

MONOGRAFIA

**DESENVOLVIMENTO DE TESTE IMUNOCROMATOGRÁFICO
PARA DETECÇÃO DE VÍRUS RÁBICO EM AMOSTRAS
BIOLÓGICAS**

LUAN RENATO DOS PASSOS AIRES



UFSC UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA

**DESENVOLVIMENTO DE TESTE IMUNOCROMATOGRÁFICO
PARA DETECÇÃO DE VÍRUS RÁBICO EM AMOSTRAS
BIOLÓGICAS**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito para a obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas. Área de concentração: Virologia.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Roberto Zanetti

Florianópolis, 2011

AGRADECIMENTOS

A tudo que fez parte de minha vida durante esse período de graduação, família, amigos, professores, felicidade, tristeza, amor, experiências e sonhos.

Aos meus pais, progenitores de tudo o que sou, fontes de confiança e inspiração.

À minha irmã Luana, pelo tempo que vivemos juntos, por ser alguém que sempre se preocupou comigo. Sinto falta da nossa vida de calouros, de sua companhia ao sentar-me à mesa, ou de um simples bom dia e boa noite.

Aos meus primos, pela imensa amizade que sempre cultivamos. Os momentos se tornam muito melhores com vocês por perto.

Ao meu amigo Jhonny, pela amizade interespecífica, pela alegria que me traz sempre que volto pra casa, o vejo abanando seu rabinho de alegria.

Aos amigos que já tinha, por continuarmos nossa vida mantendo confidências.

Aos amigos que fiz na graduação: - Iva e Tatá, pela amizade que surgiu nos meus primeiros dias de aula – Júlia, pessoa com quem posso filosofar – João, Marco e Yuri, parceiros em momentos de risadas, trabalhos e estudos – Stefanny, pelos momentos felizes – Cecilia, freak! – Letícia, única parceira 2007/2 a se formar comigo - Kamille, por sempre me animar com sua alegria e me chamar para as festas – A todos amigos da BIO.

Ao Carlos Roberto Zanetti, por ter me aceito como aluno, o qual me ensinou muito além de conceitos imunológicos da raiva, mas dividiu sempre sua sabedoria, tornando-se uma pessoa em quem busquei me espelhar na forma de agir, pensar e criticar coisas do dia a dia ou da ciência. Sua presença entre os LIAnos garante que o trabalho seja realizado por prazer.

Ao Aguinaldo Roberto Pinto pela oportunidade de fazer parte do LIA, por sempre mostrar-se prestativo em contribuir com o meu trabalho, do o projeto ao desenvolvimento.

À minha amiga e mestre, Camila Zanluca, que inspira a todos com sua dedicação e gosto por o que faz, motivo pelo qual me fez gostar cada vez mais do LIA.

Aos meus amigos de laboratório, LIAnos e ex-LIAnos, Álvaro, Anderson, Arthur, Caroline, Douglas, Eduarda, Eduardo, Elis, Fernando, Kamille, Gisele, Mariana, Sílvia, Thais, Tiago, Victor e Yuri. Os frutos deste trabalho são méritos de vocês também.

Aos pesquisadores, pós-graduandos e ICs do departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia.

A todos os professores que de alguma forma contribuíram com a minha formação.

À Universidade Federal de Santa Catarina e ao Centro de Ciências Biológicas.

Ao CNPq e à CAPES pelo financiamento.

Muitíssimo Obrigado.
Luan R. P. Aires

*“O tempo é muito lento para os que esperam
Muito rápido para os que tem medo
Muito longo para os que lamentam
Muito curto para os que festejam
Mas, para os que amam, o tempo é eterno.”*
William Shakespeare

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Esquema ilustrativo do vírus rábico e seus componentes estruturais.

Figura 2: Incidências de raiva humana no Brasil e seus respectivos transmissores, de 1980 a outubro de 2010.

Figura 3: A) Esquematização da face superior do *strip test*.
B) Esquematização da lateral do *strip test*.

Figura 4: Esquema ilustrativo indicando a posição de cada componente do *strip*, assim como os materiais que estes são feitos e suas dimensões.

Figura 5: Valores de densidade óptica obtida com a conjugação de diferentes concentrações de MAb LIA02 ao ouro coloidal.

Figura 6: Valores de densidade óptica obtida com a conjugação de diferentes concentrações de MAb 2A5 ao ouro coloidal.

Figura 7: Valores de densidade óptica obtida com a conjugação de diferentes concentrações de MAb 8D11 ao ouro coloidal.

Figura 8: Imagem de um *strip test* contendo PBS como amostra de fluxo e lisado de células BHK-21 infectadas (b) e não infectadas com vírus rábico (a) fixadas à membrana de nitrocelulose.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Classificação filogenética do gênero *Lyssavirus*.

Tabela 2: Lista dos MAbs produzidos pelo grupo LIA-UFSC.

Tabela 3: Lista dos esquemas de testes realizados para a avaliação do melhor sistema de tiras capaz de detectar o vírus rábico.

LISTA DE ABREVIATURAS

- AcM . anticorpos monoclonais**
AcN . anticorpos neutralizantes
BHK-21 . linhagem de celulas de rim de bebe de hamster (do ingles *baby hamster kidney*)
BSA . soro albumina bovina
CDC . do ingles *Center for Disease Control and Prevention*
CVS . Chalenge Virus Standard
DMEM F12 . meio Dulbecco modificado por Eagle/ Nutriente HAM F12
DMSO . dimetilsulfoxido
DNA . acido desoxirribonucleico
D.O. . densidade optica
ELISA . ensaio enzimatico por imunoabsorcao (do ingles *enzymelinked immunosorbent assay*)
g . forca centrifuga
G . glicoproteina
HRIG . imunoglobulina antirrabica humana (do ingles *Human rabies immunoglobulin*)
IFD . imunofluorescencia direta
IFI . imunofluorescencia indireta
ITCF . isotiocianato de fluoresceina
L . RNA polimerase RNA-dependente
Le . sequencia lider
M . proteina de matriz
N . nucleoproteina
NIH . Instituto Nacional de Saude (do ingles *National Institutes of Health*)
OMS . Organizacao Mundial de Saude
P . fosfoproteina
PBS . solucao salina tamponada (do ingles *phosphate buffered saline*)
PEG . polietilenoglicol
PV . Pasteur virus

RNA . acido ribonucleico

RNP . ribonucleoproteina

rpm . rotacao por minuto

RPMI . meio *Roswell Park Memorial Institute*

RT-PCR . reação em cadeia da polimerase associada a transcrição reversa

SBF . soro bovino fetal

SNC . sistema nervoso central

UFSC . Universidade Federal de Santa Catarina

UI . unidades internacionais

ÍNDICE

1-	Introdução	
1.1-	O Vírus	
	Rábico.....	11
1.2-	Taxonomia e	
	Filogenia.....	13
1.3-	Raiva.....	14
1.4-	Patologia.....	14
1.5-	Transmissão e	
	Infecção.....	15
1.6-	Raiva e Resposta	
	Imune.....	16
1.7-	Epidemiologia de Raiva no	
	Brasil.....	17
2-	Métodos Diagnósticos, estudos epidemiológicos e sorológicos	
2.1-	Técnicas	
	Diagnósticas.....	19
2.2-	Anticorpos monoclonais, estudos sorológicos e	
	epidemiológicos.....	20
2.3 -	Testes imunocromatográficos, de fluxo lateral ou <i>strip</i>	
	<i>tests</i>	22
3-	Objetivos	
3.1	Objetivo	
	Geral.....	25
3.2	Objetivos	
	específicos.....	25
4	Justificativa.....	26
5-	Materiais e Métodos	
5.1	Produção de vírus CVS-11.....	27
5.2	MABs	
	utilizados.....	28
5.3	Concentração e Purificação dos MABs.....	28

5.4	Conjugação com ouro coloidal.....	29
5.5	Padronização e montagem dos <i>strips</i>	30
6-	Resultados e Discussão	
6.1	Cultivo, concentração e purificação dos Mabs.....	32
6.2	Estimação da quantidade ideal de MAb's necessários para a conjugação com ouro coloidal.....	32
6.3	Verificação da eficácia dos conjugados produzidos.....	37
7-		
	Referências.....	44

1. Introdução

1.1 O Vírus Rábico

O vírus rábico (VR) é um agente etiológico que acompanha as civilizações humanas por mais de quatro milênios (WILKINSON, 1977) de razões de 100-300 nm de comprimento e aproximadamente 75nm de diâmetro e característica forma de projétil, a qual possui uma extremidade curva e outra plana (DAVIES *et al.*, 1963; TORDO, 1996) [Figura 1]. Constituído por um genoma de RNA fita simples, não segmentado, de sentido negativo (WARREL; WARREL, 2004) e cinco proteínas que desempenham duas importantes funções estruturais para a manutenção viral: a ribonucleoproteína (RNP) e o envelope. Devido às características de seu genoma, os vírions rábicos precisam carregar uma enzima, a RNA polimerase RNA-dependente (L), que atua na formação de uma fita de senso positivo, para que ocorra a tradução de suas proteínas (TORDO, 1996).

