazilian rabies virus isolates with monoclonal antibodies to
Lyssavirus antigens. **Revista de Microbiologia**, v. 28, p. 288-292, 1997.
- 47 ROMIJN, P. Lyssavirus awareness system compromising public health and
animal sanity. In: Encontro Nacional de Virologia, 9., 1998, São Lourenço.
Virus Reviews & Research. São Lourenço, MG, Nov. 1998. V. 3,
suplemento.
- 48 RUPPRECHT, C.E.; GLICKMAN, L.T.; SPENCER, P.A.; WIKTOR, T.J.
Epidemiology of rabies virus variants. Differentiation using monoclonal
antibodies and discriminant analysis. **American Journal of Epidemiology**,
v. 126, n. 2, p. 298-309, 1987.
- 49 RUPPRECHT, C.E.; DIETZSCHOLD, B.; WUNNER, W.H.; KOPROWSKI,
H. Antigenic relationships of Lyssaviruses. In: BAER, G.M. (Ed.). **The
Natural History of Rabies**. 2.ed. Boca Raton, USA: CRC Press, 1991. p.
69-100.
- 50 SACRAMENTO, D.; BADRANE, H.; BOURHY, H.; TORDO, N. Molecular
epidemiology of rabies virus in France: comparison with vaccine strains.
Journal of General Virology, v. 73, p. 1149-1158, 1992.
- 51 SCHNEIDER, L.G. Antigenic variants of rabies virus. **Comparative
Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v. 5, n. 1-3, p. 101-
107, 1982.
- 52 SCHNEIDER, L.G. Spread of virus from the central nervous system. In:
BAER, G.M. (Ed.). **The Natural History of Rabies**. 2.ed. Boca Raton,
USA: CRC Press, 1991. p.133-144.

- 61 SUREAU, P.; ROLLIN, P.; WIKTOR, T.J. Epidemiologic analysis of antigenic variations of street rabies virus: Detection by monoclonal antibodies. **American Journal of Epidemiology**, v. 117, n. 5, p. 605-609, 1983.
- 62 SUREAU, P.; RAVISSE, P.; ROLLIN, P. Rabies Diagnosis by animal inoculation, identification of Negri bodies, or ELISA. In: BAER, G.M. (Ed.). **The Natural History of Rabies**. 2. ed. Boca Raton, USA: CRC Press, 1991. p. 203-217.
- 63 THOULOUBE, M.I.; LAFAGE, M.; SCHACHNER, M.; HARTMANN, U.; CREMER, H.; LAFON, M. The neural cell adhesion molecule is a receptor for rabies virus. **Journal of Virology**, p. 7181-7190, 1998.
- 64 TORDO, N.; POCH, O.; ERMINE, A.; KEITH, G. Primary structure of leader RNA and nucleoprotein genes of the rabies genome: segmented homology with VSV. **Nucleic Acids Research**, v. 14, n. 6, p. 2671-2683, 1986.
- 65 TRIMARCHI, C.V.; DEBBIE, J.G. The fluorescent antibody in rabies. In: BAER, G.M. (Ed.). **The Natural History of Rabies**. 2. ed. Boca Raton, USA: CRC Press, 1991. p. 219-233.
- 66 TSIANG, H. Pathophysiology of rabies virus infection of nervous system. **Advances in Virus Research**, v. 42, p. 375-412, 1993.
- 67 UMOH, J.U.; COX, J.H.; SCHNEIDER, L.G. Antigenic characterization of street rabies virus isolates from Nigeria using monoclonal antibodies. **Journal of Veterinary Medicine**, n. 37, p. 222-228, 1990a.
- 68 UMOH, J.U.; COX, J.H.; SCHNEIDER, L.G.; MEYER, S. Identification of fox rabies by a monoclonal antibodies directed against nucleocapsid of a street rabies virus. **Journal of Veterinary Medicine**, n. 37B, p. 153-157. 1990b.

