

GRACIANE MARIA MEDEIROS CAPORALE

**PURIFICAÇÃO DE VÍRUS DA RAIVA E RIBONUCLEOPROTEÍNAS  
PARA PRODUÇÃO DE CONJUGADOS FLUORESCENTES**

Dissertação (Mestrado) apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/Instituto Butantan/IPT, para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

SÃO PAULO  
2005

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

GRACIANE MARIA MEDEIROS CAPORALE

**PURIFICAÇÃO DE VÍRUS DA RAIVA E RIBONUCLEOPROTEÍNAS  
PARA PRODUÇÃO DE CONJUGADOS FLUORESCENTES**

Dissertação (Mestrado) apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/Instituto Butantan/IPT, para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Área de Concentração:  
Biotecnologia

Orientador:  
Profa. Dra. Ruth Camargo Vassão

SÃO PAULO  
2005

Aos meus pais Benedicto Antônio Caporale e Emilia Medeiros Caporale pelo amor incondicional e oportunidade pelo meu passado, presente e futuro.

Aos meus irmãos Silvia, Silvio, Silvana e Flávio, por todos os caminhos de amor, empenho e aprendizado que nos levam às nossas realizações.

Aos meus sobrinhos Camila, Gabriel e Richard, aos quais desejo somem-se aos construtores de uma humanidade de fato justa.

À Dra. Zélia Maria Pinheiro Peixoto, por sua participação vibrante neste estudo, pelo incentivo de tantos projetos em minha vida.

Sua competência de Ver e Caminhar pela Vida é admirável!

À Dra. Ruth Camargo Vassão pela orientação, confiança e amizade;

Ao Dr. Carlos Roberto Zanetti pela amizade, ensinamentos e preciosas sugestões para a execução deste trabalho;

À Andréa de Cássia Rodrigues da Silva, pelo caminho profissional que juntas percorremos, por nosso trabalho sempre afinado com a verdade do que acreditamos e todos esses anos de amizade. Aqui está parte do nosso trabalho!;

À Dra. Zélia Maria Pinheiro Peixoto, por sua participação vibrante neste estudo, pelo incentivo de tantos projetos em minha vida. Sua competência de Ver e Caminhar pela Vida é admirável!;

À Luciana Botelho Chaves pela amizade, compreensão e tantas colaborações;

À Karin Corrêa Scheffer Ferreira e Elpidio Ferreira pela fundamental ajuda, amizade e estímulo para o término deste trabalho;

À Dra. Ivanete Kotait diretora técnica do Instituto Pasteur pela disposição e valiosa colaboração dispensada a este trabalho;

À Dra. Maria Luiza Carrieri pela colaboração;

Ao Pedro Carnieli Junior pela amizade e importantes sugestões;

Ao Paulo Eduardo Brandão pelas sugestões e apoio;

À Paula Sônia Cruz, Geralda R. Fraga, Karina Ribeiro, Ana Elena da Costa Gossi, Andréa Liza C. Mazutti, Samira Achkar e André Barreto B. Wilke, pessoas com as quais sempre pude contar;

À Renata Datri pelo incentivo de todos os momentos;

À Dra. Rosa Maria Piatti do Instituto Biológico pela disposição e ensinamentos;

Ao Departamento de Histologia da USP, especialmente a Roberto Cabado;

Aos amigos do laboratório do Instituto Pasteur pelo companheirismo do dia-a-dia, passados sempre com leveza e alegria;

À Dra. Neide Takaoka diretora do Instituto Pasteur;

A todos que estão na minha vida, pessoas amigas e queridas nas quais acredito.

Muito obrigada!

## RESUMO

Caporale GMM. Purificação de vírus da raiva e ribonucleoproteínas para produção de conjugados fluorescentes [Dissertação]. São Paulo: Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/Instituto Butantan/IPT, 2005.

A Organização Mundial da Saúde recomenda o teste de imunofluorescência direta (IFD) para a pesquisa do vírus da raiva em sistema nervoso central (SNC) de animais suspeitos e o teste rápido de inibição de focos fluorescentes (RFFIT) para a avaliação do título de anticorpos neutralizantes, o qual foi adaptado no Brasil para o microteste simplificado de inibição de fluorescência (SFIMT). Esses testes podem ser revelados com o uso de conjugados fluorescentes anti-vírus da raiva (CA-VR) ou anti-ribonucleoproteínas (CA-RNPs). A obtenção de conjugado fluorescentes é feita por meio de conjugação do fluorocromo isotiocianato de fluoresceína (ITCF) a anticorpos anti-vírus da raiva ou anti-RNPs purificados. Os métodos utilizados para purificação de vírus da raiva e ribonucleoproteínas foram ultracentrifugação em gradiente de sacarose e gradiente de Cloreto de Césio, respectivamente. Para obtenção de anticorpos anti-vírus da raiva e anti-RNPs dois grupos de coelhos foram imunizados e um de cada grupo foi selecionado de acordo com os maiores títulos, 3600 UI/mL pelo teste de SFIMT e diluição de 1/2560 pelo teste de imunofluorescência indireta. Os anticorpos foram purificados por cromatografia de troca iônica (QAE-Sephadex A 50), conjugados ao ITCF e filtrados por cromatografia de peso molecular (G-50 Sephadex). As titulações dos lotes dos conjugados, realizadas por IFD e SFIMT, apresentaram títulos de 1/200 e 1/250 com o lote anti-VR e 1/400 e 1/500 com o lote anti-RNPs. Testes de sensibilidade e especificidade dos conjugados produzidos foram realizados por IFD em 100 amostras de tecido de SNC de diferentes espécies animais, apresentando resultados 100% concordantes entre si e com os resultados do conjugado comercial utilizado como padrão. A qualidade dos conjugados avaliada por fotografias demonstrou fluorescência intensa e específica e ausência de fluorescência nos controles negativos.

**Palavras-chave:** Raiva. Diagnóstico. Imunofluorescência. Conjugado. Purificação. Ribonucleoproteínas.

## ABSTRACT

Caporale GMM. Rabies virus and ribonucleoprotein purification for fluorescent conjugate production. [Dissertação]. São Paulo: Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/Instituto Butantan/IPT, 2005.

The World Health Organization recommends the direct fluorescent antibody test (FAT) for the detection of rabies virus in the central nervous system (CNS) of rabies-suspected animals and the rapid fluorescent focus inhibition test (RFFIT) for the evaluation of neutralizing antibodies, which in Brazil has been adapted as the simplified fluorescence inhibition micro test (SFIMT). These tests can be developed with anti-rabies virus fluorescent conjugate (CA-VR) or anti-ribonucleoprotein (RNP) fluorescent conjugate (CA-RNPs). Fluorescent conjugates are produced by the conjugation of fluorescein isothiocyanate (FITC) with anti-rabies virus or anti-purified ribonucleoprotein antibodies. The protocols used herein for the purification of rabies virus or rabies virus ribonucleoprotein were ultracentrifugation in sucrose gradient and cesium chloride gradient, respectively. Anti-rabies virus and anti-RNPs antibodies were produced by immunizing two groups of rabbits and one rabbit per group was selected according to the higher antibody titers (3600 UI/mL by SFIMT and 1/2560 by the indirect immunofluorescence). The antibodies were purified by ionic exchange chromatography (QAE-Sephadex A 50), conjugated to FITC and filtered by molecular weight chromatography (G-50 Sephadex). The titration of the conjugates by IFD and SFIMT resulted in titers of 1/200 and 1/250 to the anti-VR and 1/400 and 1/500 to the anti-RNP conjugates. Sensitivity and specificity tests carried out with by FAT with 100 CNS samples of different animal species, resulting an agreement of 100% between the results of the tow conjugates and between these and the commercial conjugate used as a reference. The quality of the conjugates evaluated by photography has shown an intense and specific fluorescence and absence of fluorescence in the negative controls.

**Key words:** Rabies. Diagnosis. Immunofluorescence. Conjugate. Purification. Ribonucleoprotein.

### 1.1.1.1.1.1.1 LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Esquema representando a estrutura do vírus da raiva.....	30
Figura 2 -	Representação esquemática do ciclo de replicação do vírus da raiva, evidenciando-se os processos de adsorção, penetração, replicação, maturação e liberação de novas partículas virais infectantes.....	34
Figura 3 -	Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-Page) – demonstrando: PM – peso molecular, MC – meio de cultura, LC – lisado celular, P – purificado e N – nucleoproteínas, após purificação em gradiente de Cloreto de Césio (CsCl).....	58
Figura 4 -	Comparação do número de exames realizados com os conjugados produzidos e o conjugado comercial.....	60
Figura 5 -	Células BHK-21 infectadas com vírus fixo PV- conjugado L.IP. CA-VR/04.....	62
Figura 6 -	Células BHK-21 infectadas com vírus fixo PV- conjugado L.IP. CA-VR/04.....	62
Figura 7 -	Células BHK-21- controle negativo conjugado L.IP. CA-VR/04.....	62
Figura 8 -	:Células BHK-21 infectadas com vírus fixo PV- conjugado L.IP. CA-RNPs/04.....	62
Figura 9 -	Células : BHK-21 infectadas com vírus fixo PV- conjugado L.IP. CA-RNPs/04.....	62
Figura 10 -	Células : BHK-21- controle negativo conjugado L.IP. CA-RNPs/04.....	62
Figura 11 -	Células BHK-21 infectadas com vírus fixo PV- conjugado CA-N.....	62
Figura 12 -	Células BHK-21 infectadas com vírus fixo PV- conjugado CA-N.....	62
Figura 13 -	:Células BHK-21- controle negativo conjugado L.IP. CA-N.....	62
Figura 14 -	Células N2A infectadas com vírus fixo CVS- conjugado L.IP. CA-VR/04	63
Figura 15 -	Células N2A – controle negativo conjugado L.IP. CA-VR/04.....	63
Figura 16 -	Células N2A infectadas com vírus fixo CVS - conjugado L.IP. CA-RNPs/04.....	63
Figura 17 -	Células N2A - controle negativo conjugado L.IP. CA-RNPs/04.....	63
Figura 18 -	Células N2A infectadas com vírus fixo CVS- conjugado CA-N.....	63
Figura 19 -	Células N2A - controle negativo conjugado CA-N.....	63
Figura 20 -	Decalque SNC positivo – cão conjugado L.IP. CA-RNPs/04.....	64
Figura 21 -	Decalque de SNC negativo – cão conjugado L.IP. RNPs/04.....	64

Figura 22 -	Decalque SNC positivo – cão conjugado L.IP. CA-VR/04.....	64
Figura 23 -	Decalque de SNC negativo – cão conjugado L.IP. CA-VR/04.....	64
Figura 24 -	Decalque SNC positivo – cão conjugado.CA-N.....	64
Figura 25 -	Decalque de SNC negativo - cão conjugado CA-N.....	64
Figura 26 -	Decalque SNC positivo – bovino conjugado L.IP. CA-RNPs/04.....	65
Figura 27 -	Decalque de SNC negativo – bovino conjugado L.IP. CA-RNPs/04.....	65
Figura 28 -	Decalque SNC positivo - bovino conjugado L.IP. CA-VR/04.....	65
Figura 29 -	Decalque de SNC negativo – bovino conjugado L.IP. CA-VR/04.....	65
Figura 30 -	Decalque SNC positivo – bovino conjugado L.IP. CA-N.....	65
Figura 31 -	Decalque de SNC negativo – bovino conjugado L.IP. CA-N.....	65
Figura 32 -	Decalque SNC positivo – humano conjugado L.IP. CA-RNPs/04.....	66
Figura 33 -	Decalque de SNC negativo – humano conjugado L.IP. CA-RNPs/04.....	66
Figura 34 -	Decalque SNC positivo – humano conjugado L.IP. CA-VR/04.....	66
Figura 35 -	Decalque de SNC negativo – humano conjugado L.IP. CA-VR/04.....	66
Figura 36 -	Decalque SNC positivo – humano conjugado CA-N.....	66
Figura 37 -	Decalque de SNC negativo – humano conjugado CA-N.....	66

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Filogrupos do gênero <i>lyssavirus</i> , distribuição geográfica e principais vetores.....	28
Tabela 2 -	Volumes anteriores e posteriores a purificação e concentração de proteínas nas diferentes metodologias de purificação.....	57
Tabela 3 -	Estimativa do rendimento dos conjugados produzidos e conjugado comercial.....	59
Tabela 4 -	Resultados de IFD em amostras de tecido nervoso, segundo a espécie animal e os diferentes conjugados anti-vírus da raiva empregados.....	61
Tabela 5 -	Valores referentes a sensibilidade e especificidade dos resultados positivos e negativos obtidos pelo teste de IFD.....	61

## LISTA DE ABREVIATURAS

AcN	Anticorpos neutralizantes
BHK	<i>Baby Hamster Kidney</i>
CA-N	Conjugado anti-nucleocapsídeo
CA-RNP	Conjugado anti-ribonucleoproteínas
CA-VR	Conjugado anti-vírus da raiva
CsCl	Cloreto de césio
CVS	<i>Challenge Virus Standard</i>
DO	Densidade ótica
EBL	<i>European bat Lyssavirus</i>
FIMT	<i>Fluorescent inhibition microtest</i>
G	Glicoproteína
GT	Genótipo
HBO	Lâmpada especial de mercúrio
IFD	Imunofluorescência direta
IFI	Imunofluorescência indireta
IgG	Imunoglobulina G
ITCF	Isotiocianato de fluoresceína
KIU	<i>Kallicrein inactivators units</i>
L	RNA - polimerase viral
LC	Lisado celular
L. IP.	Lote Instituto Pasteur
M ou M2	Proteína de matriz
MC	Meio de cultura

ME	Microscopia eletrônica
MEM	Meio essencial mínimo
N	Nucleoproteína
NaCl	Cloreto de sódio
N2A	Neuroblastoma murino
NT	NaCl/Tris
P, M1 ou NS	Fosfoproteína
PA	Para análise
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PM	Peso molecular
PV	<i>Pasteur virus</i>
RE	Retículo endoplasmático
RFFIT	<i>Rapid fluorescent focus inhibition test</i>
RNA	<i>Ribonucleic acid</i>
RNPs	Ribonucleoproteínas
RT-PCR	<i>Reverse transcription polymerase chain reaction</i>
SFB	Soro fetal bovino
SFIMT	<i>Simplified fluorescent inhibition test</i>
SNC	Sistema nervoso central
TED	Tampão etilenodiamina
Tris	Trizma base
VR	Vírus da raiva
AgV	<i>Antigenic variant</i>

## LISTA DE SÍMBOLOS

°C	Graus Celsius
=	Igual
%	Porcentagem
CO <sub>2</sub>	Dióxido de carbono
cm	Centímetro
g	Gramma
G	Aceleração da gravidade
pH	Potencial hidrogênio iônico
cm <sup>2</sup>	Centímetro quadrado
M	Molaridade
n°	Número
m	Metro
mg	Miligramma
µm	Micrômetro
µg	Microgramma
µL	Microlitro
mL	Mililitro
nm	Nanômetro
kDa	Kilo Dalton
Kg	kilogramma
≥	Maior ou Igual
UI/mL	Unidade internacional/mililitro
X	Veze

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>25</b>
1.1	A Raiva.....	26
1.2	Estrutura e Morfologia do Vírus da Raiva.....	29
1.3	Replicação Viral.....	32
1.4	Diagnóstico Laboratorial da Raiva.....	34
1.4.1	Detecção do vírus da raiva por IFD.....	35
1.4.2	Isolamento Viral.....	36
1.4.3	Avaliação Sorológica.....	37
1.5	Conjugado Fluorescente Anti-Vírus da Raiva.....	38
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>42</b>
<b>3</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>44</b>
3.1	Vírus da raiva: Partículas Inteiras.....	45
3.1.1	Suspensão de vírus da raiva.....	45
3.1.2	Concentração das partículas virais.....	45
3.1.3	Purificação das partículas virais.....	45
3.2	Vírus da raiva: Ribonucleoproteínas (RNPs).....	46
3.2.1	Obtenção de RNPs.....	46
3.2.2	Purificação das RNPs.....	47
3.2.3	Confirmação da presença de RNPs.....	47
3.3	Dosagem da concentração das partículas inteiras de vírus e RNPs.....	47
3.4	Produção de conjugados anti-vírus da raiva e anti-RNPs.....	48
3.4.1	Imunização de animais.....	48
3.4.2	Purificação das imunoglobulinas G (IgG).....	49
3.4.3	Conjugação das IgG ao isotiocianato de fluoresceína.....	51
3.4.4	Titulação dos lotes dos conjugados anti-vírus da raiva e anti-RNPs.....	51
3.5	Teste de sensibilidade e especificidade diagnóstico relativas.....	53
<b>4</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>56</b>
4.1	Vírus da raiva e Ribonucleoproteínas (RNPs).....	57
4.2	Confirmação da presença de nucleoproteínas (N).....	57
4.3	Soros hiperimunes de coelhos anti-vírus da raiva e anti-RNPs.....	58
4.4	Precipitação e purificação das IgGs.....	58
4.5	Lotes de conjugado anti-vírus da raiva e anti-RNPs.....	59
4.6	Testes de sensibilidade e especificidade diagnóstico relativas.....	60
<b>5</b>	<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>68</b>

<b>6</b>	<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>78</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>80</b>
	<b>ANEXOS.....</b>	<b>87</b>

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. A raiva

A raiva é uma encefalite aguda e progressiva, causada por um vírus RNA da família *Rhabdoviridae*, gênero *Lyssavirus*. O vírus da raiva é o único lissavírus conhecido no Novo Mundo, sendo que algumas regiões são consideradas livres, tais como: Hawaí e muitas ilhas no Oceano Pacífico e Caribe (exceto Cuba e República Dominicana, Haiti, Granada e Porto Rico). No entanto, a continuidade deste “status de livre” de raiva depende de métodos efetivos para prevenir a introdução do vírus e depende da atividade laboratorial, baseada na vigilância epidemiológica (Rupprecht e Gibbons, 2004).