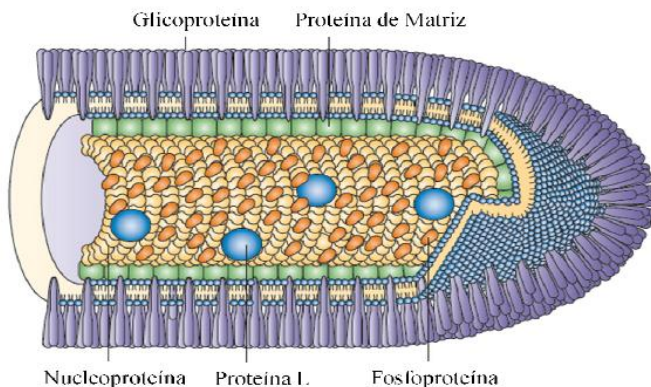


Figura 1: Esquema ilustrativo do vírus rábico e seus componentes estruturais (SCHNELL *et al.*, 2011)

A RNP, nucleocapsídeo do vírus rábico, organiza o genoma composto de 11.932 nucleotídeos (TORDO *et al.*, 1992) em uma estrutura helicoidal juntamente à nucleoproteína, fosfoproteína e a RNA

polimerase RNA-dependente, o que garante integridade a esse complexo. A porção 3' inicial (primeiros 58 nucleotídeos) possui uma sequência líder (Le) não codificante, seguida de 5 genes estruturais N, P, M, G e L. Estes genes são separados por pequenas sequências nucleotídicas não codificantes.

O envelope viral, constituído de uma bicamada lipídica proveniente da célula hospedeira e glicoproteína (G), envolve a RNP e participa na adsorção viral. Danos à integridade desse envelope comprometem o potencial infeccioso do vírus, notando-se uma alta sensibilidade deste às condições não similares às intracelulares, como temperaturas ambiente ou elevadas (mesmo à 37 em meio extracelular), pHs muito ácidos ou básicos, álcool e outros químicos. A glicoproteína é constituída por 524 aminoácidos (RUPPRECHT; HANLON; HEMACHUDHA, 2002) e forma complexos protéicos que se projetam da estrutura viral que atuam no reconhecimento das moléculas celulares as quais o vírus se ligará.

Entre a RNP e o envelope encontra-se a proteína de matriz, composta por 202 aminoácidos, desempenhando papel nos estágios finais da infecção, geralmente ligados à morfogênese (TORDO, 1996).

1.2 Taxonomia e Filogenia

O VR pertence à família Rhabdoviridae que abrange um grupo de vírus que infectam vertebrados, invertebrados e algumas espécies de plantas, possuindo cinco gêneros: *Ephemerovirus*, *Cytorhabdovirus*, *Nucleorhabdovirus*, *Vesiculovirus* e *Lyssavirus* – tendo como representante o vírus rábico - (MURPHY *et al.*, 1995), sendo os dois últimos os únicos capazes de infectar mamíferos, os quais apresentam ciclos infecciosos, estruturas bioquímicas e morfologia similares (WUNNER, 2002).

Tabela 1: Classificação filogenética do gênero *Lyssavirus*.

Classificação	Genótipo	Filogrupo
---------------	----------	-----------

<i>Lyssavirus</i>	I	I
<i>Duvenhage virus</i>	IV	I
<i>European bat Lyssavirus tipo-1</i>	V	I
<i>European bat Lyssavirus tipo-2</i>	VI	I
<i>Australian bat Lyssavirus</i>	VII	I
<i>Lagos bat virus</i>	II	II
<i>Mokola virus</i>	III	II

(adaptado de KOTAIT *et al.*, 2009)

O gênero *Lyssavirus* é dividido em dois filogrupos e sete genótipos, sendo o genótipo I, IV, V,VI e VII pertencentes ao filogrupo I e os genótipos II e III pertencentes ao filogrupo II (Tabela 1). O genótipo I é o presente nas Américas e apresenta uma ampla capacidade infecciosa dentro das classes de mamíferos. O genótipo II não foi observado em humanos, mas pode infectar morcegos e gatos. Já os genótipos III – VII circulam preferencialmente em morcegos, principalmente os insetívoros, podendo mesmo assim ser transmitido a outros animais inclusive o homem, causando encefalite semelhante à raiva (BADRANE *et al.*, 2001; ROTIVEL *et al.*, 2002).

1.3 Raiva

Causador da doença conhecida como raiva, o vírus apresenta um amplo grupo animal passível de ser infectado, que abrange todos os mamíferos (RUPPRECHT; HANLON; HEMACHUDHA, 2002). Do latim, *rabere*, a palavra raiva significa “demência”, “loucura”, devido aos sintomas pragmáticos da doença (STEELE; FERNANDEZ, 1991). Apesar do decorrer de aproximadamente dois séculos após a descrição do VR e o desenvolvimento de uma vacina por Louis Pasteur, ainda assim aproximadamente 55.000 pessoas morrem anualmente (WHO[a], 2010) e cerca de três milhões vivem em regiões de risco ao longo de países africanos, asiáticos e sulamericanos (WUNNER, 2010).

1.4 Patologia

A patologia da doença é muito similar entre os mamíferos,

apresentando um elevado tempo de incubação, se comparado a outras doenças virais. A raiva humana pode se manifestar na forma encefálica ou paralítica. Acredita-se que as diferenças do tropismo na região de entrada viral e as maneiras que as cascatas imunológicas são ativadas possam ser os principais fatores que levam às diferentes manifestações clínicas. Os sintomas prodromicos incluem mal-estar, dor de cabeça, febre, ansiedade e agitação. Dor, parestesia ou prurido podem acontecer no sítio de exposição. Em casos de raiva encefálica nota-se períodos de hiperexcitabilidade intercalados com intervalos de lucidez, disfunção autônoma, hipersalivação, arritmia cardíaca, priapismo e hidrofobia (que no caso humano caracteriza-se por espasmos de músculos inspiratórios ao ato de beber), assim como uma exagerada resposta de reflexos protetivos do trato respiratório. A raiva paralítica caracteriza-se por uma grave deficiência motora, começando pela região de entrada do vírus, progredindo para uma quadriparesia e enfraquecimento dos músculos faciais (RUPPRECHT; HANLON; HEMACHUDHA, 2002).

A presença do vírus rábico nos neurônios providos de uma espessa bainha de mielina impossibilita a ação do sistema imune, tanto adaptativo (não havendo a neutralização através de anticorpos, nem a resposta citotóxica) quanto inato, havendo pouca eficiência de interferons na amenização da replicação viral (KOTAIT, 2009).