- 69 WATSON, H.D.; TIGNOR, G.H.; SMITH, A.L. Entry of rabies virus into the peripheral nerves of mice. **Journal of General Virology**, v. 56, p. 371-382, 1981.
- 70 WIKTOR, T.J.; KOPROWSKI, H. Monoclonal antibodies against rabies virus produced by somatic cell hybridization: Detection of antigenic variants. **Proceedings of the National Academy Sciences of USA**, v. 75, n. 8, p. 3938-3942, Aug. 1978.
- 71 WIKTOR, T.J.; FLAMAND, A.; KOPROWSKI, H. Use of monoclonal antibodies in diagnosis of rabies virus infection and differentiation of rabies and rabies -related viruses. **Journal of Virological Methods**, n. 1, p. 33-46, 1980.
- 72 WIKTOR, T.J.; KOPROWSKI, H. Does the existence of rabies antigenic variants warrant re-evaluation of rabies vaccine? In: CONFERÊNCIA INTERNACIONAL SOBRE O IMPACTO DAS DOENÇAS VIRAIS NO DESENVOLVIMENTO DOS PAÍSES LATINO-AMERICANOS E DA REGIÃO DO CARIBE, 1., 1982, Rio de Janeiro. **Anais**. Rio de Janeiro, 1982. v.1, p. 94-112.
- 73 WUNNER, W.H. The chemical composition of rabies virus. In: BAER, G.M. (Ed.). **The Natural History of Rabies**. 2. ed. Boca Raton, USA: CRC Press, 1991. p.31-37.

ABSTRACT

PRODUCTION OF MONOCLONAL ANTIBODIES AGAINST RABIES VIRUS OF CATTLE ORIGIN AND CHARACTERIZATION OF ISOLATES

Three monoclonal antibodies (Mabs) directed to rabies virus antigens were produced and used along with nine other Mabs described previously in the characterization of rabies virus isolates obtained from different species. Virus isolates from cattle, non-haematophagous bats and dogs obtained from the states of Rio Grande do Sul, São Paulo and Bahia were multiplied in mice and brain impression smears were examined by indirect immunofluorescence with the distinct Mabs as primary antibodies. Five Mabs recognized antigens on all isolates examined. Samples of cattle and bats displayed a pattern of reactivity distinct from the profile of dog virus isolates, but similar to that found for the standard CVS strain. One of the three Mabs produced in the present study were useful to differentiate samples of cattle origin from those of dog origin.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Dr. Paulo Michel Roehe pela oportunidade de seguir adiante com este projeto no CPVDF, pelo entusiasmo compartilhado neste trabalho.

À Laura Dias Pantoja, pela paciência em me escutar e pelo incentivo para seguir em frente e superar os obstáculos encontrados.

Aos meus pais, Jorge e Cleo, pelo carinho e pela força em todos os momentos, por terem sempre acreditado em mim.

Ao Marcus, pelo seu amor por mim, por ter me apoiado em todos os momentos, insistindo sempre para que eu fosse em busca dos meus objetivos.

Aos meus irmãos, Ricardo, Mônica e André pelo carinho e apoio expressados.

Ao Márcio Pinto, pelo empréstimo da impressora na cópia das “versões” da dissertação e por me socorrer cada vez que o computador entrava em pane.

Aos colegas do CPVDF, em especial ao Eber Oliveira, Ana Claudia Gisler e Tamir Silva pela troca de experiências e palavras de apoio ao longo deste curso, pelos colegas maravilhosos que são.

As colegas de Mestrado Marjorie Teixeira e Vanessa Felipe de Souza, além do pessoal do “Centro”, Cyntia Schmidt, Silvia Valim de Melo, Fernando Spilki e Franco Vicentini, pela amizade e apoio.

Às colegas do Laboratório de Virologia da Faculdade de Veterinária da UFRGS, Dilmara Reischak e Aline Schmidt pelo apoio na fase final do trabalho.

À Nara Sanberg, pela ajuda durante a fase inicial do projeto e pelo carinho durante todo este tempo em que nos conhecemos.

À Dra. Mara Motta e Dra. Luiza Braga, do Lacen, pelo fornecimento dos camundongos.

Ao Dr. Rudi Weiblen, de Santa Maria (UFSM) pelo fornecimento das células de mieloma utilizadas neste trabalho.

À Dra. Conceição Nagatta, do Laboratório Central de Saúde Pública da Bahia, pela doação das amostras originárias de caninos.

À Dra. Elizabeth Amatuzzi da Costa Aguiar e Dra. Marilene Almeida, do Centro de Controle de Zoonoses de São Paulo, pela doação das amostras de vírus rábico originárias de morcegos.

Ao diretor do CPVDF-FEPAGRO, Augusto César Cunha, por permitir a realização deste trabalho nesta instituição.

Aos funcionários do Lacen, Adauzinho e Armandino pela ajuda recebida com os cuidados com os camundongos.

Aos funcionários do Laboratório de Virologia do CPVDF, Glória e Antonio Carlos, pela ajuda no preparo dos materiais utilizados.

À todos que de uma forma ou de outra colaboraram com a execução deste trabalho,

Muito obrigada!