As famílias *Rhabdoviridae*, *Paramyxoviridae*, *Filoviridae* e *Bornaviridae* constituem a Ordem *Mononegavirales*, na qual todos os membros apresentam genoma de RNA não segmentado, de sentido negativo e fita simples (Mayo, Pringle, 1998).

Estão descritos mais de 100 rbdovírus que infectam diferentes animais vertebrados (mamíferos, peixes e répteis), invertebrados e plantas, o que demonstra a grande diversidade da família *Rhabdoviridae*. Embora esta família possua 7 gêneros, apenas três infectam mamíferos: *Lyssavirus*, representado pelo vírus da raiva e aparentados, *Vesiculovirus*, representado pelo vírus da estomatite vesicular e relacionados e *Ephemerovirus*, representado pelo vírus da febre efêmera dos bovinos (Van Regenmortel *et al.*, 2000).

Após a realização de testes de imunidade cruzada em camundongos (Schneider *et al.*, 1973) e testes utilizando anticorpos monoclonais, foram definidos 4 sorotipos do gênero *Lyssavirus* (Wiktor, Flamand e Koprowsky, 1980).

Ao sorotipo 1, distribuído mundialmente, correspondiam as amostras clássicas, representadas pelas amostras de vírus fixo ou vacinais e amostras selvagens, isoladas da maioria dos mamíferos terrestres e de morcegos hematófagos, insetívoros e frugívoros das Américas. Ao sorotipo 2 correspondia o vírus *Lagos Bat*, amostras isoladas de morcegos e de um gato da região de Lagos na Nigéria, África. Ao sorotipo 3 correspondia o vírus *Mokola*, isolado de roedores e humano, também na África. O sorotipo 4 era representado pelo vírus *Duvenhage*, isolado de morcegos e humanos, na África (Wiktor, Flamand e Koprowsky, 1980).

Os vírus detectados em morcegos insetívoros na Europa, denominados “*European Bat Lyssavirus*” (EBL1 e 2) foram identificados como vírus aparentados, porém não foram classificados como novos sorotipos (Schneider, 1982).

Com a evolução dos estudos antigênicos e genéticos, passou-se a utilizar a nomenclatura de genótipos (Bourhy, 1992; Van Regenmortel *et al.*, 2000).

Atualmente são classificados sete genótipos (GT) dos lissavírus (Van Regenmortel *et al.*, 2000). Os sete genótipos são classificados em dois filogrupos, de acordo com as características sorológicas e patogênicas (Rotivel *et al.*, 2002).

**Tabela 1** – Filogrupos do gênero *Lyssavirus*, distribuição geográfica e principais vetores

<b>Espécie Viral</b>	<b>Geografia</b>	<b>Principais Vetores</b>
<b>Filogrupo 1</b>		
<b>GT1:</b> Vírus clássico da raiva	Mundo	Carnívoros e Morcegos
<b>GT4:</b> Vírus <i>Duvenhage</i>	África	Morcegos Insetívoros
<b>GT5:</b> <i>European bat lyssavirus 1-EBL1 (Eptesicus sp)</i>	Europa	Morcegos Insetívoros
<b>GT6:</b> <i>European bat lyssavirus 2-EBL2 (Myotis sp)</i>	Europa	Morcegos Insetívoros
<b>GT7:</b> <i>Australian bat lyssavirus – ABL (Pteropus sp)</i>	Austrália	Morcegos Frugívoros e Insetívoros
<b>Filogrupo 2</b>		
<b>GT2:</b> Vírus <i>Lagos bat</i>	África	Morcegos Frugívoros
<b>GT3:</b> Vírus <i>Mokola</i>	África	Roedores

Fonte: Rotivel *et al.*, 2002.

São conhecidas mais quatro variantes virais, que poderão ser consideradas novos lissavírus relacionados ao vírus da raiva, todos isolados de morcegos.

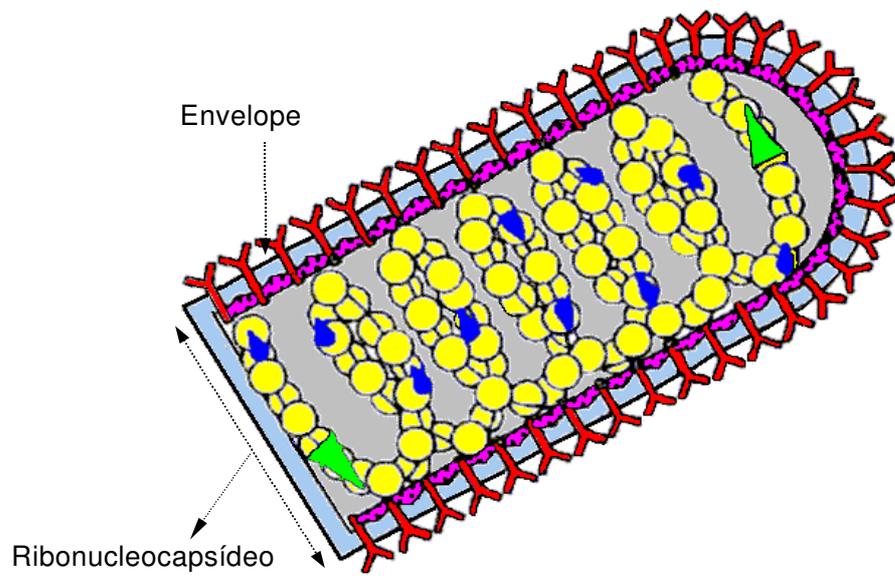
A variante Aravan virus, isolada em 1991, de um morcego insetívoro (*Myotis blythi*), no Kirquístão, Ásia Central, descrita em 2003 (Arai *et al.*, 2003; Kuzmin *et al.*, 2003); a variante Khujond, isolada em 2001, no noroeste do Tajikistão, Ásia Central, também em morcegos insetívoros (*Myotis mystacinus*) (Kuzmin *et al.*, 2003).

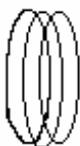
Na Rússia foram isoladas outras duas variantes, denominadas Irkut virus, na cidade de Irkutsk, em morcego *Murina leucogaster* e West Caucasian bat virus (WCBV), no Caucasus, de um morcego *Miniopterus schreibersi*. (Botvinkin *et al.*, 2003).

## 1.2 Estrutura e morfologia do vírus da raiva

A maioria dos rhabdovírus são cilíndricos, têm forma de “bala de fuzil”, com uma extremidade arredondada e outra plana. O vírus da raiva possui, em média, 180nm de comprimento e 75nm de diâmetro (Murphy, 1991).

Os diferentes genótipos do gênero *Lyssavirus* são formados pela combinação de cinco proteínas estruturais: nucleoproteína (N), fosfoproteína (P, M1 ou NS), proteína de matriz (M ou M2), glicoproteína (G) e a RNA-polimerase viral (L), de modo que a partícula viral completa contém de 2 a 3% de ácido ribonucléico (RNA), 67% de proteínas, 26% de lipídeos e 3% de carboidratos (Kaplan, Turner e Warrel, 1986). Estas cinco proteínas constituem duas estruturas principais, segundo suas funções biológicas: as ribonucleoproteínas (RNPs) e o envelope viral (Figura 1) .



-  **Proteína M**
-  **Glicoproteína G**
-  **Fosfoproteína P**
-  **Nucleoproteína N**
-  **Proteína L**
-  **RNA genômico**

**Figura 1:** Esquema representando a estrutura do vírus da raiva (adaptado de Bourhy, Sureau e Tordo, 1990)

As ribonucleoproteínas (RNPs), ou nucleocapsídeo, apresentam-se sob a forma de um complexo helicoidal constituído de RNA de fita simples associado às proteínas N, L e NS (Tordo *et al.*, 1986).

A proteína N é constituída por 450 aminoácidos, com peso molecular de 50,5 kDa e é a proteína de maior importância no processo de encapsidação, preenchendo o cilindro helicoidal do nucleocapsídeo (Tordo *et al.*, 1986).

A fosfoproteína NS é constituída por 297 aminoácidos, com peso molecular de 33 kDa e está relacionada à replicação viral, assim como a proteína L (RNA - polimerase), que é constituída por 2214 aminoácidos, com peso molecular de 244,2 kDa e é responsável pelas atividades enzimáticas, necessárias para a transcrição e replicação viral (Lafon e Wiktor, 1985).

O envelope viral é constituído por uma bicamada lipídica, à qual estão associadas duas proteínas: a proteína M e a glicoproteína G.

A proteína M localiza-se na face interna do envelope lipídico, tendo como função a ligação entre o envelope e o complexo RNPs, além de regular a replicação viral. Esta proteína constitui a matriz protéica do vírus da raiva, sendo constituída por 202 aminoácidos, com peso molecular de 23 kDa (Tordo *et al.*, 1986). Outra função atribuída à proteína M é a regulação da polimerase viral, suprimindo completamente a atividade de transcrição da polimerase, durante o processo de brotamento do vírus da célula hospedeira (Ito *et al.*, 1996).

A proteína responsável pela ligação do vírus à célula hospedeira é a glicoproteína G, a qual é uma proteína transmembranária que forma espículas glicolisadas na superfície viral, sendo constituída por 524 aminoácidos, com peso molecular de 58,5 kDa, (Tordo *et al.*, 1986).

A glicoproteína G é o único antígeno viral capaz de induzir a formação de anticorpos neutralizantes (AcN) (Cox, Dietzschold e Schneider, 1977), além de possuir funções biológicas, como a de servir como receptor na superfície dos vírus e como sítio de ligação de anticorpos.

### **1.3 Replicação viral**

O vírus da raiva é constituído por um genoma de uma única molécula de RNA não segmentado, de fita-simples com polaridade negativa (3' – 5'). A molécula não é diretamente traduzida pela máquina celular, mas serve de molde para uma transcrição autônoma, dando origem às moléculas complementares positivas, capazes de produzir novas partículas virais (Tordo, 1991).

Para infectar uma célula, o vírus da raiva se fixa ao receptor celular, através da glicoproteína G presente no envelope viral, e em seguida penetra na célula por endocitose e pelo contato com lisossomos libera as ribonucleoproteínas (Lentz *et al.*, 1982, 1984; Surpeti, Dered e Tsiang, 1984).

As ribonucleoproteínas, quando liberadas no citoplasma celular, iniciam o processo de transcrição e replicação. A polimerase L (RNA – polimerase viral) inicia a transcrição dos cinco genes estruturais do vírus. A transcrição do RNA genômico se efetua da extremidade 3' em direção à extremidade 5', produzindo primeiro um RNA líder e depois cinco RNAs mensageiros, que correspondem às proteínas N, NS, M, G e L. Em seguida, há uma segunda etapa replicativa, na qual as fitas positivas serão moldes para a produção de fitas negativas complementares (Banerjee, 1987).

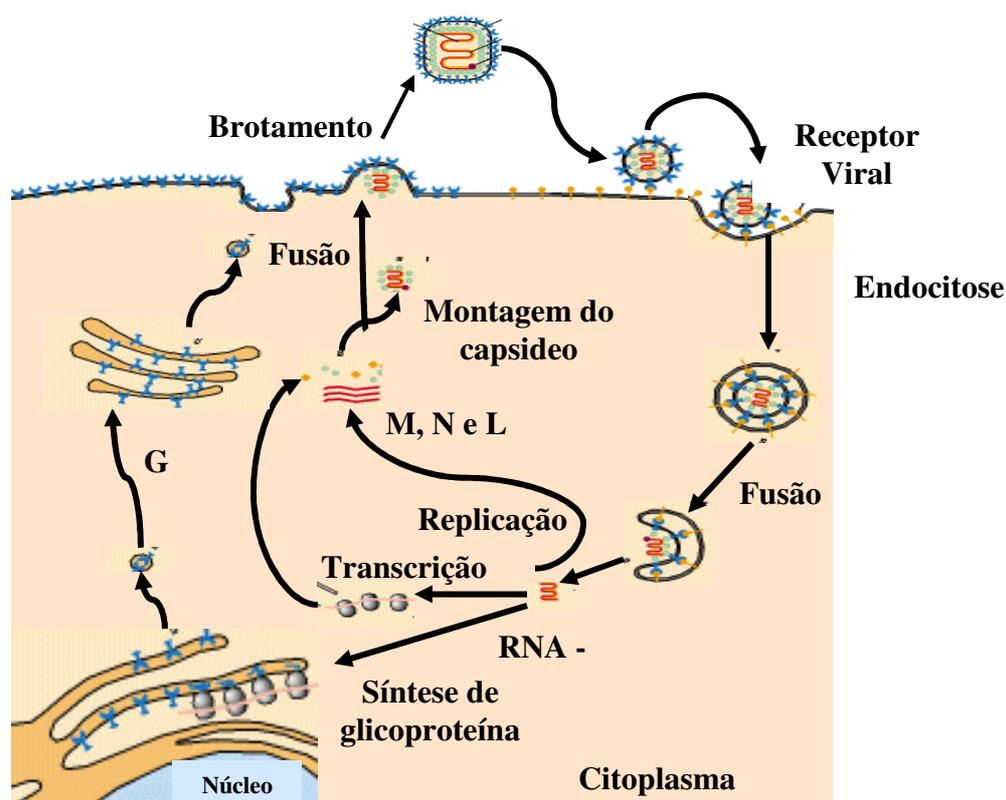
Todas as proteínas virais são traduzidas pela “maquinaria” da célula hospedeira. As proteínas N, NS, M e L são sintetizadas nos ribossomos livres no citoplasma, enquanto que a glicoproteína G é sintetizada nos ribossomos ligados à membrana do retículo endoplasmático (RE). Após a síntese da G, esta é

transportada para dentro do RE, onde se iniciam os processos de formação de trímeros e a glicosilação, a qual só termina no complexo de Golgi (Shakin-Eshleman *et al.*, 1992; Whitt *et al.*, 1991; Gaudin *et al.*, 1992; Kornfeld e Kornfeld, 1985).

Uma vez que grandes quantidades de proteínas virais são formadas, inicia-se o processo de montagem do ribonucleocapsídeo e saída das novas partículas virais da célula hospedeira, o que ocorre enquanto a célula se mantém metabolicamente competente. A morfogênese viral está associada com a formação de uma matriz intracitoplasmática, conhecida como corpúsculos de Negri, o que antecede a formação das novas partículas virais (Matsumoto, 1962).

Nos estágios finais, a partícula viral madura é revestida com a membrana plasmática celular, formando, juntamente com a glicoproteína, o envelope viral e finalmente liberando novas partículas virais infectantes (Wunner, 2002).

A representação esquemática da replicação do vírus da raiva está sumarizada na figura 2.



**Figura 2:** Representação esquemática do ciclo de replicação do vírus da raiva, evidenciando-se os processos de adsorção, penetração, replicação, maturação e liberação de novas partículas virais infectantes. Fonte: Pieri, 2003.

#### 1.4 Diagnóstico laboratorial da raiva

O diagnóstico da raiva baseado na observação clínica, em animais encontra dificuldades em distinguir-se de outras encefalites causadas por outras infecções virais, incluindo cinomose canina. Em humanos, a raiva pode ser confundida com a síndrome de Guillain-Barré, poliomielite, e outras encefalites virais (Plotkin, 2000).