1.5 Transmissão e Infecção

A principal forma de transmissão do vírus ocorre através da inoculação percutânea da saliva de animais infectados, normalmente por mordeduras e arranhaduras; sendo assim, a raiva é considerada uma zoonose viral. Os riscos de infecção por mordeduras (5%-80%) é pelo menos 50 vezes maior do que através de arranhaduras (0,1%-1%) (RUPPRECHT; HANLON; HEMACHUDHA, 2002). A entrada do vírus acontece através de seu contato com feridas abertas ou superfícies mucosas, sendo então possíveis outras formas de transmissão, apesar de mais raras, como através da inalação acidental de aerossóis em laboratórios de produção de vacinas (WINKLER *et al.*, 1973) ou em cavernas habitadas por numerosos morcegos (GIBBONS, 2002). Casos de infecção através do contato com o trato digestivo (CDC, 1999), transmissão inter-humana, transplantes de córnea e órgãos sólidos também já foram reportados. Em 2004 o *Center of Disease Control*

(CDC) dos Estados Unidos reportou 4 casos de pacientes que faleceram após receberem órgãos de um mesmo doador, o qual provou-se a presença do VR após autópsia (SRINIVASON *et al.*, 2005). Após a entrada do VR através da ferida aberta ou de superfícies mucosas ocorre a interação da glicoproteína viral com os receptores nicotínicos de acetilcolina de miócitos (LENTZ; BURRAGE; SMITH, 1982), onde acontece a incubação viral, também conhecida como fase eclipse. Essa fase pode variar de 2 semanas a 6 anos, durando em média de 2 a 3 meses, de acordo com a quantidade de partículas virais infectantes e o local da inoculação, notando-se assim que mordidas por animais raivosos na cabeça e face ou regiões corporais superiores em geral, juntamente a sangramentos, apresetam os maiores riscos devido a um menor tempo de incubação (WARRELL; WARRELL, 2004). Após a passagem do vírus pela junção neuromuscular e sua chegada em neurônios periféricos o neurotropismo acontece com a propagação passiva do vírus passado de célula a célula, em um fluxo axoplasmático retrógrado entre as junções sinápticas (TSIANG, 1979). A migração do vírus em direção ao Sistema Nervoso Central (SNC) acontece em uma velocidade de aproximadamente 50-100 milímetros por dia. (MAZARAKIS; AZZOUZ; ROHELL, 2001) A distribuição no SNC varia de acordo com a cepa viral e a espécie animal infectada, sendo as regiões mais comumente atingidas o hipocampo, tronco cerebral, medula e as células de Purkinje no cerebelo. Após a infecção do SNC, onde ocorrerá uma intensa replicação, o VR passa a se disseminar através do sistema nervoso periférico e autônomo para o resto do corpo, afetando órgãos como pulmões, coração, rins, bexiga, útero, testículos, etc., além das glândulas salivares onde será liberado pela saliva.

O período de incubação do VR é muito variável de acordo com o filogrupo e cepa do vírus, além de ser diferente também entre cada grupo animal, podendo variar de quinze dias a quatro meses, sendo que em quirópteros esse tempo máximo pode ser ultrapassado (KOTAIT *et al.*, 2009).

1.6 Raiva e Resposta Imune

Diferentemente de diversas encefalites, a raiva não altera o

perfil inflamatório da resposta do hospedeiro, sendo que os sintomas neurológicos estão mais relacionados à disfunção neuronal, apresentando poucas lesões teciduais, sendo os mais severos presentes no tronco cerebral. A resposta imune antirábica que se desenvolve após a entrada do vírus é capaz de impedir o desenvolvimento da doença dependendo da cepa viral, observando-se então mecanismos que garantem o sucesso do vírus em sua infecção. O forte neurotropismo do VR é provavelmente uma das principais maneiras que este encontrou durante sua evolução como forma de escapar da resposta imune do hospedeiro. (KAPLAN, 1975).

A glicoproteína viral é o principal alvo de anticorpos neutralizantes antirábicos, demonstrando ainda ser uma forte indutora de apoptose de células infectadas, evidenciando sua atividade imunogênica (FABET *et al.*, 2002).

Uma das teorias que explicam o mecanismo de movimentação do vírus ao SNC após transplante de órgãos sólidos indica que células da resposta imune celular podem ser infectadas e que desta maneira promovam o transporte do vírus de regiões pouco inervadas para regiões muito inervadas, como os linfonodos, por exemplo (CDC, 1999).

1.4 Epidemiologia da raiva no Brasil

Nos últimos dez anos foram reportados 549 casos de raiva humana no Brasil sendo que o último ano com um número considerável de acidentes é 2005, totalizando 44 indivíduos afetados. Devido às campanhas de vacinação de animais domésticos e um sistema organizado de vigilância epidemiológica a transmissão do VR passou de um ciclo urbano para o silvestre (Figura 2). Do período entre 1996 a 2005 foram relatados 254 casos de raiva humana sendo 34% destes causados por animais silvestres - 90% devido ao contato com quirópteros. A preocupação com o aumento nos últimos anos de raiva silvestre leva à notória importância de estudos epidemiológicos nesses animais. (BRASIL, 2010).

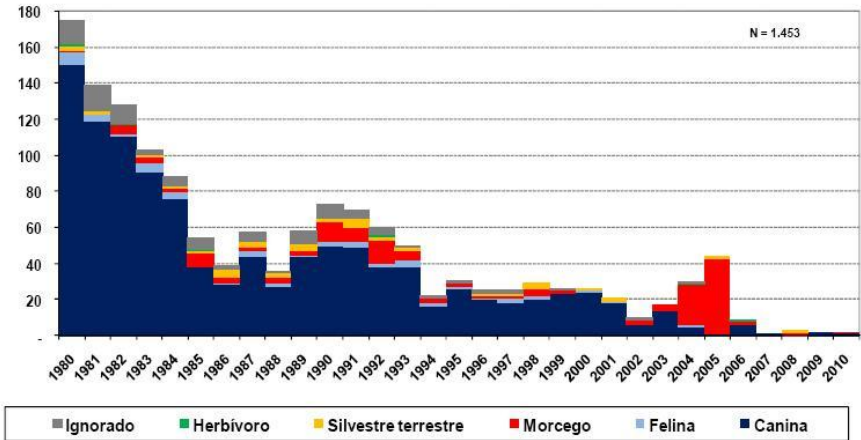


Figura 2: Incidências de raiva humana no Brasil e seus respectivos transmissores, de 1980 a outubro de 2010. (BRASIL, 2010)

A raiva não afeta apenas diretamente o ser humano causando-lhe doença, mas é responsável por um alto prejuízo nos agronegócios, levando fazendeiros a ter que investir na vacinação de seu rebanho. Em Santa Catarina, a raiva humana está sob controle desde 1982 (BRASIL, 2008). A raiva silvestre, no entanto, ainda acarreta grandes prejuízos à indústria agropecuária. No período de 1989 a 1999, foram notificados 450 casos de raiva em herbívoros, sobretudo bovinos. Considerando-se a taxa de subnotificação calculada para o Brasil, o número de mortes neste Estado é estimado em 4500, o que acarreta um prejuízo anual de aproximadamente um milhão de dólares (MARQUES, 2000).

Em 2010, a Campanha Nacional de vacinação contra raiva canina e felina iniciou-se no mês de junho e mais de 1,3 milhões de animais foram vacinados, sendo aproximadamente 80% de cães e 20% de gatos. Ainda assim até outubro de 2010 dois casos de raiva humana foram diagnosticados, ambos na região nordeste sendo um transmitido por cão e outro por morcego (BRASIL, 2010).

2. Métodos Diagnósticos, estudos epidemiológicos e sorológicos

2.1 Técnicas Diagnósticas

Uma diagnose precisa e sensível é de extrema importância nos casos de raiva, seja humana ou animal, de modo a possibilitar tratamentos e medidas profiláticas apropriadas. Além destes quesitos importantes, a rapidez da técnica diagnóstica deve ser considerada, assim como o grau de especialização dos indivíduos que as aplicarão e os equipamentos disponíveis a estes. Em casos de diagnósticos *post mortem* onde há suspeita de vírus rábico, os procedimentos realizados são a remoção do encéfalo do animal (inclusive humano), armazenamento deste em algum recipiente fechado e refrigerado, identificação apropriada ao recipiente e encaminhamento da amostra o mais rapidamente possível a um laboratório capacitado em diagnósticos (KOTAIT *et al.*, 2009) – o que em países em desenvolvimento pode se tornar impossível.