O diagnóstico laboratorial da raiva deve ser rápido e preciso, uma vez que os resultados laboratoriais influenciam não só a decisão médica de se instituir o tratamento profilático em humanos, como também a elaboração de medidas de controle de uma possível epizootia em uma comunidade (Meslin e Kaplan, 1996).

Inclusões citoplasmáticas chamadas de corpúsculos de Negri, observadas por Adelchi Negri, em 1903, em células do sistema nervoso central infectadas pelo vírus

da raiva , são o sinal patognomônico da doença (Perl e Good 1991; Lépine e Atanasiu, 1996).

Em 1927, foi utilizada no diagnóstico da raiva a coloração de Sellers, que consistiu na observação dos corpúsculos de Negri, através de um corante adequado, corante de Sellers (Rupprecht, Hanlone e Hemachuda, 2002). Esta técnica não vem sendo mais utilizada rotineiramente, visto que a Organização Mundial de Saúde tem recomendado o isolamento viral e a imunofluorescência direta (Tierkel e Atanasiu, 1996).

Com recentes desenvolvimentos tecnológicos, a evidência da existência da infecção pelo vírus da raiva pode ser demonstrada por detecção de vírus inteiro, proteínas virais ou RNA viral em amostras de tecido. Os métodos empregados incluem microscopia eletrônica (ME), teste de imunofluorescência direta (IFD), teste de imunofluorescência indireta (IFI), cultivo de vírus *in vivo* e em *in vitro*, imunohistoquímica, ensaio imunoenzimático, hibridização molecular com ácidos nucléicos ligados por meio de sondas e reação em cadeia pela polimerase (RT-PCR). Evidência indireta da infecção pelo vírus da raiva pode ser inferida pela demonstração de anticorpos neutralizantes específicos, em soros de indivíduos não vacinados ou em fluído cérebro-espinhal (Trimarchi e Smith, 2000). O teste de IFD realizado para a detecção de vírus da raiva é extremamente usado como método preferencial, em escala global (Rudd *et al.*, 2005), sendo também o teste revelador em cultura de células, tanto para o isolamento viral como na avaliação do título de anticorpos neutralizantes.

#### **1.4.1 Detecção do vírus da raiva por IFD**

O teste de imunofluorescência consiste em uma reação sorológica na qual, para se detectar a reação antígeno-anticorpo, utiliza-se um sistema revelador,

chamado conjugado, que é uma substância fluorescente (fluorocromo), ligada ao anticorpo. Esta reação deve ser visualizada ao microscópio de fluorescência. Determinadas substâncias fluorescentes, como o isotiocianato de fluoresceína (ITCF), possui a propriedade de absorver luz de determinado comprimento de onda (luz ultravioleta) e emitir luz de comprimento de onda maior (luz verde). Os antígenos reagentes com o anticorpo marcado, no caso da raiva, aparecem como partículas ou corpúsculos, ovalados ou arredondados, intracitoplasmáticos (Webster e Casey 1988; Dean, Abelseth e Atanasiu, 1996).

Dada sua importância, tanto na pesquisa básica como na aplicada ao diagnóstico, as reações de imunofluorescência necessitam de condições especiais, tais como: microscópio de fluorescência adequado, profissionais treinados para a interpretação de resultados e qualidade do conjugado utilizado para revelar as reações (Webster e Casey, 1988). A rapidez, relativa facilidade de execução e economia faz deste teste o mais utilizado na maioria dos laboratórios para o diagnóstico da raiva do mundo (Dean, Abelseth e Atanasiu, 1996).

O teste de IFD, considerado “padrão ouro” para o diagnóstico da raiva (Rupprecht, Hanlone e Hemachuda, 2002), é realizado em sistema nervoso central (SNC) de várias espécies animais suspeitas de infecção pelo vírus da raiva e para controle epidemiológico da doença.

#### **1.4.2 Isolamento viral**

Em 1935, Webster e Dawson preconizaram a inoculação intracerebral de camundongos para o diagnóstico e para a sorologia da raiva. A utilização de camundongos albinos suíços apresenta alta sensibilidade, porém com resultados demorados, uma vez que o período de incubação do vírus de rua, nesses animais, é de 7 a 21 dias.

O primeiro relato de isolamento do vírus da raiva em cultura de células foi em 1930 (King, 1996). Tais estudos demonstraram que essa técnica também apresentava alta sensibilidade, com a vantagem de reduzir substancialmente o tempo para obtenção dos resultados (72 - 96 horas) e apresentar menor custo, pois dispensa a necessidade da manutenção de animais de laboratório.

As células de neuroblastoma murino (N2A – C 1300) apresentam maior sensibilidade à infecção que outras linhagens celulares (Clark, 1978; King, 1996; Webster e Casey, 1996). A confirmação do isolamento do vírus da raiva nessas linhagens celulares é feita pela ligação de anticorpos conjugados a substância fluorescente aos antígenos rábicos.

#### **1.4.3 Avaliação sorológica**

A avaliação do título de anticorpos é de fundamental importância para determinar a proteção do indivíduo à raiva após a vacinação, seja em situações de pré ou pós-exposição.

Foram desenvolvidos muitos testes para avaliação de anticorpos e estão disponíveis atualmente, tais como imunofluorescência indireta (Thomas, Sikes e Ricke, 1963), contra-immunoeletroforese (Diaz *et al.*, 1986), ELISA (Piza, Chaves e Zanetti, 1999) e outros.

Devem ser levados em conta uma série de fatores quanto ao teste mais adequado nos laboratórios que realizam o diagnóstico da raiva, de acordo com a infra-estrutura e equipamentos disponíveis. No entanto, os únicos testes recomendados pela Organização Mundial de Saúde são aqueles que avaliam a presença de anticorpos neutralizantes.

O teste de soroneutralização em camundongos (Webster e Dawson, 1935) continua sendo utilizado em muitos laboratórios por não necessitar de equipamentos

especializados, porém apresenta desvantagens para uma rotina com grande número de amostras de soros, pelo uso elevado de animais e demora na obtenção de resultados.

Testes “in vitro” que avaliam o título de anticorpos neutralizantes utilizando células BHK-21 (Baby Hamster Kidney) para a infecção viral, foram desenvolvidos, como o teste rápido de inibição de focos fluorescentes (RFFIT), (Smith, Yager e Baer, 1973), o qual foi modificado por Zalan, Wilson e Pukitis (1979), chamado de microteste de inibição de fluorescência (FIMT), possibilitando o processamento de um grande número de soros. Baseado nestes dados, foi desenvolvido no Instituto Pasteur de São Paulo um microteste simplificado de inibição de focos fluorescentes (SFIMT) (Favoretto *et al.*, 1993), atualmente utilizado no Brasil, rotineiramente, na avaliação da imunidade de pessoas vacinadas contra a raiva.

### **1.5 Conjugado fluorescente anti-vírus da raiva**

Em 1933, pela primeira vez, marcaram-se proteínas com substâncias químicas corantes (Heidelberger, Kendall e Soo Hoo, 1933) e em 1941 teve início o uso de compostos químicos fluorescentes (Coons, Creech e Jones, 1941).

Coons, *et al.* (1942), aplicaram pela primeira vez a técnica de anticorpos fluorescentes em microbiologia e, a partir de 1950, surgiram uma série de trabalhos descrevendo o uso desta técnica para distintos microorganismos (Larghi, 1971).

Em 1958, Goldwasser e Kissling adaptaram a técnica de anticorpos fluorescentes para a identificação de antígenos do vírus da raiva, em amostras selvagens e em cérebro de camundongos experimentalmente infectados com vírus fixo Challenge Virus Standard - CVS (McQueen, Lewis e Schneider, 1962). Subseqüentemente, Dean e Abelseth, em 1973, usaram suspensão inativada de cérebro de camundongos infectados com o vírus da raiva como fonte de antígenos,

para imunização de animais e obtenção de anticorpos concentrados, após tratamento com sulfato de amônio (Perrin, 1996).

O advento da infecção de cultura de células com o vírus da raiva permitiu sua replicação em larga escala para a extração e purificação de partículas inteiras do vírus e RNPs, padronizada por Compans e Choppin, em 1967 e modificada por Sokol, Stancer e Koprowski em 1973, empregando as metodologias de ultracentrifugação em gradiente de sacarose e gradiente de cloreto de céσιο, respectivamente.

Com a purificação de partículas inteiras de vírus da raiva e RNPs, foi possível obter soros de coelhos com altos títulos de anticorpos anti-vírus da raiva e anti-RNPs. IgG purificadas puderam ser rapidamente obtidas usando técnica de cromatografia de troca iônica em coluna de QAE-Sephadex A50 (Joustra e Lundgren, 1969), a partir da purificação de IgG e conjugação ao ITCF, isto resultou num reagente melhor do que aqueles obtidos com base em métodos como precipitação com sulfato de amônio, etanol ou outros previamente desenvolvidos de fracionamento de soros (Atanasiu, Tsiang e Virat, 1974).

Os conjugados usados no diagnóstico por IFD para detecção do vírus da raiva em SNC de animais suspeitos e em cultura de células infectadas, são provenientes de soros hiperimunes de animais que podem ser imunizados com vacinas, vírus partículas inteiras ou RNPs purificadas. Outra possibilidade surgiu com a introdução da tecnologia de hibridomas, por Kohler e Milstein em 1975, que permitiu a produção de anticorpos monoclonais para a produção de conjugados puros e específicos, preparados a partir de coquetel desses anticorpos. Entretanto, os conjugados derivados de anticorpos monoclonais requerem rigidez na execução dos protocolos estabelecidos (Rudd *et al*, 2005).

A obtenção de conjugado anti-vírus da raiva, anti-RNPs purificadas ou anticorpos monoclonais é feita por meio da conjugação do ITCF a anticorpos específicos purificados. O ITCF é o fluorocromo mais utilizado na técnica de imunofluorescência para o diagnóstico da raiva, por sua estabilidade e por apresentar fluorescência característica, em que os anticorpos aparecem, à luz ultravioleta, como partículas brilhantes de cor maçã-verde sobre um fundo escuro (Dean e Abelseth, 1973).

Considerando-se a necessidade de títulos de anticorpos anti-vírus da raiva acima de 1.000 UI/mL e anti-RNPs acima de 1:1500, a imunização de animais utilizando partículas inteiras do vírus da raiva e RNPs purificadas, induz maiores títulos de anticorpos, do que a imunização feita com vacinas, mesmo aquelas produzidas em cultura de células, as quais possuem alta potência.

O diagnóstico laboratorial da raiva no Brasil, apresenta anualmente elevado número de exames. O teste de IFD é rotineiramente empregado para a detecção de vírus da raiva em amostras de animais suspeitos e avaliação do título de anticorpos neutralizantes. Sendo o conjugado fluorescente, o reagente revelador da reação de IFD, a produção desses conjugados necessita de alta especificidade e sensibilidade, seja pela obtenção de soros anti-vírus da raiva ou anti-RNPs. Isso é fundamental para a confiabilidade dos resultados do teste, uma vez que estes podem determinar o tratamento de pacientes que foram agredidos por animais suspeitos de infecção pelo vírus da raiva e estratégias de controle epidemiológico da doença.

A nucleoproteína é a mais conservada estruturalmente e o maior grau de conservação ocorre nas amostras fixas do vírus da raiva. É também a mais conservada antigênicamente, e por estas razões é a mais utilizada para diagnóstico

e estudos das relações evolutivas e epidemiológicas (Tordo e Kouknetzoff, 1993; Wunner, 2002). Desta maneira os conjugados produzidos a partir de ribonucleoproteínas purificadas, são altamente específicos.

Além de apresentarem anticorpos anti-ribonucleoproteínas, os conjugados produzidos com vírus partículas inteiras purificadas possuem anticorpos anti-proteína M e anti-glicoproteína.



## 2. OBJETIVOS

- Aplicar metodologias de purificação para o vírus da raiva e ribonucleoproteínas, para a produção de conjugados destinados ao diagnóstico laboratorial da raiva pelo teste de imunofluorescência direta
- Verificar a sensibilidade e a especificidade dos conjugados produzidos com as diferentes metodologias de purificação aplicadas.
- Produzir reagentes específicos com altos títulos, possibilitando uma melhor vigilância epidemiológica por meio do diagnóstico laboratorial e a intensificação da pesquisa científica em raiva.



### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1 Vírus da Raiva: Partículas Inteiras**

##### **3.1.1 Suspensão de vírus da raiva**

Dois litros de suspensão viral inativada, contendo amostra Pasteur Virus - PV replicada em cultura de células BHK-21 foram cedidos pela indústria de produtos veterinários Valleé S.A.

##### **3.1.2 Concentração das partículas virais**

A suspensão viral foi centrifugada a 3000 g, por 20 minutos a 4°C, para a retirada de células e “debris” celulares do sobrenadante (Dietzschold, 1996).

A concentração das partículas virais foi realizada por ultracentrifugação a 50.000 g e 4°C por 2 horas (Hitachi, rotor CP70β), utilizando-se tubos com capacidade de 250 mL. O sobrenadante foi desprezado e o precipitado de cada tubo foi ressuspendido em 0,5 mL de tampão NT (NaCl – TRIS), pH 7.6 (anexo).

##### **3.1.3 Purificação das partículas virais**

A purificação das partículas virais concentradas foi realizada pelo método de ultracentrifugação por gradiente de sacarose. Diferentes concentrações de sacarose (20, 25, 30, 35, 40, 45, e 50%) foram preparadas com tampão NT pH 7.6 e 5 mL de cada concentração foram adicionados, cuidadosamente, em tubos com capacidade de 50 mL, iniciando-se da maior concentração para a menor. Os tubos permaneceram 24 horas a 4°C para a formação de um gradiente contínuo (Perrin, 1996).

Sobre cada tubo do gradiente contínuo foram adicionados 3 mL de vírus concentrado e ultracentrifugados a 100.000 g e 4°C por 2 horas (Hitachi, rotor P28S). As bandas formadas de aproximadamente 1,7 mL, contendo as partículas virais, foram coletadas com seringa e agulha estéreis. O volume total coletado foi

dialisado em membrana de celulose (Sigma) com tampão NT pH 7.6, por 24 horas a 4°C, sob agitação magnética.

## **3.2 Vírus da Raiva: Ribonucleoproteínas (RNPs)**

### **3.2.1 Obtenção de RNPs**

Utilizou-se suspensão viral de amostra PV, na diluição de 1:64, adaptada à cultura de células BHK-21, cultivadas em monocamadas, em meio essencial mínimo de Eagle (MEM), suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB). Para a propagação das partículas virais foram utilizados 24 frascos (Corning) para cultura celular com capacidade de 225 cm<sup>2</sup>. As células BHK-21 foram tripsinizadas e a concentração utilizada foi 5 x 10<sup>5</sup> células/mL.

Foram adicionados 9 mL de suspensão de células em cada frasco e, concomitantemente, 9 mL de suspensão viral diluída previamente, completando-se o volume com 72 mL de MEM, contendo 10% de SFB. Os frascos foram levados à estufa por 48 horas a 34°C e após este período, o sobrenadante de cada frasco foi desprezado e o tapete celular foi lavado com 40 mL de tampão PBS 0.01M pH 7.0 estéril (anexo). O tapete celular foi raspado com raspadores (“cell scraper” 32 cm - Nunc) para a individualização das células, as quais foram ressuspensas com tampão NT 0,5 M pH 7,6 estéril e gelado e centrifugadas 2 vezes a 900g e 4°C por 10 minutos.

A lise das células foi realizada, adicionando-se 5 mL de água (Milli-Q) estéril, gelada, contendo Aprotinina (1000 unidades inibidoras de “kalikreina” – KIU/Sigma), para cada 2 mL de conteúdo celular em tubos com capacidade de 50 mL (Dietzschold,1996), permanecendo assim por 1 hora a 4°C. A lise foi intensificada com agitação manual esporádica dos tubos.

Após este período, realizou-se centrifugação a 1000 g e 4°C por 20 minutos. O sobrenadante foi recolhido e o procedimento descrito anteriormente foi repetido duas vezes. Ao final, o volume total do sobrenadante foi coletado e centrifugado a 12000 g e 4°C por 10 minutos.

### **3.2.2 Purificação das RNPs**

A purificação das RNPs foi realizada pelo método de ultracentrifugação em gradiente de Cloreto de Césio (CsCl) conforme descreveu Dietzschold (1996).

Para cada 3,0 a 4,0 mL de sobrenadante contendo as RNPs foram adicionados e dissolvidos 2 g de CsCl em tubos de policarbonato com capacidade de 5 mL. O volume final foi completado para 5 mL com tampão NT pH 7.6, e ultracentrifugado a 150.000g e 4°C por 18 horas, a 4°C (Hitachi, rotor P55ST2).

As bandas formadas, aproximadamente 0,7 mL de cada tubo, foram coletadas com seringa e agulha estéreis. O volume total obtido foi dialisado em membrana de celulose (Sigma) com tampão NT pH 7.6, por 24 horas a 4°C, com trocas sucessivas de tampão (Perrin, Lafon e Versmisse, 1985).

### **3.2.3 Confirmação da presença de RNPs**

Esta etapa foi realizada por meio de eletroforese (Delagneau, Perrin e Atanasiu, 1981) em gel de poli-acrilamida com Dodecil Sulfato de Sódio (SDS-PAGE) a 12,5%, com empilhamento a 5%, para a determinação da presença das proteínas virais, em comparação aos pesos moleculares de proteínas padrão (BIO-RAD).

### **3.3 Dosagem da concentração das partículas inteiras de vírus e RNPs**

A dosagem de proteínas foi realizada por espectrofotometria, pelo método de cálculo das absorvâncias 260/280 nm e os resultados foram expressos em mg/mL (Bollog e Edelstein, 1991).

Desta maneira, o volume total obtido, de partículas virais inteiras e RNPs purificadas, foi fracionado em alíquotas contendo 200 µg e armazenado a -20°C, para posterior imunização de animais.

### **3.4 Produção de conjugados anti-vírus da raiva e anti-RNPs**

Após a purificação de vírus da raiva e das RNPs, os conjugados foram preparados, seguindo-se as etapas abaixo descritas.

#### **3.4.1 Imunização de animais**

Dois grupos de 4 coelhos hípidos da raça Nova Zelândia, com peso de aproximadamente 3,0 kg e 4 meses de idade, foram imunizados, com vírus da raiva (Grupo A) e RNPs (Grupo B).

O esquema de imunização aplicado aos dois grupos de coelhos consistiu em 4 doses, com intervalos de 7 dias e dois reforços, com intervalos de 14 dias (0, 7, 14, 21, 35 e 49). As injeções foram administradas via subcutânea multi-sítio, preparadas com doses de 1 mL contendo 200 µg de vírus da raiva para o grupo A e 200 µg de RNPs para o grupo B, diluídas em tampão PBS 0.01M pH 7.0 e 0.5 mL de adjuvante completo de Freund na primeira dose e para as doses subseqüentes foram adicionados 0,5 mL de adjuvante incompleto de Freund. Foram realizadas sangrias de prova após 10 dias da última dose, por meio da veia auricular. As coletas eram de aproximadamente 300 µL de sangue total.

Os títulos de anticorpos das amostras dos soros dos coelhos do grupo A foram calculados pelo microteste simplificado de inibição de focos fluorescentes, em cultura celular SFIMT (Favoretto *et al.*, 1993). Neste teste apenas os anticorpos neutralizantes (anti-glicoproteína) são avaliados e expressos em UI/mL. Os animais que apresentaram títulos de anticorpos neutralizantes  $\geq 1000$  UI/mL foram selecionados para a obtenção de soro hiperimune e por meio de punção intra-

cardíaca foi obtido o sangue total. Esses animais foram devidamente sedados e eutanasiados no decorrer deste procedimento, obedecendo-se as normas éticas. A avaliação das amostras de soros dos coelhos imunizados com RNPs (Grupo B) foi realizada pelo teste de imunofluorescência indireta (Goldwasser e Kissling, 1958).

Foram realizadas diluições seriadas dos soros (razão 2), de 1:200 a 1:3200. As lâminas foram lidas em microscópio de fluorescência (Leica) com aumento de 400x até a diluição que apresentou máxima fluorescência, indicando a presença de anticorpos anti-RNPs.

Os coelhos do grupo A, que não apresentaram títulos satisfatórios, receberam duas doses de reforço nos dias 35 e 49. Após 10 dias foi realizada a eutanásia dos animais conforme descrita anteriormente, para obtenção de sangue total sem prévia avaliação dos títulos de anticorpos anti-vírus da raiva. O mesmo procedimento foi realizado para os coelhos do grupo B que apresentaram baixa fluorescência a partir da diluição 1:800.

Os soros obtidos dos grupos A e B foram centrifugados separadamente a 1000 g e 4°C por 20 minutos e armazenados a -20°C para posterior purificação dos anticorpos.

Para a purificação das IgG e produção dos lotes de conjugados, foram selecionados um soro do grupo A, denominado VR/02 e um soro do grupo B, denominado RNPs/01, considerando-se o maior título obtido em UI/mL e a diluição de máxima fluorescência, respectivamente.

#### **3.4.2 Purificação das imunoglobulinas G (IgG)**

Para a purificação das IgG, os soros foram descongelados e filtrados em membranas de 0,22 µm (Millipore).

Adicionou-se a 25 mL de cada soro o mesmo volume de tampão Etilenodiamina – TED (anexo), os quais foram dialisados utilizando-se o mesmo tampão por 24 horas.

A purificação das IgG anti-vírus da raiva foi realizada por cromatografia, em coluna de vidro graduada com 1,8 cm de diâmetro e 1,20 m de altura (Vidrolabor). A resina utilizada para purificação foi de troca iônica (Sephadex QAE-50), sendo que a partir de 8 g de resina hidratada com tampão TED pH 7.0 obteve-se 80 mL de gel (Joustra e Lundgren, 1969).

O soro dialisado foi adicionado sobre o gel e foram coletadas frações de aproximadamente 2,0 mL. As frações foram lidas em espectrofotômetro a 280 nm e somente aquelas com densidade ótica (DO)  $\geq 1,0$  foram utilizadas para a etapa de precipitação das IgG.

As frações foram reunidas e ao volume total obtido adicionou-se o mesmo volume de solução saturada de sulfato de amônio (anexo), sob agitação branda em banho de gelo por 30 minutos. A solução foi distribuída em tubos para centrífuga com capacidade de 50 mL e centrifugada a 1500 g e 4°C por 30 minutos. O sobrenadante foi desprezado e o precipitado de IgG, de cada tubo, foi dissolvido em 1 mL de tampão PBS 0.01M pH 7.0.

O volume total obtido foi dialisado por 24 horas, em tampão PBS 0.01M pH 7.0, com trocas sucessivas. Utilizou-se reagente de Nessler (anexo) para verificar a ausência do sulfato de amônio da solução de IgG.

A dosagem de proteínas foi realizada por meio de espectrofotômetro pelo método de absorbância a 280 nm (Bollog e Edelstein, 1991).

### **3.4.3 Conjugação das IgG ao isotiocianato de fluoresceína**

Para realizar a conjugação das IgG ao ITCF foi adicionado 10% do volume total de IgG de tampão carbonato/bicarbonato de sódio 0.5M, pH 9.0 (anexo) e em seguida 1 mg de ITCF para cada 100 mg de proteínas, após ter sido ajustada a concentração de IgG na solução para 20 mg/mL com tampão carbonato/bicarbonato 0.05M, pH 9.0 (anexo). A solução foi mantida sob agitação magnética branda a 4°C, por 24 horas.

Para a eliminação do excesso de ITCF não conjugado a solução foi filtrada em coluna de cromatografia utilizando-se resina de separação por peso molecular (Sephadex G50 - Sigma). Para aproximadamente 10 mL de solução de IgG, foram hidratadas 4 g de resina e o gel foi equilibrado com tampão PBS 0.01M pH 7.0, em coluna de vidro graduada com 0.8 cm diâmetro e 35 cm de altura (Vidrolabor).

Os conjugados anti-vírus da raiva e anti-RNPs contidos na primeira fração coletada, após filtração em membrana de 0,22 µm (Millipore), foram diluídos a 1:2 em glicerina tamponada, pH 7.0 (anexo), para conservação a 4°C.

### **3.4.4 Titulação dos conjugados anti-vírus da raiva e anti-RNPs**

Após a produção dos dois conjugados denominados lote Instituto Pasteur anti-vírus da raiva (L.IP. CA-VR/04) e lote Instituto Pasteur anti-ribonucleoproteínas (L.IP CA-RNPs/04) foram realizadas as titulações para a determinação do título de uso nos testes de IFD e soroneutralização em cultura celular.

#### **➤ Imunofluorescência Direta**

A titulação dos lotes L.IP. CA-VR/04 e L.IP CA-RNPs/04, para uso nos testes de IFD foi realizada em lâminas com decalques de tecido de sistema nervoso de camundongos infectados com o vírus da raiva (vírus selvagem).

Foram feitas diluições seriadas (razão 2) de 1:10 a 1:640 dos conjugados e realizado o teste descrito por Dean et al., 1996.

A reação foi lida em microscópio de fluorescência (Leica) filtro ultravioleta, lâmpada HBO-50, com aumento de 400x. Considerou-se como título final a maior diluição, que apresentou intensidade máxima de fluorescência específica, observando-se no controle negativo a ausência de quaisquer traços de fluorescência (fundo escuro).

➤ **Microteste simplificado para avaliação de anticorpos neutralizantes (SFIMT)**

Foram utilizadas microplacas de fundo chato, para cultura celular com 96 cavidades (Corning). Adicionaram-se, em cada uma das cavidades 50 µL de suspensão de células BHK-21 ( $5 \times 10^5$  células/mL) e 50 µL de suspensão de vírus da raiva, amostra PV diluída previamente 1:60. Como controle negativo usou-se apenas células BHK-21 não infectadas. Após 24 horas de incubação a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>, o sobrenadante das placas foi aspirado. As placas foram colocadas em banho de gelo e as células foram fixadas com acetona a 80%, gelada (anexo), por 15 minutos.

Os conjugados foram diluídos (razão 2) de 1:5 a 1:2560 em tampão PBS 0.01M, pH 7.0, com azul de Evans, e transferidos 40 µL de cada diluição em 8 cavidades das microplacas com células infectadas com PV e 8 cavidades com células não infectadas (controle negativo).

O título de uso dos lotes dos conjugados foram determinados pela observação em microscópio invertido de fluorescência (Leica) filtro ultravioleta, lâmpada HBO-50, com aumento de 100x. Este título foi a maior diluição em que

houve intensidade máxima de fluorescência específica, não apresentando quaisquer traços de fluorescência nos controles negativos.

### **3.5 Testes de sensibilidade e especificidade diagnóstico relativas**

Foram feitos os cálculos da sensibilidade e especificidade relativas dos conjugados anti-vírus da raiva e anti-RNPs, segundo descrito por Filho e Rouquayrol, 2002.

Para o cálculo de sensibilidade foi definido como teste verdadeiro positivo a presença de corpúsculos de Negri bem definidos, com brilho e fluorescência intensos. E como teste verdadeiro negativo, para o cálculo da especificidade, considerou-se a ausência de fluorescência.

O teste para essa determinação foi a IFD e como padrão utilizou-se o conjugado comercial anti-nucleocapsídeo (BIO-RAD) na diluição 1:20, conforme recomendação do fabricante.

#### **➤ Amostras de SNC**

Foram utilizadas 100 amostras de tecido de SNC de animais, sendo: 39 bovinos, 20 eqüinos, 17 cães, 4 gatos, 3 caprinos, 1 suíno, 5 ovinos, 2 muares e 8 humanos, positivas e negativas, para o teste de IFD. Eram provenientes de vários municípios de São Paulo e outros Estados, em diferentes estados de conservação e haviam sido anteriormente processadas pelo laboratório do Instituto Pasteur, permanecendo armazenadas a - 80 °C.

As amostras foram analisadas sem o conhecimento dos resultados, anteriormente obtidos pelo laboratório do Instituto Pasteur.

➤ **Testes de IFD em SNC**

As amostras de SNC utilizadas para o teste de IFD, que estavam acondicionadas em freezer - 80°C, foram descongeladas e processadas em lotes de 10 a cada dia.

Foram preparadas 3 lâminas de cada amostra com decalques de tecido cerebral (Corno de Amon), utilizando-se sempre o mesmo fragmento. As lâminas foram fixadas com acetona PA gelada, por 45 minutos em freezer - 20°C.

Os dois lotes de conjugados produzidos foram utilizados na diluição anteriormente determinada, assim como o conjugado comercial anti-nucleocapsídeo. Os conjugados foram diluídos em suspensão de cérebro de camundongo normal e em suspensão a 20% de cérebro de camundongo infectado com CVS.

A leitura foi feita em microscópio de fluorescência (Leica), filtro ultravioleta, lâmpada HBO-50, com aumento de 400x, sem imersão.

➤ **Testes de IFD em cultura de células N2A e BHK-21**

Lamínulas redondas estéreis foram colocadas em placas de fundo chato, com 12 cavidades (Corning) e adicionaram-se sobre cada lamínula 100 µL de células N2A ( $5 \times 10^5$  células/mL), previamente tripsinizadas e 50 µL de suspensão de tecido de sistema nervoso positivo para raiva. Completou-se o volume com 2,5 mL de MEM, suplementado com 10% de SFB. A placa foi incubada a 37°C com 5% CO<sub>2</sub> por 96 horas e, após este período, as lamínulas foram retiradas das cavidades e fixadas com acetona a 80% gelada, por 10 minutos.

Células BHK-21 foram infectadas, seguindo-se os mesmos procedimentos descritos anteriormente para a infecção de células N2A, porém com a amostra de vírus PV, previamente diluída a 1:64, e o período de incubação foi de 24 horas.

Após fixar as lamínulas, foi realizado o teste de IFD, utilizando-se os mesmos conjugados, acima descritos.

➤ **Fotografias**

Foram selecionadas lamínulas com células BHK-21 e N2A infectadas com PV e lâminas com decalques de SNC positivos de humano, cão e bovino, com seus respectivos controles negativos, para serem fotografadas em microscopia confocal, no Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de São Paulo.



## 4. RESULTADOS

### 4.1 Vírus da raiva e ribonucleoproteínas (RNPs)

Na etapa de concentração, foram obtidos 8,0 mL de vírus da raiva, os quais, após a purificação, resultaram em um volume final de 5,0 mL.

A concentração de vírus da raiva, determinada por espectrofotometria, foi 4,0 mg/mL.

O volume de conteúdo celular foi 9,5 mL. Após a lise das células, o volume de sobrenadante contendo as RNPs foi 28 mL.

A partir da purificação das RNPs, obteve-se um volume final de 4,0 mL e a concentração de proteínas, determinada por espectrofotometria, foi 5,8 mg/mL.

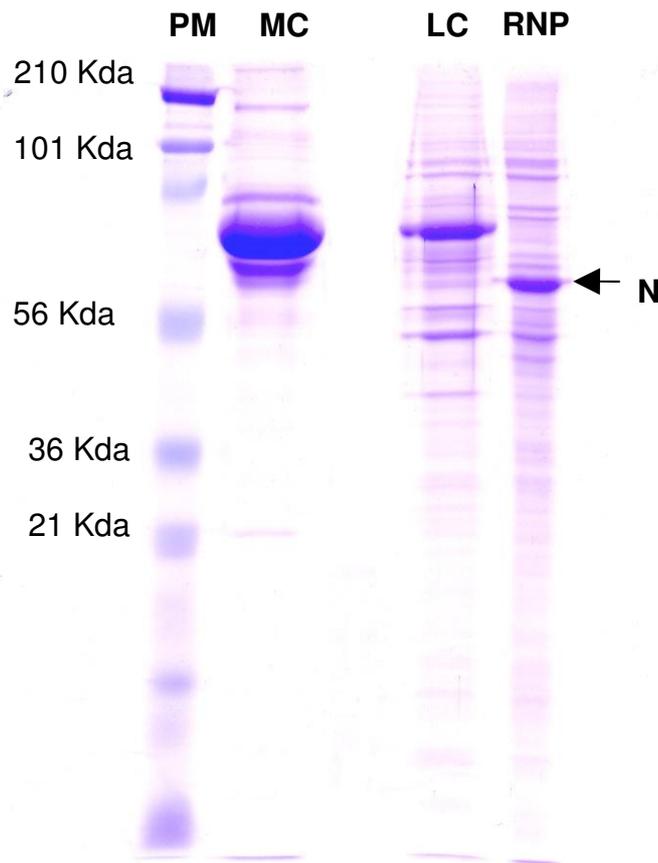
A tabela 2 demonstra os volumes obtidos antes e após a purificação e a concentração de proteínas determinada por espectrofotometria, nas diferentes metodologias de purificação.