As técnicas mais usadas para a diagnose de raiva são histológicas, a comprovação direta utilizando anticorpos anti-rábicos e o isolamento viral através da inoculação de amostras suspeitas em animais ou culturas celulares (NIGG, 2009). Uma descoberta que contribuiu com a diagnose da raiva são os corpúsculos de Negri, que histologicamente apresentam-se como inclusões intracitoplasmáticas neuronais de ribonucleoproteína viral, sendo regiões acidófilas com granulações basófilas. A técnica histológica confere uma sensibilidade de aproximadamente 85% dos casos, e com o tempo passou a ser substituída por técnicas que utilizam anticorpos anti-rábicos e análises de fluorescência de material salivar, lacrimal ou biópsias da região da nuca (DFA). A fluorescência por si já confirma o teste como positivo, sendo considerada a técnica “padrão ouro” para a raiva. No caso do isolamento viral as amostras de encéfalo podem ser analisadas tanto *in vitro* quanto *in vivo*. O resultado é muito específico e, caso positivo, o animal inoculado irá apresentar sintomas como pelos arrepiados, falta de coordenação dos membros posteriores, paralisia e prostração. Deve-se levar em consideração que o óbito dos animais testados não acontece tão brevemente, devido ao tempo de incubação viral, devendo-se observar os animais durante até 30 dias. Alguns óbitos frequentemente obtidos em 48 horas após a inoculação viral acontecem, mas devem ser

desconsiderados, pois na maioria dos casos trata-se de reações de anafilaxia exacerbadas. Em testes *in vitro*, células de neuroblastoma murino (N2A 1300) podem ser expostas ao material suspeito, infectadas e após um período de incubação, que varia de 24 – 72 horas, submetidas à imunofluorescência, indicando a presença ou não do vírus (KOTAIT *et. al*, 2009).

2.2 Anticorpos monoclonais, estudos sorológicos e epidemiológicos.

A técnica de produção de Anticorpos Monoclonais (MAbs) mais utilizada é a que consiste na fusão de linfócitos B esplênicos de murinos previamente imunizados com o antígeno em questão, com células de mesma linhagem, porém, tumorais, denominadas mielomas, seleção das células fusionadas, triagem das células produtoras do anticorpo de interesse e obtenção de um único clone produtor deste anticorpo (KÖHLER; MILSTEIN, 1975). Com esse processo obtém-se hibridomas, células imortais passíveis de serem cultivadas em cultura celular produzindo anticorpos, não precisando, assim, intensivas imunizações e sangrias de animais toda vez que se queira obter anticorpos. Outras técnicas de engenharia genética possibilitam a produção de MAbs sintéticos humanos, através de procedimentos de apresentação por fagos, mais conhecida como *phage display*. A partir de uma biblioteca de bacteriófagos construídos por clonagem pode-se mimetizar a capacidade animal de produzir anticorpos específicos frente a uma variedade imensa de antígenos diferentes, chegando a aproximadamente 10^{10} anticorpos contra epítomos distintos (BRADBURY, 2004).

As vantagens que o desenvolvimento de anticorpos monoclonais trouxeram contribuíram não apenas com a especificidade de técnicas diagnósticas mas com a possibilidade de novos estudos sorológicos e epidemiológicos, uma vez que tornou-se mais fácil a análise de diferentes cepas virais (WIKTOR; KOPROWSKI, 1978).

O antígeno rábico mais bem conservado dentro dos diferentes sorotipos e cepas do vírus é a nucleoproteína (WUNNER, 2007), sendo os MAbs contra este que possibilitam testes mais sensíveis, porém, não garantem necessariamente especificidade. Há também estudos que avaliam a possibilidade do uso dos MAbs anti-rábicos no tratamento

pós-exposição de pacientes, de modo a substituir o soro policlonal atualmente ministrado (HRIG - *Human Rabies Immunoglobulin*) (WHO[b], 2002).

Em estudo anterior realizado no Laboratório de Imunologia Aplicada (LIA/CCB/UFSC), do qual participei durante meu estágio de iniciação científica, foram produzidos 10 hibridomas secretores de Mabs anti-rábicos (ZANLUCA et al., 2011). Estes Mabs foram caracterizados em relação ao isótopo, capacidade neutralizante, reatividade à glicoproteína e reatividade a diferentes isolados de vírus selvagens e à cepas utilizadas na fabricação de vacinas (humanas e veterinárias), conforme apresentado na tabela 2 . Estes anticorpos estão sendo utilizados na padronização de um ensaio imuno-enzimático, capaz de quantificar antígenos virais em vacinas, como possível substituto do teste atualmente preconizado pela OMS, que utiliza animais experimentais. Além disso alguns desses anticorpos também foram conjugados ao ITCF, para fabricação de conjugado fluorescente, utilizado no diagnóstico da raiva.

Tabela 2: Lista dos MAbS produzidos pelo grupo LIA-UFSC

MAbs	Isotipo	Atividade Neutralizante	Reatividade com amostras de vírus selvagens (no. de +/-total testadas)	Reatividade com amostras de vírus vacinais (no. de +/-total testadas)
LIA02	IgG2bk	-	34/35	17/17
6H8	IgG2ak	-	35/35	17/17
7B7	IgMk	-	6/35	15/17
2A5	IgG3k	-	n.c	16/17
2D2	IgG3k	-	n.c	15/17
1H2	IgG3k	-	n.c	15/17
3.00E+06	IgG3k	-	33/35	16/17
8D11	IgG2ak	+	12/35	12/17
9C7	IgMk	-	34/35	17/17
8B6	IgG2ak	-	19/35	16/17

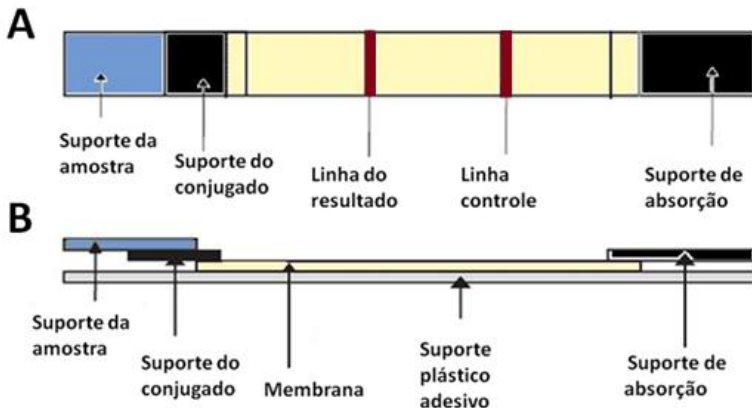
N.C: Dados não constam

2.3 Testes imunocromatográficos, de fluxo lateral ou *strip tests*

Os princípios envolvidos em ensaios de imunocromatografia, assim como outros diversos testes imunológicos, se baseiam na interação antígeno-anticorpo. Anteriormente conhecido como imunoensaio de partículas solúveis (LEUVERING, 1980), o termo *strip test* é amplamente utilizado nos dias de hoje. Os primeiros testes foram feitos para a detecção de gonadotrofina coriônica humana (hCG). Hoje, há testes disponíveis comercialmente para o monitoramento da ovulação, detecção de organismos de doenças infecciosas, análise de drogas de abuso. Produtos humanos também foram introduzidos, como para testes veterinários, aplicações agrícolas, testes ambientais e avaliação da qualidade do produto. O ensaio baseia-se na migração de amostras e anticorpos reagentes ao longo de tiras de membranas, onde as interações de afinidade podem ser detectadas em apenas alguns minutos sem a necessidade de qualquer separação ou etapas de lavagem. A maioria dos *strip tests* são baseados na utilização de anticorpos conjugados com ouro coloidal, que atuam como os marcadores do teste, que, devido à cor rosa da marcação, podem ser visualmente detectados, proporcionando rápidas informações qualitativas (resposta sim ou não) ou semi-quantitativa (analisando a intensidade da coloração por densitometria). (LEUNG *et al.*, 2003). Esta tecnologia tem dado origem para alguns diagnósticos muito popularmente disponíveis, ferramentas tais como os testes de gravidez ou testes de glicose no sangue, que já provaram ser baratos e de fácil aplicação.

A tecnologia dos imunoensaios de fluxo lateral tornou-se amplamente usada mundialmente, principalmente por empresas privadas, notando-se, porém, uma fragilidade no conhecimento literário atual (WANG *et al.*, 2006). Anticorpos utilizados em testes imunocromatográficos devem ter sensibilidade suficiente, especificidade, pureza e estabilidade para um teste eficaz. Dependendo do projeto do ensaio, os anticorpos podem ser usados como reagentes de captura na linha de teste, como conjugados no detector de partículas, ou ambos. Além disso, os anticorpos devem estar disponíveis em quantidade suficiente para atender às previsões de produção. Há também a decisão a ser feita se anticorpos policlonais ou monoclonais serão usados.