**Tabela 2** – Volumes anteriores e posteriores a purificação e concentração de proteínas nas diferentes metodologias de purificação

Situações	Vírus da Raiva	RNPs
Volume anterior a purificação	8,0 mL	28,0 mL
Volume após a purificação	5,0 mL	4,0 mL
Concentração de proteínas após a purificação	4,0 mg/mL	5,8 mg/mL

### 4.2 Confirmação da presença de nucleoproteínas (N)

A presença das nucleoproteínas, após a purificação foi confirmada por eletroforese e está apresentada na figura 3.



**Figura 3:** Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-Page) – demonstrando: PM – peso molecular, MC – meio de cultura, LC – lisado celular, RNPs – ribonucleoproteínas e N – nucleoproteínas, após purificação em gradiente de Cloreto de Césio (CsCl)

#### 4.3 Soros hiperimunes de coelhos anti-vírus da raiva e anti-RNPs

O soro selecionado para a purificação de IgG dos coelhos imunizados com vírus da raiva – Grupo A, foi o que apresentou o maior título, 3.600 UI/ml pelo teste de soroneutralização em cultura celular, e do Grupo B, coelhos imunizados com RNPs, o que apresentou fluorescência intensa até a diluição do soro 1:2560, pela técnica de IFI.

#### 4.4 Precipitação e purificação das IgG

O volume obtido, após a precipitação das IgG anti-vírus da raiva e anti-RNPs, foi aproximadamente 60 mL e a dosagem de proteínas, após a purificação foi 25,3 mg/mL e 32.7 mg/mL, respectivamente.

#### 4.5 Lotes de conjugado anti-vírus da raiva e anti-RNPs

Os volumes dos lotes de conjugados “puros” anti-vírus da raiva e anti-RNPs, após a conjugação, foram 8,5 mL e 9,0 mL, respectivamente.

Os títulos obtidos para uso nas reações de IFD do lote de conjugado “puro”, L.IP. CA-VR/04 foi 1:200 e do lote L.IP. CA-RNPs/04 foi 1:400 e para uso nas reações de soroneutralização em cultura de células BHK-21 foram 1:250 e 1:500, respectivamente.

A partir da obtenção dos títulos dos lotes dos conjugados produzidos foi possível estabelecer uma estimativa do número de exames que podem ser realizados em comparação ao número de exames com conjugado comercial.

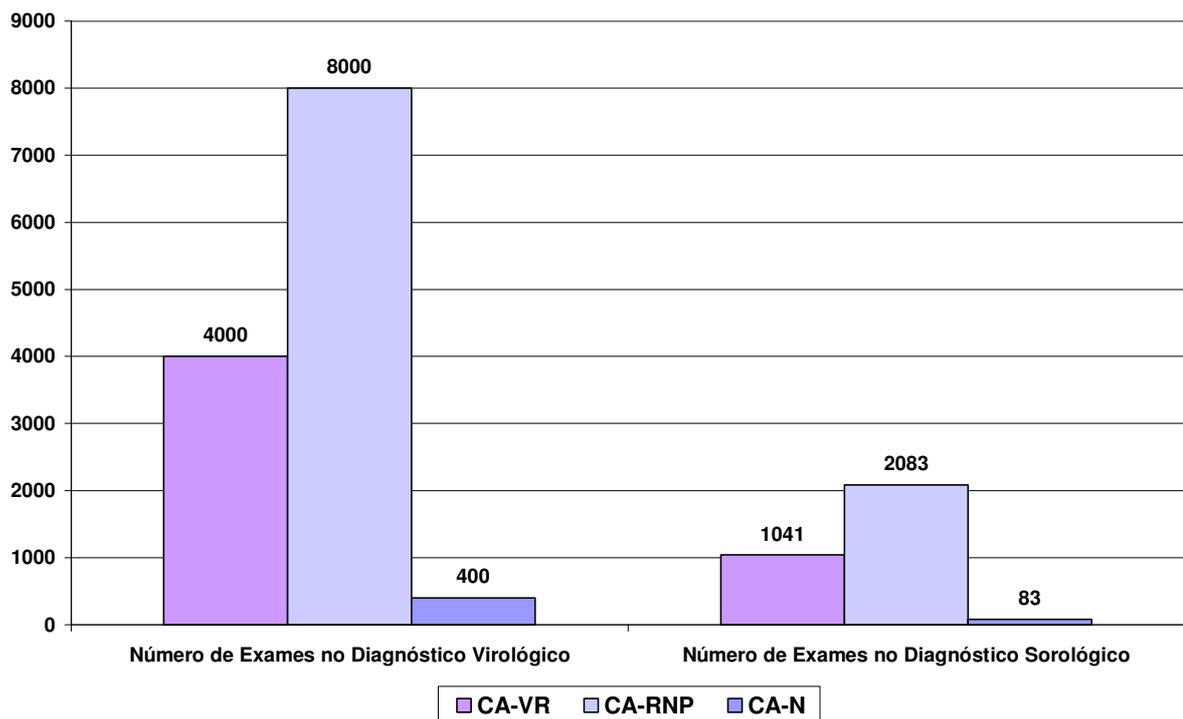
**Tabela 3** - Estimativa do rendimento dos conjugados produzidos e conjugado comercial

Conjugados	Diagnóstico virológico IFD			Diagnóstico sorológico IFD		
	Diluição/mL	Nº Exames/mL	Exames/Lote	Diluição/mL	Nº Exames/mL	Exames/Lote
CA-VR*	1:200	4000	33820	1:250	1041	8854
CA-RNPs**	1:400	8000	71820	1:500	2083	18750
CA-N***	1:20	400	-	1:20	83	-

\* Conjugado anti-vírus da raiva – volume total do lote: 8,5 mL

\*\* Conjugado anti-ribonucleoproteínas – volume total do lote: 9,0 mL

\*\*\* Conjugado anti-nucleocapsídeo (comercial)



**Figura 4:** Comparação do número de exames realizados com os conjugados produzidos e o conjugado comercial

#### 4.6 Testes de sensibilidade e especificidade diagnóstica relativos

Estão demonstrados na tabela 4 os resultados obtidos por IFD em amostras de tecido nervoso, nas diversas espécies analisadas com os diferentes conjugados e observa-se que todos os resultados positivos e negativos foram concordantes.

**Tabela 4-** Resultados de IFD em amostras de tecido nervoso, segundo a espécie animal e os diferentes conjugados anti-vírus da raiva empregados

Espécie	Conjugado anti-vírus da raiva <sup>A</sup>		Conjugado anti-RNPs <sup>B</sup>		Conjugado Comercial <sup>C</sup>		Total
	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo	
Bovina	9	30 <sup>D</sup>	9	30 <sup>D</sup>	9	30 <sup>D</sup>	39
Canina	9 <sup>E</sup>	8	9 <sup>E</sup>	8	9 <sup>E</sup>	8	17
Caprina	3	0	3	0	3	0	3
Humana	0	8 <sup>F</sup>	0	8 <sup>F</sup>	0	8 <sup>F</sup>	8
Felina (gato)	3	1	3	1	3	1	4
Eqüina	3	17 <sup>G</sup>	3	17 <sup>G</sup>	3	17 <sup>G</sup>	20
Símio	1	0	1	0	1	0	1
Muar	0	2	0	2	0	2	2
Ovina	0	5	0	5	0	5	5
Suína	1	0	1	0	1	0	1
<b>Total</b>	29	71	29	71	29	71	100

<sup>A</sup>Conjugado anti-vírus da raiva total, lote: Instituto Pasteur - 2004 (L.IP.CA-VR/04)

<sup>B</sup>Conjugado anti-RNPs, lote: Instituto Pasteur - 2004 (L.IP.CA-RNPs/04)

<sup>C</sup>Conjugado anti-nucleocapsídeo lote: 3A0041- 2004 (BIO-RAD), utilizado como padrão

<sup>D</sup>(3 amostras) <sup>E</sup>(2 amostras) <sup>F</sup>(3 amostras) - amostras que apresentavam grau avançado de putrefação

<sup>G</sup>(8 amostras) - amostras que apresentaram raros corpúsculos de Negri

Na tabela 5 são apresentados os valores referentes à sensibilidade e especificidade dos resultados positivos e negativos obtidos pelo teste de IFD para detecção do vírus da raiva com o uso dos conjugados produzidos anti-vírus da raiva e anti-RNPs e conjugado comercial.

**Tabela 5** – Valores referentes a sensibilidade e especificidade dos resultados positivos e negativos obtidos pelo teste de IFD

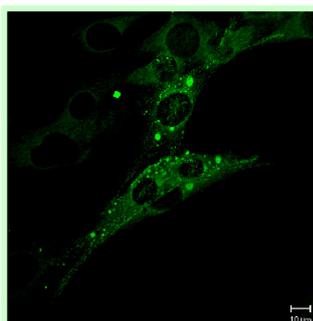
	Amostras Positivas	Amostras Negativas
<b>Teste IFD positivo</b>	71	0
<b>Teste IFD negativo</b>	0	29

Sensibilidade = 100%

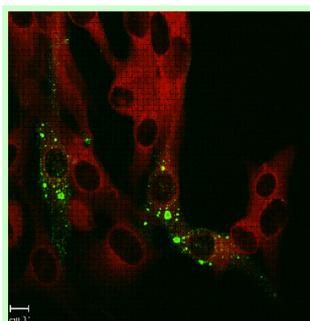
Especificidade = 100%

Essas amostras foram processadas nos exames de rotina do laboratório do Instituto Pasteur e todos os resultados foram concordantes com a leitura.

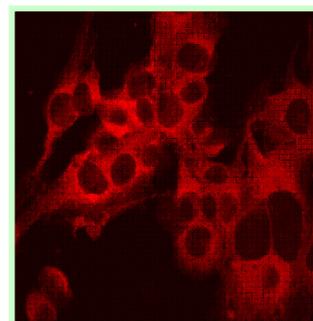
Nas figuras 5 a 13, estão demonstradas células BHK 21, as quais são utilizadas para avaliação de anticorpos neutralizantes anti-vírus da raiva por SFIMT, infectadas com a amostra de vírus fixo PV e controles negativos, reveladas por IFD, com os diferentes conjugados produzidos e comercial.



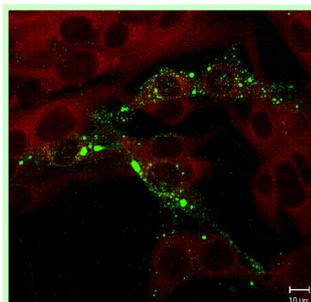
**FIGURA 5:** Células BHK-21 infectadas com vírus fixo PV-conjugado L.I.P. CA-VR/04



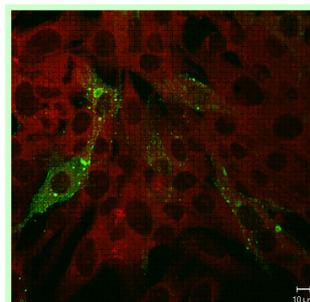
**FIGURA 6:** Células BHK-21 infectadas com vírus fixo PV-conjugado L.I.P. CA-VR/04



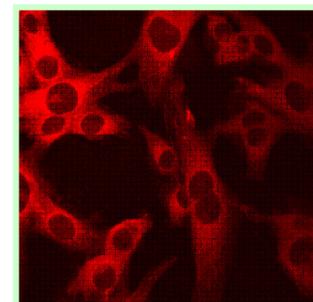
**FIGURA 7:** Células BHK-21- controle negativo conjugado L.I.P. CA-VR/04



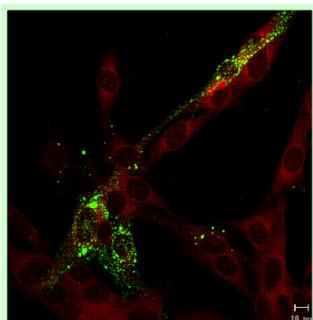
**FIGURA 8:** Células BHK-21 infectadas com vírus fixo PV-conjugado L.I.P. CA-RNPs/04



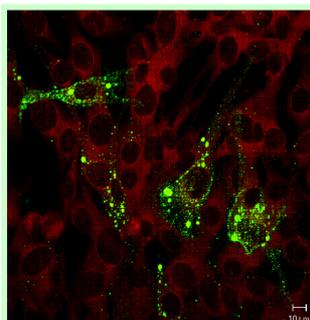
**FIGURA 9:** Células : BHK-21 infectadas com vírus fixo PV-conjugado L.I.P. CA-RNPs/04



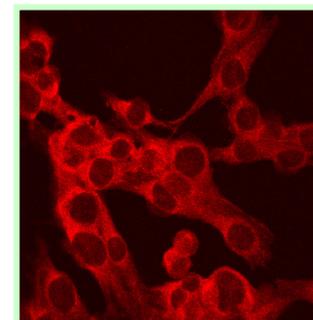
**FIGURA 10:** Células : BHK-21 - controle negativo conjugado L.I.P. CA-RNPs/04



**FIGURA 11:** Células BHK-21 infectadas com vírus fixo PV-conjugado CA-N

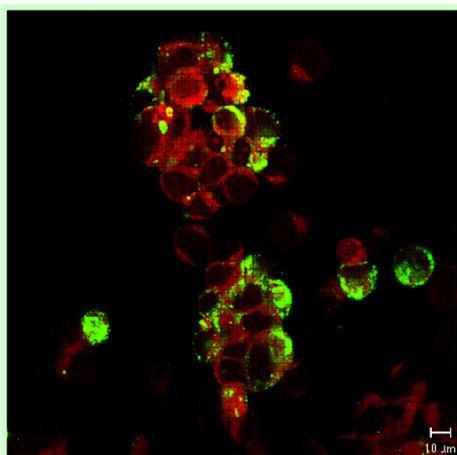


**FIGURA 12:** Células BHK-21 infectadas com vírus fixo PV-conjugado CA-N

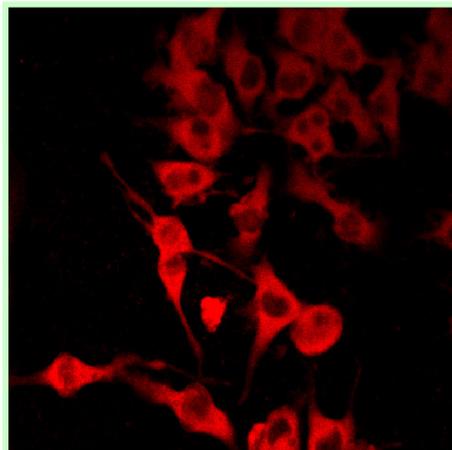


**FIGURA 13:** Células BHK-21- controle negativo conjugado L.I.P. CA-N

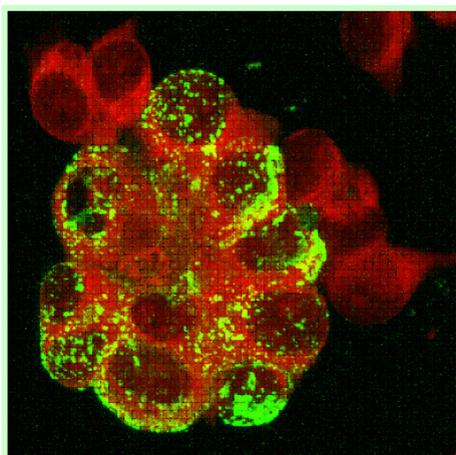
Nas figuras 14 a 19, estão demonstradas células N2A, as quais são utilizadas para o isolamento viral, infectadas com vírus fixo CVS e controles negativos, reveladas por IFD, com os diferentes conjugados produzidos e comercial.