Uma vez que se aplica a amostra fluida sobre o suporte de amostra, esta iniciará seu fluxo ao outro extremo do *strip* por capilaridade. Caso haja a presença do antígeno no fluido, acontecerá sua interação com o conjugado – formação do imunocomplexo - e juntos continuarão o fluxo, mas se não houver a presença do antígeno, os anticorpos conjugados serão carregados independente da formação do imunocomplexo. O próximo sítio de reação é o da linha de sinal, onde também se encontram imobilizados anticorpos contra o antígeno, porém, contra outros epítopos, para que não ocorra uma saturação destes. O acúmulo de imunocomplexo nessa linha gera uma coloração revelando o teste como positivo. Já a próxima linha, a do controle, deve gerar cor ao interagir com o imunocomplexo ou diretamente com anticorpos conjugados carregados, pois nesta encontram-se imobilizados anticorpos contra imunoglobulinas. O sinal dos resultados pode ser obtido em até 10 minutos, e a força do sinal depende principalmente da quantidade de antígeno, devendo-se ainda considerar que a facilidade de aplicação é de um teste possível de ser aplicado por qualquer um e em qualquer lugar



(PAEK, 2000).

Figura 3: A- Esquemática da face superior do *strip test*. B- Esquemática da lateral do *strip test*. (Adaptado de Paek, 2000)

As membranas normalmente utilizadas são de nitrocelulose, nylon, polietileno ou sílica, de espessuras finas e frágeis, apoiadas sobre

camadas de plástico ou nylon que facilitam a manipulação dos *strips*. A espessura das membranas de nitrocelulose pode variar de $0,05\mu\text{m}$ a aproximadamente $12\mu\text{m}$, o que influencia diretamente na velocidade do fluxo capilar de um líquido, e suas moléculas, ao longo destas. Em uma das extremidades do *strip* é reservado um espaço destinado a aplicação da amostra, geralmente feito de celulose ou sílica. Logo após a região de aplicação da amostra encontra-se um espaço feito de sílica sobre o qual é seco e fixado o conjugado. O conjugado utilizado depende do que se deseja avaliar com o *strip*, uma vez que é este que carrega o elemento marcado revelador do teste, iniciando a interação específica com a amostra fluída, ambos seguindo o fluxo em direção à outra extremidade da membrana. As marcações são feitas com nanopartículas de 15-800 nanômetros as quais é garantida livre mobilidade ao longo da membrana, sendo as moléculas mais utilizadas o ouro coloidal e o látex, entre outras pouco exploradas como o selênio, o carbono ou lipossomas. (NIELSEN *et al.*, 2008). A marcação com estes materiais garante que o teste seja avaliado qualitativamente, através da coloração, ou quantitativamente, quando são utilizados marcacões fluorescentes.

O suporte da amostra pode ser usado para executar várias tarefas, principalmente para promover a distribuição controlada da amostra para o suporte do conjugado, de forma a aumentar a viscosidade da amostra (modular as propriedades do fluxo) e aumentar a capacidade da amostra de solubilização do reagente detector.

A membrana é provavelmente o material mais importante usado em uma tira de teste de fluxo lateral. Atributos físicos e químicos da membrana afetam as propriedades de fluxo capilar. As propriedades de fluxo capilar, por sua vez afetam a deposição de reagente, linha de sensibilidade do ensaio, a especificidade e a consistência do teste. Nos *strip tests* de fluxo lateral a membrana deve, irreversivelmente, capturar os reagentes nas linhas teste e controle. O polímero da membrana é que determina as características de suas afinidades aos reagentes, sendo assim, para a maior parte dos materiais a capacidade de ligação de uma proteína à membrana é determinada pela área de polímero disponível para imobilização. A área de superfície de membrana é determinada pelo tamanho dos poros, porosidade (quantidade de ar na estrutura tridimensional), espessura e, em menor representatividade, características estruturais únicas do polímero.

A capacidade de fixação de uma proteína em uma área de

superfície de membrana depende também da estrutura e compacidade da proteína. Para IgGs, por exemplo, a quantidade ideal é de aproximadamente $1 \mu\text{g}/\text{cm}^2$. Em uma tira de teste típica, a linha de teste é de 1 mm de largura. Se a faixa for de 1 cm de largura, a quantidade de reagente de captura que podem ser vinculados é de 5 a 20 mg, sendo estes, porém, cerca de 1-10 vezes mais do que o necessário para ensaios. Proteínas da membrana de nitrocelulose ligam eletrostaticamente através da interação de dipolo forte do nitrato ester com o dipolo forte de as ligações peptídicas das proteínas. Membranas de nitrocelulose são completamente neutras, sem prótons ácidos. Embora a sua capacidade de adsorção de proteínas é independente do pH da solução de imobilização, este pode afetar a eficiência da imobilização. Quando se aplicam reagentes de captura sobre as membranas de nitrocelulose, agentes caotrópicos como Tween e Triton X-100 devem ser usado em concentrações muito baixas, ou evitados, (0,01% v / v).

Com a disponibilidade dos 10 Mabs produzidos no LIA, cujas características de reatividade foram determinadas, abriram-se possibilidades para desenvolvimento de um teste de diagnóstico rápido, do tipo *strip test*, para utilização em situações especiais, descritas abaixo.

3. Objetivos

3.1 Objetivo Geral

O presente projeto de trabalho teve como objetivo o desenvolvimento de um teste imunocromatográfico capaz de detectar a presença do VR em amostras biológicas, de modo a contribuir com uma diagnose rápida, sensível e de fácil aplicação.

3.2 Objetivos específicos

- Selecionar dentre os 10 MAbS anti-rábicos produzidos no LIA/CCB/UFSC os mais adequados para aplicação no *strip test*;
- Produzir um conjugado anti-rábico com os MAbS selecionados, marcados com outro coloidal;

- Produzir o sistema do *strip test*, constituído pelo suporte plástico adesivo, membrana de nitrocelulose, suportes de amostra, conjugado e absorção.

- Determinar os limites de sensibilidade do *strip test* através da comparação com a técnica de imunofluorescência direta.

4. Justificativa

Como descrito por ZANLUCA *et al.*, os 10 anticorpos monoclonais anti-rábicos produzidos pelo grupo LIA-MIP-UFSC além de reagirem com cepas virais fixas (de laboratórios) conseguem reconhecer isolados virais provenientes de diferentes animais naturalmente infectados. Considerando-se ainda as informações levantadas sobre a importância de um diagnóstico preciso, rápido e de fácil aplicação, o teste imunocromatográfico é o método que melhor atende estas expectativas e poderia ser usado em diversas situações, como por exemplo;

- I) Na análise da saliva de animais domesticados envolvidos em casos de mordeduras, não necessitando a observação do mesmo ou sacrifício do animal em casos de suspeita de raiva;
- II) Quando os procedimentos para diagnose de raiva, desde o transporte do material suspeito até a aplicação de técnicas que só podem ser realizadas por técnicos capacitados, em laboratórios especializados, fossem muito difíceis;
- III) Quando seja necessária uma ferramenta ágil para realização de estudos epidemiológicos em animais silvestres *in loco*, evitando-se o transporte das amostras e possibilitando que o vírus seja detectado em animais vivos.

5. Materiais e Métodos

5.1 Antígenos utilizados

5.1.1 Vírus CVS-11

A produção do vírus CVS-11 foi realizada a partir de uma amostra gentilmente cedida pelo Dr. Wlamir Moura (INCQS/Fiocruz/RJ). Uma garrafa de 25cm² com tapete confluyente de células BHK-21 foi tratada com 1ml de solução (...%) de tripsina, seguida da adição de 1ml de meio DMEM-F12 para desfazer os grumos celulares. Transferiu-se as células para um tubo plástico de 15ml e foram adicionados 2ml da amostra de vírus CVS-11. A mistura foi mantida por 50 min. em banho maria a 37° C, sendo homogeneizado a cada 5 minutos. Distribuiu-se o conteúdo em 3 novas garrafas de 25cm², nas quais foram adicionados 10ml de meio DMEM-F12 complementado com 10% de soro bovino fetal (SBF). As garrafas foram cultivadas em estufa a 37° C com 5% de CO₂ por 72 horas, com controle diário do pH do meio de cultura. Ao final do processo, os sobrenadantes foram recolhidos e centrifugados a 300 G por 10 minutos. Em seguida foram feitas alíquotas que foram imediatamente congeladas à -80° C para futuros usos. O sobrenadante viral assim obtido foi quantificado pelo teste de formação de placas *-Fluorescent Forming Unit – FFU*, (DEAN *et al.*, 1996), apresentando título de 2500 FFU/ml.