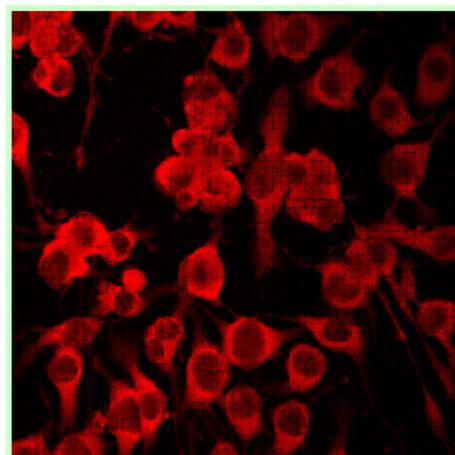
**FIGURA 14:** Células N2A infectadas com vírus fixo CVS- conjugado L.IP. CA-VR/04



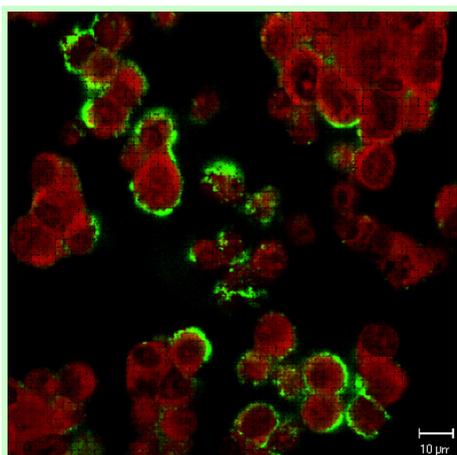
**FIGURA 15:** Células N2A – controle negativo conjugado L.IP. CA-VR/04



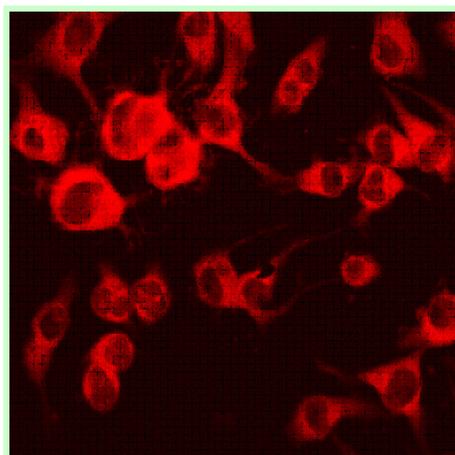
**FIGURA 16:** Células N2A infectadas com vírus fixo CVS - conjugado L.IP. CA-RNPs/04



**FIGURA 17:** Células N2A - controle negativo conjugado L.IP. CA-RNPs/04

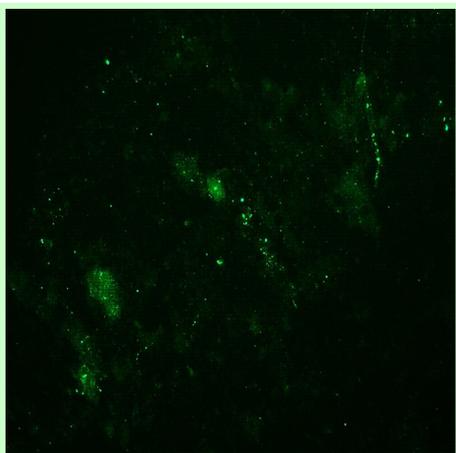


**FIGURA 18:** Células N2A infectadas com vírus fixo CVS- conjugado CA-N

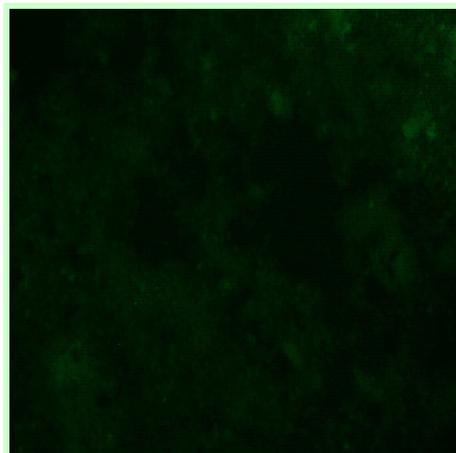


**FIGURA 19:** Células N2A - controle negativo conjugado CA-N

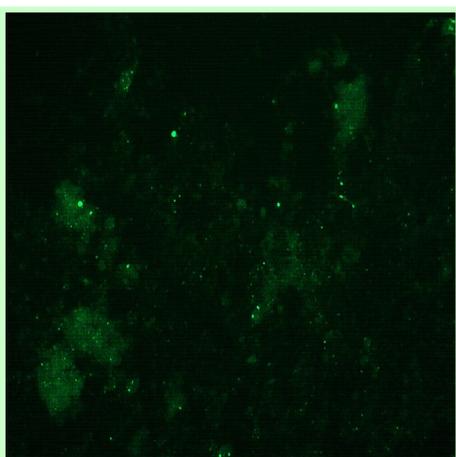
Nas figuras 20 a 37, estão demonstrados decalques de sistema nervoso central de cão, bovino e humano positivos para raiva e controles negativos, submetidos à IFD, com os diferentes conjugados produzidos e comercial.



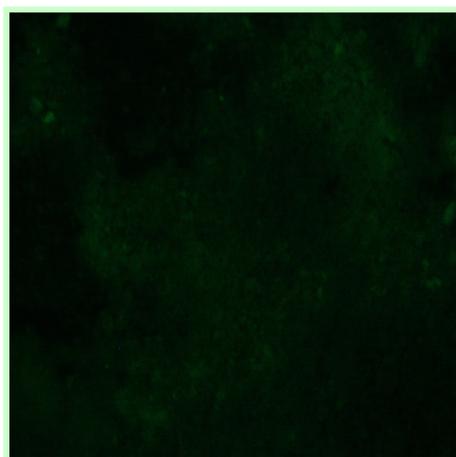
**FIGURA 20:** Decalque SNC positivo – cão conjugado L.IP. CA-RNPs/04



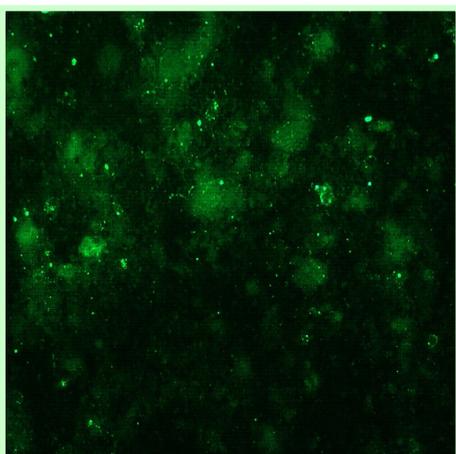
**FIGURA 21:** Decalque de SNC negativo – cão conjugado L.IP. RNPs/04



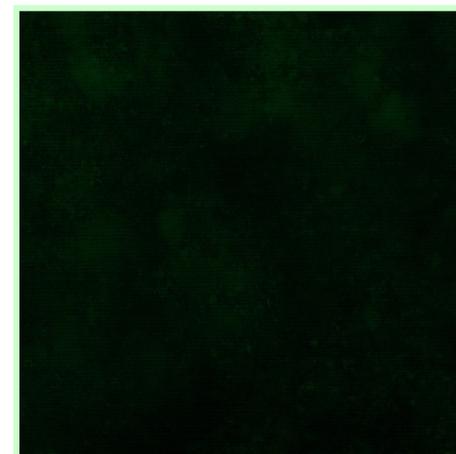
**FIGURA 22:** Decalque SNC positivo – cão conjugado L.IP. CA-VR/04



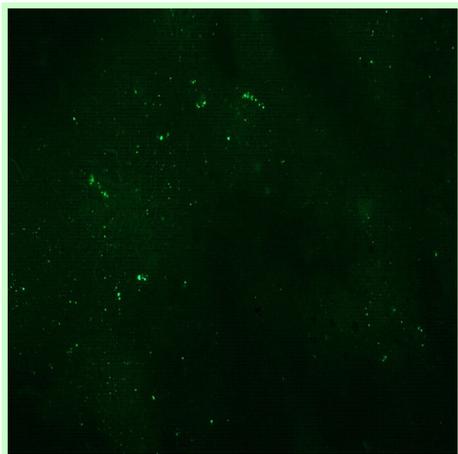
**FIGURA 23:** Decalque de SNC negativo – cão conjugado L.IP. CA-VR/04



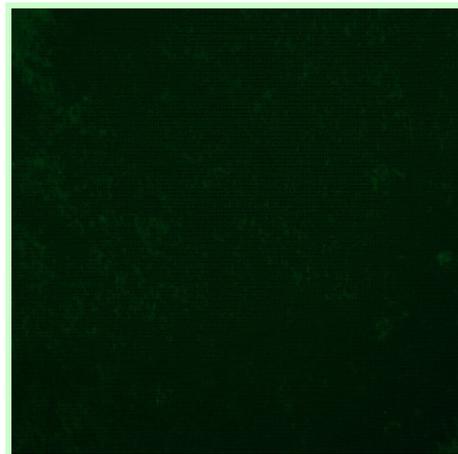
**FIGURA 24:** Decalque SNC positivo – cão conjugado.CA-N



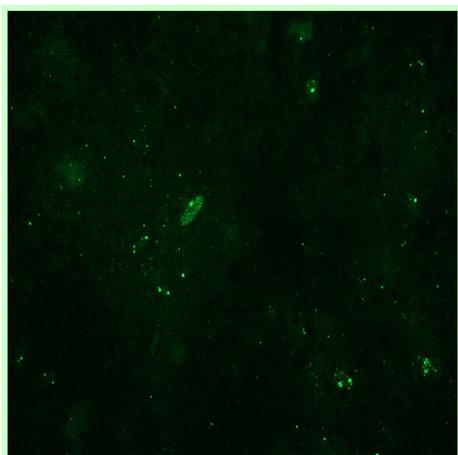
**FIGURA 25:** Decalque de SNC negativo - cão conjugado CA-N



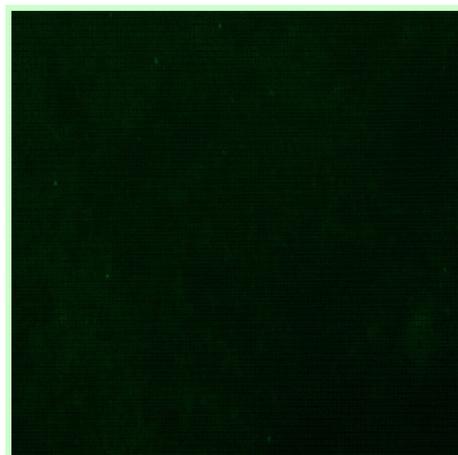
**FIGURA 26:** Decalque SNC positivo – bovine conjugado L.I.P. CA-RNPs/04



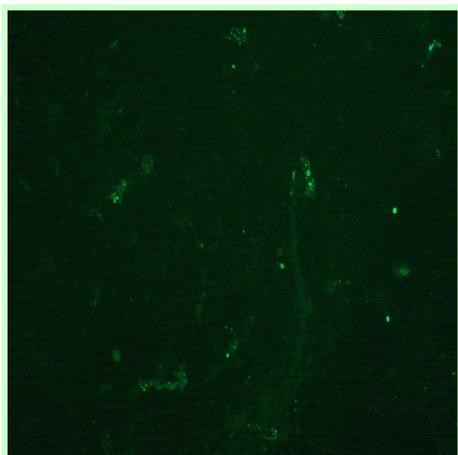
**FIGURA 27:** Decalque de SNC negativo – bovine conjugado L.I.P. CA-RNPs/04



**FIGURA 28:** Decalque SNC positivo - bovine conjugado L.I.P. CA-VR/04



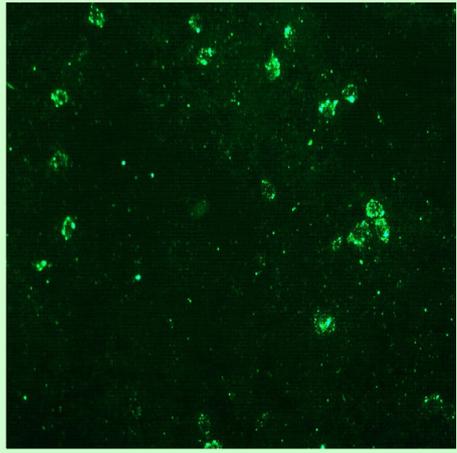
**FIGURA 29:** Decalque de SNC negativo – bovine conjugado L.I.P. CA-VR/04



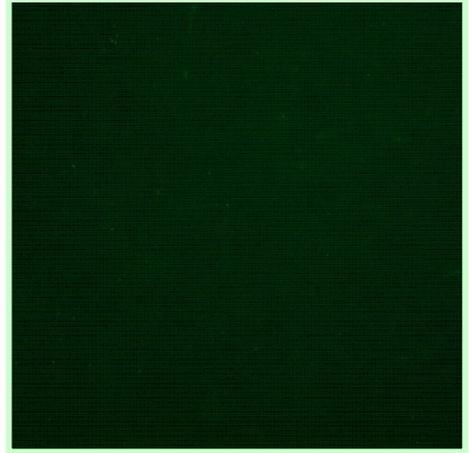
**FIGURA 30:** Decalque SNC positivo – bovine conjugado L.I.P. CA-N



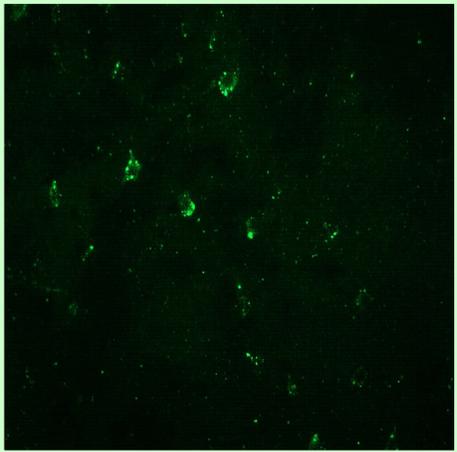
**FIGURA 31:** Decalque de SNC negativo – bovine conjugado L.I.P. CA-N



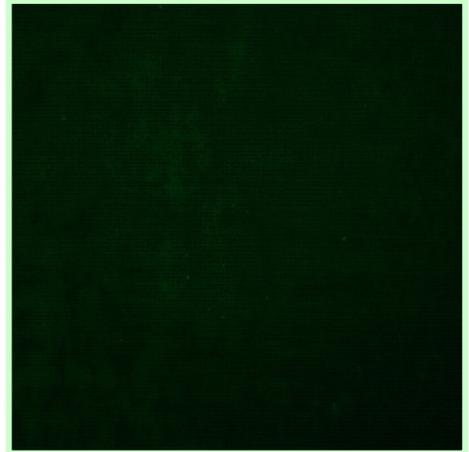
**FIGURA 32:** Decalque SNC positivo – humano conjugado L.I.P. CA-RNPs/04



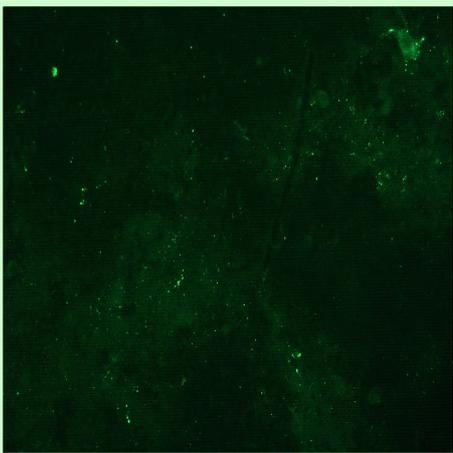
**FIGURA 33:** Decalque de SNC negativo – humano conjugado L.I.P. CA-RNPs/04



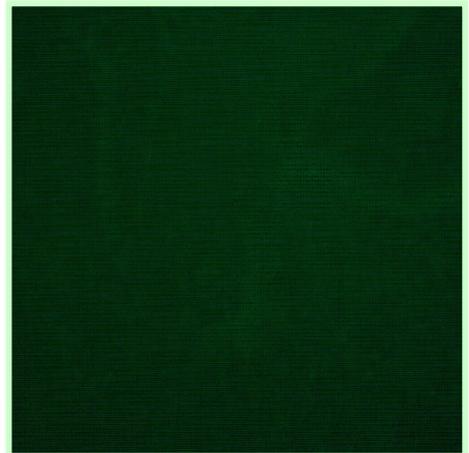
**FIGURA 34:** Decalque SNC positivo – humano conjugado L.I.P. CA-VR/04



**FIGURA 35:** Decalque de SNC negativo – humano conjugado L.I.P. CA-VR/04



**FIGURA 36:** Decalque SNC positivo – humano conjugado CA-N



**FIGURA 37:** Decalque de SNC negativo – humano conjugado CA-N

Em todas as figuras (20 a 37), observaram-se as características dos conjugados produzidos e comercial mostrando brilho intenso, corpúsculos de Negri bem definidos e controles negativos sem fluorescência.



## 5. DISCUSSÃO

Depois da introdução, em 1950, do teste direto de anticorpos fluorescentes (Coons, Creech e Jones, 1941), adaptado para a identificação de antígenos rábicos por Goldwasser e Kissling (1958), esse método tornou-se largamente aplicado para a detecção da infecção do vírus da raiva e é considerado o procedimento diagnóstico preferido em escala global. O teste de imunofluorescência é um procedimento sensível e específico usado na rotina do diagnóstico da raiva, tendo um papel crítico na tomada de decisão quanto ao direcionamento do tratamento ou não de pacientes e em saúde pública (Rudd *et al.*, 2005).