Além das partículas virais infectantes descritas acima, as células que permaneceram aderidas às garrafas foram removidas com um *cell scraper* e lisadas através de brucas pipetagens, seguidas de processos de congelamento e descongelamento (10 no total), na tentativa de se garantir a lise das membranas celulares e liberação de proteínas virais, que desta forma, também foram testadas como antígeno para o *strip test*.

5.1.2 Vacinas

As vacinas utilizadas serviram como amostras de antígenos rábicos atuando em testes como fluxo de amostra e antígeno fixado à membrana de nitrocelulose. A seguir a lista com as descrições de cepa viral e reatividade dos MAbs de ZANLUCA (2011) a estas vacinas por imunoblot:

5.2 MAbs utilizados

Os hibridomas produtores de MAb descritos por Zanluca et al.(2010) foram cultivados em RPMI–1640 complementado com 1% de SBF e solução de antibióticos e antifúngico (PSA), na proporção de 1mL de penicilina G/estreptomicina/anfotericina B (10.000U de penicilina G, 10.000µg de estreptomicina e 25µg de anfotericina B –Gibco/BRL) para cada 100ml de meio.

Além disso, os MAbs LIA02 e 8D11 foram adaptados ao meio BD092 e cultivados em garrafas especiais para concentração das imunoglobulinas secretadas (Cell Line-B&D, USA)

O MAb LIA02 foi escolhido por apresentar ótimas condições de cultivo, com alta capacidade de multiplicação e secreção de imunoglobulinas, além de reagir com 34 das 35 cepas de vírus rábicos testadas (ZANLUCA *et al.*). Da mesma forma, o MAb 2A5 também apresentou boas características de cultivo e reatividade com diferentes vírus vacinais, além de ser originado de um protocolo de fusão em que foi utilizado vírus isolados de quirópteros, do qual participei integralmente durante iniciação científica.

O MAb 8D11 foi escolhido por ser o único dentre os disponíveis que reage com a glicoproteína viral, além de apresentar poder neutralizante (ZANLUCA *et al.*).

Conforme descrito posteriormente, utilizou-se o MAb anti-imunoglobulinas de camundongo polivalentes, produzido em cabras (SIGMA, 107k4851) como controle positivo do teste.

5.3 Concentração e Purificação dos MAbs

Os MAbs utilizados foram concentrados com solução saturada de sulfato de amônia, a qual foi adicionada, sob agitação, gota a gota, volume a volume. A mistura de sobrenadante e solução de sulfato de amônia foi deixada em repouso por 4 horas a 4° C, quando então foi centrifugada a 1200 G por 40 min, a 4° C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado dialisado em PBS (KENT, 1999).

As soluções concentradas de Mab foram purificadas com coluna comercial de proteína-A (SIGMA, PURE1A – 1KT), que possibilita a purificação de IgG. As eluições obtidas após purificação foram

quantificadas pelo teste de Bradford (BRADFORD, 1976). Após a purificação, dialisou-se novamente os MAb's em solução borato 0,2 mM, pH 9. A reatividade dos anticorpos concentrados e purificados foi verificada em todas as etapas de processamento, pelo teste de Imunofluorescência Indireta (DIAZ *et al.*, 1994)

5.4 Conjugação com ouro coloidal

A definição da quantidade ideal de imunoglobulinas a ser utilizada na conjugação com ouro coloidal foi realizada através de método presuntivo, descrito por OLIVER *et al.*, 1999. Misturas contendo 10 µl de diluições seriadas da amostra de anticorpos, 100 µl de suspensão de ouro coloidal (*Gold Colloid solution*, de 10nm e 20 nm e ~0.75A520 units/ml - SIGMA) e 10µl de solução NaCl 1M, incubadas por 15 minutos a 37° C, foram avaliadas colorimetricamente, com medidas de densidade ótica nos comprimentos de onda 540nm e 620nm. A partir da sobreposição dos valores de densidade ótica criou-se um gráfico, pelo qual foi definida a quantidade ideal de proteína a ser conjugada (diluição imediatamente anterior aquela que atinge o *plateau*, adicionada de mais 10%).

Nas conjugações foram adicionados em banho de gelo, gota a gota, 100µl da quantidade ideal de MAb's, pH 9, a 1000µl de ouro coloidal, pH 9,5, sob agitação por 15 min. Deixou-se a mistura em repouso por 1 hora na geladeira, com adição de 25µl de soro albumina bovina (BSA) a 10%, seguido de um novo período de 15 minutos sob agitação. As amostras foram então submetidas a centrifugação a 8000g, por 1 hora a 4° C. Ao final descartou-se o sobrenadante delicadamente, e ao fino precipitado, foram adicionados 50µl de PBS/1%BSA/0,02% Azida Sódica. Os MAB's conjugados foram testados para confirmar a manutenção da reatividade ao vírus CVS-11, pelo teste de imunofluorescência indireta (DIAZ *et al.*, 1994).

5.5 Padronização e montagem dos *strips*

A padronização do método para a montagem dos *strips* foi feita avaliando-se as melhores condições de tamanhos e tipos de material (tiras de celulose, membranas de nitrocelulose e fibras de vidro), através da literatura consultada. O material que apresenta uma maior

variabilidade de produtos comerciais é a membrana de nitrocelulose, que apresenta diversos valores de porosidade e de tamanho de distribuição dos poros. Estas variações influenciam na velocidade do fluxo capilar sobre as membranas, que pode variar de 75 à 240 seg/4cm (do mais rápido e menos sensível para o menos rápido e mais sensível). A membrana escolhida foi a com velocidade de fluxo capilar de 135 seg/4 cm, por estar no meio entre rapidez e sensibilidade.

Foram avaliadas experimentalmente as posição de cada componente do teste (conjugado, da linha de teste e linha controle, com base nas descrições de PAEK (2000).

Para preparação dos suportes do conjugado (fibra de vidro - *Glass Fiber Conjugate Pad* (GFCP001000); 0,43 mm de espessura) foram cortados pedaços de 0,5 cm X 0,5 cm, conforme a figura 4, e adicionados 5µl do MAb conjugado com ouro coloidal. A secagem foi realizada à temperatura ambiente por 30 minutos. As membranas de nitrocelulose, antes de serem empregadas na montagem da tira de teste, passaram por processos de fixação dos anticorpos reagentes e pré-hidratação.

Inicialmente, para se obter alguma forma de reação observável, foram utilizados diversos desenhos do teste, com variações na: i) amostra de fluxo (que mimetiza a futura amostra biológica a ser testada), ii) conjugado utilizado e iii) amostra fixada no ponto de teste, conforme descrito na Tabela 3. Com marcação para se saber o sentido do fluxo da reação, aplicou-se 1µl de das variantes de amostras fixadas num ponto distante 1,5cm do início da tira e 1µl (2µg) de anticorpo anti-Fc de Ig camundongo, como controle positivo (SIGMA, 107k4851) a 0,5cm de distância do ponto anterior. Esperou-se a secagem dos pontos e bloqueou-se a membrana com PBS/5% BSA por 30 min. Após o bloqueio as tiras foram secadas em estufa a 37° C por 20 min.