Esse teste é preciso e rápido, mas isto depende da sensibilidade e especificidade, em parte da afinidade, título e ótima ligação de fluorocromo aos anticorpos específicos contidos no conjugado. A padronização nacional de procedimentos e reagentes no diagnóstico da raiva é recomendada para a instituição de um sistema moderno de vigilância epidemiológica para doenças infecciosas baseado, fundamentalmente, na realização do método diagnóstico laboratorial empregado (Rudd *et al.*, 2005).

A produção de soro hiperimune para a obtenção de conjugados é um aspecto crítico para a qualidade de anticorpos fluorescentes. Entretanto, o desenvolvimento de níveis ótimos de anticorpos específicos depende do método de produção. A presença de antígenos não rábicos na suspensão de imunização pode ser evitada usando o vírus preparado em tecido homólogo ou usando o antígeno purificado (Trimarchi e Debbie, 1991). Sendo assim, neste estudo, para a obtenção de soros hiperimunes destinados à produção de conjugados fluorescentes, foram utilizados como suspensão de imunização, tanto partículas inteiras do vírus da raiva como ribonucleoproteínas purificadas.

Considerando-se as metodologias empregadas neste estudo para a produção de suspensão de vírus da raiva e de ribonucleoproteínas, para posterior purificação, pode-se avaliar que a eficiência de ambos protocolos utilizados para a replicação viral produziram concentrações elevadas tanto das partículas inteiras como das proteínas virais, o que foi de fundamental importância para o sucesso de todas as etapas posteriores até a obtenção dos conjugados.

O grau de purificação obtido no extrato de partículas inteiras do vírus da raiva foi considerado bastante satisfatório, podendo ser evidenciado pela visualização da banda formada no gradiente de sacarose, concentração de proteínas de 4,0 mg/mL em 5,0 mL e posteriormente pelos altos títulos de anticorpos neutralizantes presentes nos soros dos coelhos do grupo A, como ocorreu com o soro escolhido de 3.600 UI/mL.

A purificação de ribonucleoproteínas foi evidenciada pela visualização de banda formada no gradiente de cloreto de cério, por concentração de proteínas de 5,8 mg/mL em 4,0 mL e pelos altos títulos de anticorpos específicos presentes nos soros dos coelhos do grupo B, tal como o título do soro escolhido de 1:2560. Esses resultados foram confirmados por meio de eletroforese como está demonstrado na figura 3, onde aparece, no extrato purificado, uma nítida banda correspondente ao peso molecular de aproximadamente 57 kDa, o que indica a presença das nucleoproteínas. Embora apareçam bandas correspondentes às proteínas do lisado celular, isso não interferiu na obtenção de soro hiperimune específico anti-RNPs dos coelhos do grupo B.

Conseqüentemente o soro escolhido, com título de 1:2560 no teste de IFI, possibilitou a obtenção do lote de conjugado anti-RNPs também com alto título. Desta maneira a possível concentração de anticorpos inespecíficos provenientes de

proteínas não virais contidas no extrato purificado não interferiu na especificidade do conjugado, quando testado nas reações de IFD.

A alta concentração de proteínas nos extratos purificados permitiu um fracionamento em aproximadamente 100 doses de 200 µg de proteína/dose, tanto de partículas inteiras de vírus da raiva como de ribonucleoproteínas. Assim o rendimento foi superior ao necessário, em relação ao número de doses a serem utilizadas nos esquemas de imunização propostos para obtenção de soros hiperimunes de ambos os grupos de animais.

O processo de purificação pelo método de cromatografia de troca iônica (QAE-Sephadex A50), dos anticorpos específicos presentes nos soros hiperimunes escolhidos para a produção dos conjugados anti-vírus da raiva e anti-RNPs, resultou na obtenção de soluções contendo 25,3 mg/mL e 32,7 mg/mL de IgG, respectivamente. Tais concentrações foram consideradas adequadas, uma vez que a concentração de IgG recomendada para realização do método de conjugação de anticorpos ao fluorocromo ITCF, é de 20 mg/mL (Perrin, 1996).

A eficiência obtida neste estudo, com a utilização desse método de purificação de anticorpos, foi concordante com os resultados apresentados por Atanasiu *et al.* em 1974, quando foi comparado a este o método de fracionamento do soro por precipitação com sulfato de amônio e as concentrações de IgG foram muito maiores nas soluções purificadas por cromatografia com QAE-Sephadex A50.

Os títulos dos conjugados anti-vírus da raiva de 1: 200 e 1:250 e anti-RNPs de 1:400 e 1:500, obtidos na IFD e no SFIMT respectivamente, foram bastante elevados quando comparados com o título do conjugado comercial de 1:20, considerado padrão ouro neste estudo, podendo o conjugado anti-vírus da raiva ser

diluído, aproximadamente, dez vezes mais e o anti-RNPs, aproximadamente, 20 vezes mais do que o comercial.

Na tabela 3 foi apresentada a estimativa de rendimento dos conjugados produzidos e do comercial, demonstrando a possibilidade de realização de um número muito maior de exames por mL, obedecendo a proporção relativa aos títulos de uso. Analisando-se os volumes totais dos lotes de CA-VR e CA-RNPs, pode-se afirmar que poderiam ser realizados com esses volumes o número de exames pelo teste de IFD correspondente a três e sete vezes, respectivamente, o total de amostras processadas pelo Instituto Pasteur no ano de 2004. Ainda, com relação ao número de exames que poderiam ser realizados para avaliação de anticorpos neutralizantes por SFIMT, esses volumes corresponderiam, com o uso do CA-VR, à realização de metade do número de amostras processadas pelo Instituto Pasteur em 2004 e o total das amostras do mesmo ano com o CA-RNPs.

Esses títulos determinados para os dois lotes de conjugados foram definidos em microscópio de fluorescência com lâmpada de mercúrio HBO-50. Existem diferentes intensidades de fonte de luz dessas lâmpadas tais como: HBO-100, HBO-200, como também lâmpadas de halogênio com menor intensidade. Assim dependendo das diferentes características do microscópio de fluorescência e intensidade da fonte de luz das lâmpadas utilizadas, haverá sempre a necessidade de titulação para cada novo lote nos laboratórios que realizam o diagnóstico da raiva.

Os títulos de conjugados fluorescentes podem ser maiores ou menores dependendo das características do microscópios e da intensidade de fonte de luz da lâmpada utilizada, conforme demonstraram os resultados obtidos por Larghi, Oliva-Pinheiro e Gonzales-Luarca, em 1986. Num estudo de avaliação de um lote de

conjugado anti-rábico, em 5 laboratórios, utilizando diferentes microscópios de fluorescência de três marcas distintas, os títulos variaram de 1:4 a 1:64 dependendo dos acessórios utilizados de cada microscópio. Estes resultados demonstraram a necessidade de titular cada lote de conjugado em cada laboratório que realiza o teste de imunofluorescência.

Na tabela 4 foram demonstrados os resultados dos testes de IFD realizados com 100 amostras de SNC de diferentes espécies, positivos e negativos para a raiva. O cálculo da sensibilidade e especificidade diagnóstica relativas dos conjugados produzidos anti-vírus da raiva (L. IP CA-VR) e anti-RNPs (L. IP CA-RNP) foi de 100% para resultados positivos e negativos. Segundo Soares *et al.* (2002) e Albas *et al.* (1999) a eficácia da técnica de IFD pode ser comprometida pela perda da sensibilidade quando amostras em decomposição são analisadas, o que não ocorreu neste estudo, com o uso dos dois conjugados produzidos comparados ao comercial, mesmo naquelas amostras que apresentaram raros corpúsculos de Negri ou grau avançado de decomposição.

A concordância de 100% nos resultados obtidos na IFD entre os três conjugados demonstrou a possibilidade de utilização de ambos os métodos de purificação de partículas inteiras do vírus da raiva e das ribonucleoproteínas para obtenção de soro hiperimune, como também a eficiência de todas as etapas no processo de produção dos conjugados.

Os resultados obtidos, em relação à especificidade e sensibilidade, com o uso do CA-RNPs foram concordantes com estudos que afirmam que os conjugados produzidos a partir de soros hiperimunes, obtidos pela imunização de animais com as ribonucleoproteínas purificadas são considerados altamente específicos, por reconhecerem essas proteínas em inclusões intracitoplasmáticas em células

infectadas pelo vírus da raiva, possibilitando a realização do diagnóstico laboratorial da doença (Flamand, Wiktor e Koprowski, 1980). Além disso, a nucleoproteína é a mais conservada geneticamente (Tordo e Kouknetzoff, 1993; Wunner, 2002).

Atualmente há 7 genótipos dos lissavírus reconhecidos mundialmente e apesar do grande número de pesquisas realizadas nas Américas apenas o genótipo 1, representadas pelas amostras de vírus fixo ou vacinais e amostras selvagens, foi descrito. As variantes antigênicas (AgV) do genótipo 1 circulantes no Brasil são, em sua maioria, tipificadas antigenicamente como pertencentes as variantes AgV2 (cão), AgV3 (morcegos hematófagos) e AgV4 (*Tadarida brasiliensis* – morcegos insetívoros) (Favoretto, 2002).

Dentre os 7 genótipos a glicoproteína apresenta grande variabilidade antigênica e estudos com esta proteína mostraram identidade de aminoácidos de 84.3 a 98.4%, entre as amostras do genótipo 1 (Kuzmin *et. al.*; 2003). Porém, a variabilidade da glicoproteína no genótipo 1 é a menor quando comparada aos demais genótipos.

A grande variabilidade na seqüência de aminoácidos da glicoproteína poderia restringir a especificidade dos conjugados, produzidos com soros hiperimunes de animais imunizados com partículas inteiras do vírus da raiva purificadas, isto não ocorreu quando foi usado o CA-VR nos testes de IFD das 100 amostras, para a avaliação de especificidade e sensibilidade, nos quais todas as amostras das variantes AgV2 e AVg3 foram positivas.

Além disso, considerando que a amostra de vírus fixo PV foi utilizada para purificação de vírus da raiva partículas inteiras e que as variantes circulantes no Brasil, até o momento estudadas pertencem ao genótipo 1 (Favoretto *et al.*, 2002), podemos confirmar, pelos resultados de especificidade e sensibilidade que

obtivemos por meio das reações de IFD das 100 amostras e das figuras de 5 a 37, que o conjugado CA-VR teve neste estudo a mesma acurácia encontrada no conjugado anti-RNPs.

Segundo Larghi (1971) os critérios a serem analisados para a avaliação da qualidade dos conjugados são: intensidade específica de fluorescência, quantidade de inclusões (corpúsculos de Negri) observadas e ausência de fluorescência nos controles negativos.

Essa qualidade pôde ser observada pela comparação das figuras 5 a 19 que mostram células BHK-21 e N2A, infectadas com a amostra PV, assim como as figuras 20 a 37 com decalques de amostras de SNC de animais positivos para a raiva e seus respectivos controles negativos. Podendo ser observados corpúsculos de Negri bem definidos, brilho intenso e controles negativos com ausência de fluorescência, demonstrando não haver diferenças quanto aos critérios citados acima, entre os conjugados produzidos e o comercial.

A bibliografia pertinente à produção de conjugados com as diferentes metodologias empregadas neste estudo é escassa. Lopes e Fernandez, 1997, realizaram a produção do primeiro lote de conjugado de origem caprina no Peru, o esquema de imunização foi feito a partir de vacina produzida com células VERO e amostra de vírus PV. A avaliação do reagente produzido em comparação ao comercial foi realizada pelo sistema de cruzes, atribuindo-se intensidade de fluorescência específica de 4+, quantidade de inclusões de 3+ e fluorescência inespecífica 1+ ao conjugado produzido e de 3+, 4+ e 0, para o conjugado comercial, na mesma ordem.

Atualmente há no Brasil 33 laboratórios credenciados para a realização do diagnóstico da raiva em sistema nervoso central de animais suspeitos de infecção

pelo vírus da raiva ou para controle de vigilância epidemiológica, pelo teste de imunofluorescência direta. No período de 2001 a 2004 segundo dados do Ministério da Saúde (2005), foram processados em média 32.000 diagnósticos/ano no Brasil, dos quais aproximadamente 10.000 no Instituto Pasteur de São Paulo.

A avaliação do título de anticorpos neutralizantes de soros de indivíduos vacinados contra o vírus da raiva em esquemas pré ou pós-exposição é feita pela microtécnica simplificada de inibição de focos fluorescentes (SFIMT) em cultura celular, sendo esta técnica realizada somente no Instituto Pasteur de São Paulo, com aproximadamente 18.000 sorologias/ano.

O conjugado comercial anti-nucleocapsídeo importado, o qual foi referido como padrão nesse estudo representa elevado custo para o diagnóstico laboratorial da raiva, aproximadamente € 824,60 – frasco com 0,5 mL e diluição 1:20, o que representa atualmente em reais R\$ 2.242,12 (além desse valor são acrescentados frete, encargos de alfândega e importação, o que somaria atualmente R\$ 1.025,00).

Considerando o valor em Euro (€) do conjugado anti-nucleocapsídeo e a estimativa dos números de exames que poderiam ser realizados, como demonstrado na tabela 3, pode-se calcular o volume necessário em mL e custo para os mesmos números de exames se o conjugado comercial fosse utilizado.

Seria possível realizar 33820 exames no diagnóstico virológico com o volume total do lote CA-VR (volume: 8,5 mL - título 1:200), para esse mesmo número, com o conjugado comercial seriam necessários 84 mL e gastos R\$ 376.808,88 e no diagnóstico sorológico (título 1:250), para 8854 exames seriam necessários 106 mL, com gasto de R\$ 475.496,92.

Utilizando o conjugado do lote CA-RNP (volume: 9,0 mL – título: 1/400) para realizar 71820 no diagnóstico virilógico, seriam necessários 179 mL com gasto de

R\$ 802.961,78 do conjugado comercial e no diagnóstico sorológico (título 1:500), para 18750 exames seriam utilizados 225 mL e gasto de 1.009.309,50.

Esse teste é preciso e rápido, mas isto depende da sensibilidade e especificidade, em parte da afinidade, título e ótima ligação de fluorocromo aos anticorpos específicos contidos no conjugado. A padronização nacional de procedimentos e reagentes no diagnóstico da raiva é recomendada para a instituição de um sistema moderno de vigilância epidemiológica para doenças infecciosas baseado, fundamentalmente, na realização do método diagnóstico laboratorial empregado (Rudd *et al.*, 2005).

A produção de soro hiperimune para a obtenção de conjugados é um aspecto crítico para a qualidade de anticorpos fluorescentes. Entretanto, o desenvolvimento de níveis ótimos de anticorpos específicos depende do método de produção. A presença de antígenos não rábicos na suspensão de imunização pode ser evitada usando o vírus preparado em tecido homólogo ou usando o antígeno purificado (Trimarchi e Debbie, 1991). Assim a produção de conjugados fluorescentes seguindo-se os critérios de qualidade, especificidade e sensibilidade permitirá o fornecimento deste reagente, para a padronização do uso no diagnóstico laboratorial da raiva, implementando a vigilância epidemiológica e pesquisa dessa doença no Brasil.



## 6. CONCLUSÕES

- Os métodos de purificação utilizados foram satisfatórios quanto a concentração do vírus da raiva partículas inteiras e RNPs, o que possibilitou a obtenção de soros hiperimunes com altos títulos de anticorpos específicos.
- Quanto a especificidade e sensibilidade, tanto o conjugado anti-vírus da raiva como anti-RNPs, apresentaram a qualidade requerida para o uso deste reagente de maneira segura e eficaz no teste de IFD.
- Considerando os resultados obtidos neste estudo e a alta demanda da rede nacional de laboratórios credenciados para realizar o diagnóstico da raiva, a implementação de metodologias para produção de conjugados anti-vírus da raiva ou anti-RNPs em grande escala possibilitaria a padronização do uso deste reagente nesses laboratórios, permitindo melhor vigilância epidemiológica da doença e a intensificação da pesquisa científica para avanço do estudo da raiva no Brasil.



## REFERÊNCIAS <sup>1</sup>

- Albas A, Ferrari CIL, Da Silva LHQ, Bernardi F, Ito FH. Influence of canine brain decomposition on laboratory diagnosis of rabies. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 1999; 32(1):9-22.
- Arai YT, Kuzmin IV, Kameoka Y, Botvinkin AD. New Lyssavirus genotype from the lesser mouse-eared bat (*Myotis blythi*), Kyrgyzstan. *Emerg Infect Dis*. 2003; 9:333-37.
- Atanasiu P, Tsiang H, Virat J. Obtention D'IgG anti-nucléocapsides rabiques. Purification et conjugaison a la peroxydase ou a l'isothiocyanate de fluorescéine. *Ann. Microbiol*. 1974; 125 B: 85-98.
- Banerjee AK. Transcription and replication of rhabdoviridae. *Microbiol Rev*. 1987;51:66-7.
- Bollog DM, Edelstein SJ. *Protein Methods*. 1<sup>a</sup> ed. Wiley-Liss inc. 1991. p.230.
- Botvinkin AD, Poleschuk EM, Kuzimin IV, Borisova TI, Gazaryan SV, Ya P et al. Novel lyssaviruses isolated from bats in Russia. *Emerg Infect Dis*. 2003; 9:1623-5.
- Bourhy H. Diversité du genre Lyssavirus: Consequences diagnostiques, épidémiologiques et vaccinales. Paris; 1992 [Docteur de L'Université – Université Pierre et Marie Curie].
- Bourhy H, Sureau P, Tordo N. From rabies to rabies related viruses. *Vet. Microbiol*. 1990; 23:115-28.
- Clark HF. Rabies viruses increase in virulence when propagated in neuroblastoma cell culture. *Science*. 1978; 199:1072-75.
- Compans R, Choppin P. The length of the helical nucleocapsid of Newcastle disease virus. *Virologica*. 1967; 33:344-346.
- Coons AH, Creech HJ, Jones RN; Berliner E. The demonstration of pneumococcal antigen in tissues by the use fluorescent antibody. *J. Immunol*. 1942; 45:159-170.
- Coons AH, Creech HJ, Jones RN. Immunological properties of an antibody containing fluorescent group. *Proc. Soc. Exp. Biol. New York*. 1941; 47:200-202.
- Cox JHI, Dietzschold B, Schneider LG. Rabies virus glycoprotein II. Biological and serological characterization. *Infect Immune*. 1977; 16:754-9.
- Dean DJ, Ableseth MK, Atanasiu P. The fluorescent antibody test. In: Meslin F-X; Kaplan MM, Koprowski H. *Laboratory techniques in rabies*. 4th ed: World Health Organization. Geneva. 1996. p.88-95.

---

<sup>1</sup> Conforme as diretrizes para apresentação de dissertações e teses do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo. 2. ed. São Paulo: 2004, 90 p.

Dean DJ, Abelseth MK. The fluorescent antibody test. In: Kaplan MM, Koprowski H. eds. Laboratory techniques in rabies, 3rd ed: World Health Organization. Geneva. 1973. p.73-84. (WHO Monograph Series, nº 23)

Delagneau JF, Perrin P, Atanasiu P. Structure of rabies virus: Spatial relationships of the proteins G, M1, M2 and N. *Ann L'Institut Pasteur: Virol.* 1981;132E:473-493.

Diaz AM, Arispe E, Brunel C, Cavandoli C, Dellepiane N, Miranda A. La tecnica de contraimunoelctroforesis para la determinación de anticuerpos antirrabicos. *Bol Ofic Sanit Panamer.* 1986; 101:255-61.

Dietzschold B. Techniques for the purification of rabies virus, its subunits and recombinant products. In: Meslin F.-X., Kaplan M.M., Koprowski H., eds. Laboratory techniques in rabies. 4th ed: World Health Organization. Geneva. 1996. p.175-180.

Favoretto SR, Carrieri ML, Cunha EMS, Aguiar EAC, Silva LHQ, Sodré MM, Souza CAM, Kotait I. Antigenic typing of brazilian rabies virus samples isolated from animals and humans, 1989 – 2000. *Rev. Inst. Méd. Trop. São Paulo.* 2002; 44(2):91–95.

Favoretto SR, Carrieri ML, Tino MS, Zanetti CR, Pereira OAC. Simplified fluorescence inhibition microtest for titration of rabies neutralizing antibodies. *Rev Inst Med trop. São Paulo.* 1993; 35:171-5.

Filho NA, Rouquayrol MZ. Introdução à epidemiologia. 3ed. MEDSI. 2002; p.293.

Flamand A, Wiktor TJ, Koprowski H. Use of monoclonal antibodies in the detection of antigenic differences between rabies and rabies-related virus proteins. I. The nucleocapsid protein. *J. Gen. Virol.* 1980: 48–97.

Gaudin Y, Ruigrok RWH, Tuffereau C, Knossow M, Flamand A. Rabies virus glycoprotein is a trimer. *Virology.* 1992; 84:441-4.

Goldwasser RA, Kissling RE. Fluorescent antibody staining of street and fixed rabies virus antigens. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1958; 98:219-23.

Heidelberger M, Kendall FE, Soo Hoo CM. Quantitative studies on the precipitin reaction. *J exp Med.* 1933; 58:137-152.

Ito Y, Nishizono A, Mannen K, Hiramatsu K, Mifune K. Rabies virus M protein expressed in *Escherichia coli* and its regulatory role in virion-associated transcriptase activity. *Arch Virol.* 1996; 141:671-83.

Joustra M, Lundgren H. Preparation of freeze-dried, monomeric and immunochemically pure IgG by a rapid and reproducible chromatographic technique. In: Peeters H. *Protides of the biological fluids. (Proceedings of the 17th colloquium.)* Bruges, arrtchap, 1969: p.511-515.

Kaplan G, Turner GS, Warrel D. Rabies: The facts. 2th ed. Kaplan G. ed. Oxford Medical Publications, 1986. p.8-74.

King AA. Cell culture of rabies virus. In: Meslin F-X; Kaplan MM, Koprowski H. Laboratory techniques in rabies. 4th ed: World Health Organization. Geneva, 1996. p.114-130.

Kohler G, Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*. 1975; 256:495-497.

Kornfeld R, Kornfeld S. Assembly of asparagine-linked oligosaccharides. *Annu Rev Biochem*. 1985; 54:631-64.

Kuzmin IV, Orciari LA, Arai YT, Smith JS, Hanlon CA, Kameoka Y, et al. Bat lyssaviruses (Aravan and Khujand) from Central Asia: phylogenetic relationships according to N, P and G gene sequences. *Virus Res*. 2003; 97:65-79.

Lafon M, Wiktor TJ. Antigenic sites on the ERA rabies virus nucleoprotein and non-structural protein. *J Gen Virol*. 1985; 66:2125-33.

Larghi OP, Oliva-Pinheiro O, Gonzalez-Luarca E. Evaluation of an antirabies conjugate by a titration using various fluorescent microscopes. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*. 1986; 28(1):2 – 5.

Larghi OP. Prueba de anticuerpos fluorescentes para rabia. Organización Panamericana de la Salud, Oficina Sanitaria Panamericana – Oficina Regional de la Organización Mundial de la Salud. 1971; 8:1-23.

Lentz TL, Wilson PT, Hawrot E, Speicher DW. Amino acid sequence similarity between rabies virus glycoprotein and snake venom curaremimetic neurotoxins. *Science*. 1984; 226:847-8.

Lentz TL., Burrage TG, Smith AL, Crick J, Tignor GH. Is the acetylcholine receptor a rabies virus receptor? *Science*. 1982; 215:182-4.

Lépine P, Atanasiu P. Histopathological diagnosis. In: Meslin F-X, Kaplan MM, Koprowski H. Laboratory techniques in rabies. 4th ed: World Health Organization. Geneva, 1996. p.66-79.

Lopez IR, Fernandez VR. Produccion del primer lote de conjugado antirrabico de origen caprino en el Peru. *Ver. Méd. Exp. INS*. 1997; XIV(I):43 – 44.

McQueen JL, Lewis AL, Schneider NJ. Rabies diagnosis by fluorescent antibody. I. Its evaluation in a public health laboratory. *Amer J publ Hlth*. 1962; 50:1743-1752.

Matsumoto S. Electron microscopy of nerve cells infected with street rabies virus. *Virology* 1962; 17:198-202.

Mayo MA, Pringle CR. *Virus Taxonomy*. American Press, 1998.

Meslin F -X, Kaplan MM. An overview of laboratory techniques in the diagnosis and prevention of rabies and in rabies research. In: Meslin F-X; Kaplan MM, Koprowski H. Laboratory techniques in rabies. 4th ed: World Health Organization, Geneva. 1996. p.9-27.

Ministério da Saúde – Central Geral de Laboratórios (CGlab) – Brasília, 2004.

Murphy FA. Morphology and morphogenesis. In: Baer GM. The Natural History of Rabies. 2nd ed. Boca Raton: CRC Press; 1991. p.33-61.

Perl DP, Good PF. The pathology of rabies in the central nervous system In:Baer GM. The Natural History of Rabies. 2nd ed.Boca Raton: CRC Press; 1991 .p.164-188.

Perrin P. Techniques for the preparation of rabies conjugates. In: Meslin F.-X., Kaplan M.M., Koprowski H., eds. Laboratory techniques in rabies. 4th ed. Geneva: World Health Organization, 1996. p.433-442.

Perrin P, Lafon M, Versmisse P. Application d'une méthode immunoenzymatique au titrage des anticorps rabiques neutralisants en culture cellulaire. J Biol Standard 1985; 13:35-42.

Pieri KMS. Caracterização de amostras de vírus da raiva isoladas no Estado de Santa Catarina através de anticorpos monoclonais e PCR de baixa estringência. Santa Catarina; 2003. [Dissertação de Mestrado em Biotecnologia - Universidade Federal de Santa Catarina]

Piza ASS; Chaves LB; Zanetti CR. An ELISA suitable for detection of rabies virus antibodies in serum samples from human vaccinated with either cell culture vaccine or suckling mouse brain vaccine. Rev. Med. Trop. 1999;41:39–43.

Plotkin SA. Rabies. Clin. Infect. Dis. 2000; 30:4–12.

Rotivel Y, Goldal M, Perrin P, Tordo N. Une histoire de la vaccination contre la rage. Virologie. 2002; 6:89–104.

Rudd RJ, Smith JS, Yager PA, Orciari LA Trimarchi CV. A need for standardized rabies-virus diagnostic procedures: Effect of cover-glass mountant on the reliability of antigen detection by the fluorescent antibody test. Virus Research. 2005; 111:83-88.

Rupprecht CE, Gibbons RV. Prophylaxis against rabies. N Engl J Med. 2004; 351:2626-35.

Rupprecht CE, Hanlon CA, Hemachudha T. Rabies re-examined. Lancet Infect Dis. 2002; 2:327-43.

Schneider LG. Antigenic variants of rabies virus. Comp Immun Microbiol Infect Dis 1982; 5:101-7.

Schneider LG, Dietzschold B, Dierks RE, Matthaeus W, Enzmann PJ, Strohmaier, K. Rabies group-specific ribonucleoprotein antigen and a test system for grouping and typing of rhabdoviruses. J. Virol. 1973; 11:748-55.

Shakin-Eshelman SH, Remaley AT, Eshelman JR, Wunner WH, Spitalnik SL. N-linked glycosylation of rabies virus glycoprotein: Individual sequences differ in their efficiencies and influence on cell surface expression. J Biol Chem. 1992; 267:10690-8.

Smith J, Yager PA, Baer GM. A rapid reproducible test for determining rabies neutralizing antibody. *Bull World Health Organization*. 1973; 48:535-41.

Soares RM, Bernardi F, Sakamoto SM, Heinemann MB, Cortez A, Alves LM, Meyer AD, Ito FH, Richtzhein LJA. Heminested polymerase chain reaction for detection of brasilian rabies isolates from vampires bats and herbivores. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*. 2002; 97(1):109–111.

Sokol F, Stancek D, Koprowski H. Structural proteins of rabies virus. *J Virol*. 1973; 7:241-9.

Surpeti F, Derer M, Tsiang H. Mechanism of rabies virus entry into CER cells. *J Gen*. 1984; 65:781- 9.

Thomas JB, Sikes RK, Ricke AS. Evaluation of indirect fluorescent antibody technique for detection of rabies antibody in human sera. *J Immunol*. 1963; 91:721-3.

Tierkel ES, Atanasiu P. Rapid microscopic examination for Negri bodies and preparation of specimens for biological tests. In: Meslin F-X; Kaplan MM, Koprowski H. *Laboratory techniques in rabies*. 4th ed: World Health Organization. Geneva, 1996; p.55-65.

Trimarchi CV, Smith JS. Diagnostic Evaluation. In: Jackson AC, Wunner WH (eds). *Rabies*. Ed. Academic Press. 2002. p.308-349.

Trimarchi CV. Rabies In *Clinical Virology Manual*. Specter R. Hodinka and S. Young (eds). ASM Press. Washington. 2000: 335–338.

Trimarchi CV, Debbie JG. The fluorescent antibody in rabies. In: Baer GM. *The Natural History of Rabies*. 2nd ed. Boca Ratón: CRC Press; 1991. p.220–229.

Tordo N; Kouknetzoff A. The rabies virus genome: na overview. *Onders. J. Veter. Reser.*, 1993; 60:263-269.

Tordo N. Contribution of molecular biology to vaccine development and molecular epidemiology of rabies disease. *Mem Inst Butantan*. 1991; 53:31-51.

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 Acid Res*. 1986; 14:2671-83.

Van Regenmortel, MHV, Fauquet CM, Bishop DHL, Carstens EB, Estes MK, Lemon SM, Maniloff J, Mayo MA, Mcgeoch DJ, Pringle CR, Wickner RB. *Virus Taxonomy. Classification and Nomenclature of Viruses. Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Academic Press, San Diego, California, 2000.

Webster WA, Casey GA. Virus isolation in neuroblastoma cell culture. In: Meslin F-X, Kaplan MM, Koprowski H. *Laboratory techniques in rabies*. 4th ed. Geneva: World Health Organization, 1996. p.96-104.

Webster WA, Casey GA. Diagnosis of rabies infection. In: Campbell JB, Charlton KM *Rabies*. Boston: Kluwer Academic Publishers 1988. p.201-22.

Webster LT, Dawson JL. Early diagnosis of rabies by mouse inoculation. Measurement of humoral immunity to rabies by mouse protection test. Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. (NY). 1935; 32:570–573.

Whitt MA, Buonocore L, Prehaud C, Rose JK. Membrane fusion activity, oligomerization, and assembly of the rabies virus glycoprotein. Virology. 1991; 185:681-8.

Wiktor TJ, Flamand A, Koprowsky H. Use of monoclonal antibodies in diagnosis of rabies virus infection and differentiation of rabies and rabies-related viruses. J Virol Meth. 1980; 1:33-46.

Wunner HW. Rabies Virus. In: Jackson CA, Wunner HW, Rabies. San Diego: Academic Press, 2002. p.23-77.

Zalan E; Wilson C; Pukitis D. A microtest for quantification of rabies virus neutralizing antibody. J. Biol. Stand. 1979; 7:213–220.



## **ANEXOS**

### **Soluções utilizadas**

#### **Tampão NT\***

NaCl (0,13 M) 7,6 g

TRIS (0,05 M) 6,057 g

Água destilada qsp 1000 ml

\*Ajustar pH para 7,5 com ácido clorídrico (HCL) 2 N

#### **Solução salina tamponada pH 7.0 - 0.01 M (PBS) 10x**

Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>12H<sub>2</sub>O 26,5 g

NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>H<sub>2</sub>O 3,6 g

NaCl 81,7 g

Água destilada qsp 1000 ml

#### **Tampão hidroximetil – aminometano/cloreto de sódio (TED) pH 7.0\***

Ácido acético, 1 mol/l 73 ml

Água destilada 900 ml

\*ajustar o pH para 7.0 com etilenodiamina e então adicionar água destilada para 1000 ml

#### **Ácido acético, 1 mol/l**

Solução ácido acético, 17.3 mol/l 50 ml

Água destilada 815 ml

#### **Solução saturada de sulfato de amônio pH 7.0**

Sulfato de amônio 769,05 g

Água destilada qsp 1000 ml

### **Reagente de Nessler\***

\*Para cada 1 ml de de amostra dialisada adiciona-se 50 µl de reagente de Nessler.

A ausência de precipitado de cor amarela no tampão indica que todo o Sulfato de Amônio foi retirado.

### **Tampão carbonato/bicarbonato de sódio 0.5 M pH 9.0\***

Solução A            Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> anidro        5,3 g    em 100 ml de água destilada

Solução B            NaHCO<sub>3</sub>                4,2 g    em 100 ml de água destilada

10 ml de sol. A + 13 ml sol. B

\*para preparar o tampão a 0.05 M, diluir 10 vezes

### **Azul de Evans**

Solução estoque : dissolver 10 mg de azul de Evans em 100 mL de PBS pH 7.0 0.01 M, para uso diluir 1 parte da solução estoque em 9 partes de PBS. Utilizar esta solução para diluir o conjugado.

### **Glicerina tamponada**

Glicerina        50%

PBS 0.01M pH 7.0    50%

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)