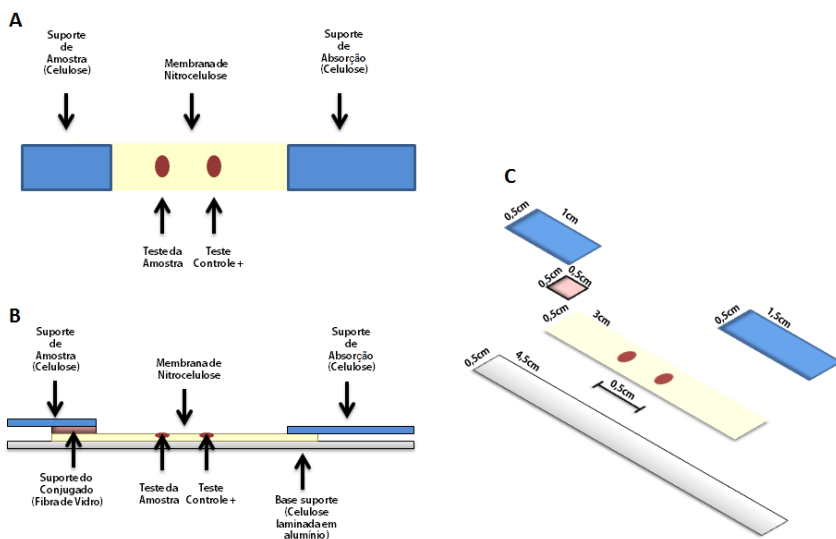


Figura 4: Esquema ilustrativo indicando a posição de cada componente do *strip*, assim como os materiais que estes são feitos e suas dimensões.

A montagem das tiras foi feita usando a base de celulose laminada com alumínio (MILLIPORE, USA) como suporte, sobre a qual foi colada, a 0,5cm do início da base, a membrana de nitrocelulose tratada, como descrito anteriormente. Nos primeiros 0,5cm da membrana de nitrocelulose, apoiou-se uma fibra de vidro já carregada com o conjugado, a qual foi pressionada pela membrana de celulose. Com esse esquema montado, envolveu-se a porção do suporte do conjugado com plástico adesivo (tipo papel *contact*) de 0,5cm de largura (mesma dimensão da fibra de vidro e parte da membrana) de forma que os componentes (membrana de celulose, fibra de vidro, membrana de nitrocelulose e base de suporte) ficassem bem unidos. No limite final entre a membrana de nitrocelulose e o suporte metálico apoiou-se outro pedaço de membrana de celulose, que auxilia na absorção da amostra.

6. Resultados e Discussão

6.1 Seleção dos Mabs

A escolha dos três MAb's utilizados no presente trabalho

(LIA02, 8D11 e 2A5) foi feita levando-se em consideração os seguintes aspectos: reatividade aos diferentes isolados virais, reatividade aos diferentes vírus vacinais, reatividade à glicoproteína, capacidade de neutralização, além de características de cultivo, como capacidade de multiplicação e secreção de imunoglobulinas (dados não mostrados).

6.2 Concentração e purificação dos Mabs

A precipitação dos sobrenadantes de cultura de hibridomas com sulfato de amônia gera grande quantidade grande de proteínas não relacionadas no precipitado, o que inviabiliza a quantificação pelo método de Bradford.

Assim, após a concentração com sulfato de amônia, foi necessário submeter os Mabs a uma purificação em coluna cromatográfica de afinidade (proteína A), resultando em concentrações máximas de 0.52 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ para o LIA02, 0.22 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ para o 2A5 e 0.18 $\mu\text{g}/\mu$ para o 8D11.

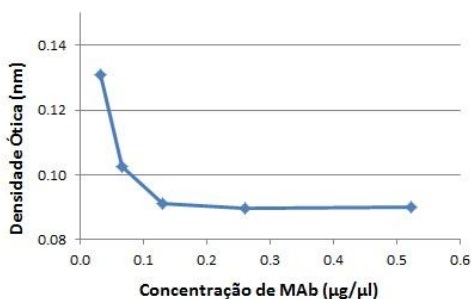
Como tentativa de se produzirem maiores quantidades de Mabs em cultura, foram utilizadas garrafas *Cell line* (B&D, USA) para cultivo dos MABs LIA02 e 8D11. Apesar de apresentaram uma maior concentração de anticorpos após a coleta de seus sobrenadantes (avaliada por ELISA) e formarem os maiores precipitados quando concentrados com sulfato de amônia, houve perda consideravelmente maior das imunoglobulinas no processo de purificação em coluna de proteína A (resultados não mostrados). Dado o elevado preço das garrafas, concluiu-se que nesta situação específica não houve uma boa relação custo X benefício.

6.3 Determinação da quantidade ideal de MABs para a conjugação com ouro coloidal

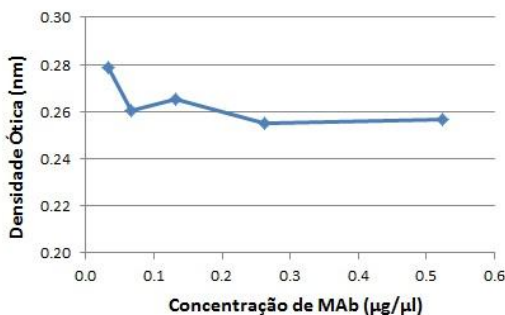
Sabe-se que a quantidade ideal de Mab utilizado para conjugação deve ser determinada pois isso é crítico para produção de conjugados de boa qualidade. Seguindo-se os procedimentos para a estimativa da quantidade de MAB necessária para a conjugação com ouro coloidal, como descrito no item 5.3, foi possível notar uma variação da coloração dependente da concentração. Em concentrações maiores, o ouro coloidal apresentava coloração avermelhada e nas

maiores diluições a coloração passava para tons de azul escuro. Assim, determinou-se que seria utilizada a concentração de Mab que no teste fosse a última diluição antes da mudança de coloração, acrescida de 10%, conforme descrito por HORISBERGER (1989). Baseado nas figuras 5C, 6C e 7C, determinou-se que as concentrações para posterior conjugação seriam de 14,3 $\mu\text{g/ml}$ para o MAb LIA02, 10 $\mu\text{g/ml}$ do MAb 2A5 e 5 $\mu\text{g/ml}$ do MAb 8D11.

a)



b)



c)

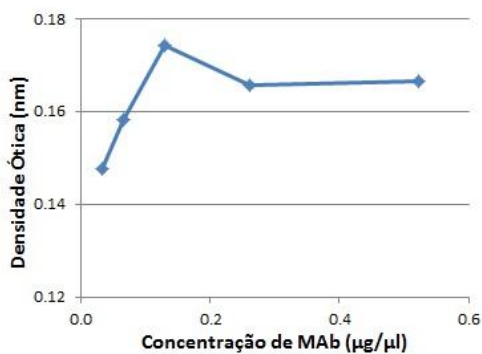
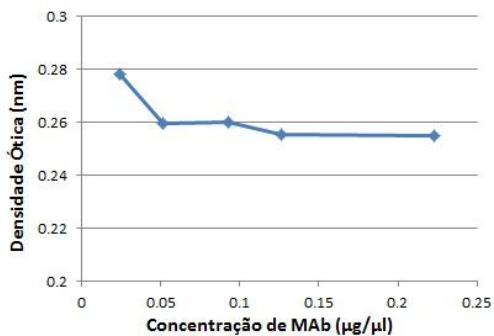
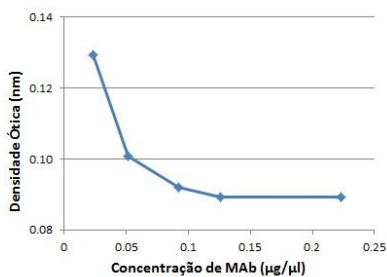


Figura 5: Valores de densidade óptica obtida com a conjugação de diferentes concentrações de MAb LIA02 ao ouro coloidal. a) leitura espectrofotométrica a 540nm; b) leitura espectrofotométrica a 620nm; c) Diferença entre os valores apresentados em a e b.

a)



b)



c)

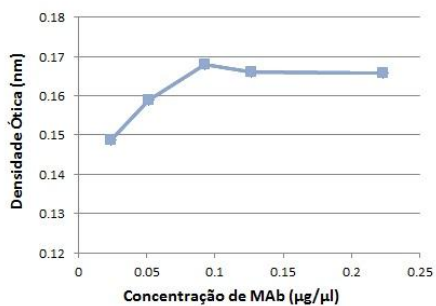
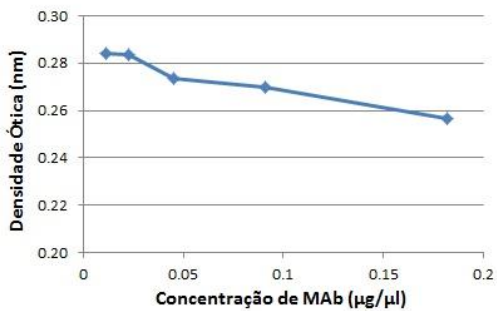


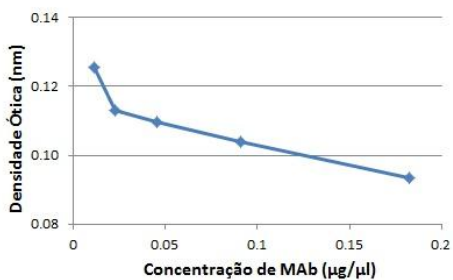
Figura 6: Valores de densidade óptica obtida com a conjugação de diferentes concentrações de MAb 2A5 ao ouro coloidal. a) leitura espectrofotométrica a 540nm; b) leitura espectrofotométrica a 620nm; c)

Diferença entre os valores apresentados em a e b.

a)



b)



c)

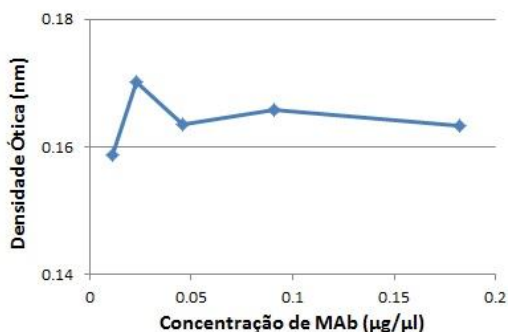


Figura 7 Valores de densidade óptica obtida com a conjugação de diferentes concentrações de MAb 8D11 ao ouro coloidal. a) leitura espectrofotométrica a 540nm; b) leitura espectrofotométrica a 620nm; c) Diferença entre os valores apresentados em a e b.

6.3 Verificação da eficácia dos conjugados produzidos

Com os anticorpos conjugados com ouro coloidal disponíveis, a próxima etapa foi confirmar a efetividade destes. Para isso diversos sistemas foram testados, conforme esquemas apresentados na Tabela 3. Os conjugados produzidos com os MAb LIA02, 2A5 e 8D11 foram utilizados em *strip tests* tendo como amostras (mimetizando amostras biológicas infectadas com vírus rábico) contendo suspensão de vírus infectantes (CVS-11), diferentes formulações de vacinas, lisado de células infectadas e não infectadas e PBS. Como detectores no ponto teste, foram imobilizados os MAb LIA02, 2A5 e 8D11, diferentes formulações de vacinas, amostras de vírus em sobrenadantes de cultura e de lisados de células infectadas. Embora todos os conjugados produzidos tenham mantido sua capacidade de se ligar ao vírus rábico,

quando testados por IFI (dados não mostrados), no *strip test*, resultados positivos só foram observados quando o sistema foi montado com amostra de fluxo sendo o PBS e com sobrenadante de lisado de células infectadas, independentemente do Mab utilizado como conjugado, conforme destacado em amarelo na Tab.3:

Tabela 3: Lista dos esquemas de testes realizados para a avaliação do melhor sistema de tiras capaz de detectar o vírus rábico.

Mab Conjugado	Amostra de fluxo	Imobilizado no ponto de teste	Resultado do Teste
LIA02	Vírus Cepa CVS-11	LIA02 Purificado (5x 1µl com 0,52µg)	-
LIA02	Vírus Cepa CVS-11	LIA02 Precipitado (5x 1µl)	-
LIA02	Vírus Cepa CVS-11	2A5 Purificado (5x 1µl com 0,22µg)	-
LIA02	Vírus Cepa CVS-11	2A5 Precipitado (5x 1µl)	-
LIA02	Vírus Cepa CVS-11	8D11 Purificado (5x 1µl com 0,18µg)	-
LIA02	Vírus Cepa CVS-11	8D11 Precipitado (5x 1µl)	-
LIA02	Vacina de Referência	LIA02 Purificado (5x 1µl com 0,52µg)	-
LIA02	Vacina 1	LIA02 Precipitado (5x 1µl)	-
LIA02	Vacina 2	2A5 Purificado (5x 1µl com 0,22µg)	-
LIA02	Vacina 3	2A5 Precipitado (5x 1µl)	-
LIA02	Vacina 4	8D11 Purificado (5x 1µl com 0,18µg)	-
LIA02	Vacina 5	8D11 Precipitado (5x 1µl)	-
LIA02	PBS	Vacina 1	-

LIA02	PBS	Vacina 2	-
LIA02	PBS	Vacina 3	-
LIA02	PBS	Vacina 4	-
LIA02	PBS	Vacina 5	-
LIA02	PBS	Vírus Ceba CVS-11 (5x 1µl)	-
LIA02	PBS	Vírus Ceba CVS/10% Triton-X (5x 1µl)	(muito fraco)
LIA02	PBS	Vírus Ceba CVS-11/ 20% Triton-X (5x 1µ))	(muito fraco)
LIA02	PBS	Lisado de Células BHK-21 Infectadas com CVS-11	+
LIA02	Lisado de Células BHK-21 Infectadas com CVS-11	2A5 Purificado (5x 1µl com 0,22µg)	-
LIA03	PBS	Lisado de Células BHK-21 não Infectadas	-
LIA02	Vírus Ceba CVS-11 (2500 FFU/ml)/10% Triton-X (FFU (5x 1µl))	2A5 Purificado (5x 1µl com 0,22µg)	-
LIA02	Vírus Ceba CVS-11 (2500 FFU/ml)/20% Triton-X (FFU (5x 1µl))	2A5 Purificado (5x 1µl com 0,22µg)	-
2A5	Vírus Ceba CVS-11 (2500 FFU/ml)-11 (2500 FFU/ml)	LIA02 Purificado (5x 1µl com 0,52µg)	-
2A5	Vírus Ceba CVS-11	LIA02 Precipitado (5x 1µl)	-
2A5	Vírus Ceba CVS-11	2A5 Purificado (5x 1µl com 0,22µg)	-
2A5	Vírus Ceba CVS-11	2A5 Precipitado (5x	-

		1µl)	
2A5	Vírus Cepa CVS-11	8D11 Purificado (5x 1µl com 0,18µg)	-
2A5	Vírus Cepa CVS-11	8D11 Precipitado (5x 1µl)	-
2A5	Vacina de Referência	LIA02 Purificado (5x 1µl com 0,52µg)	-
2A5	Vacina 1	LIA02 Precipitado (5x 1µl)	-
2A5	Vacina 2	2A5 Purificado (5x 1µl com 0,22µg)	-
2A5	Vacina 3	2A5 Precipitado (5x 1µl)	-
2A5	Vacina 4	8D11 Purificado (5x 1µl com 0,18µg)	-
2A5	Vacina 5	8D11 Precipitado (5x 1µl)	-
2A5	PBS	Vacina 1	-
2A5	PBS	Vacina 2	-
2A5	PBS	Vacina 3	-
2A5	PBS	Vacina 4	-
2A5	PBS	Vacina 5	-
2A5	PBS	Vírus Cepa CVS-11 (5x 1µl)	-
2A5	PBS	Vírus Cepa CVS/10% Triton-X (5x 1µl)	-
2A5	PBS	Vírus Cepa CVS/20% Triton-X (5x 1µl)	-
2A5	PBS	Lisado de Células BHK-21 Infectadas	+
2A5	PBS	Lisado de Células BHK-21 não Infectadas	-
2A5	Lisado de Células BHK-21 Infectadas	LIA02 Purificado (5x 1µl com 0,52µg)	-

com CVS-11			
2A5	Vírus Cepa CVS/10% Triton-X (5x 1µl)	LIA02 Purificado (5x 1µl com 0,52µg)	-
2A5	Vírus Cepa CVS/20% Triton-X (5x 1µl)	LIA02 Purificado (5x 1µl com 0,52µg)	-
8D11	Vírus Cepa CVS-11	LIA02 Purificado (5x 1µl com 0,52µg)	-
8D11	Vírus Cepa CVS-11	LIA02 Precipitado (5x 1µl)	-
8D11	Vírus Cepa CVS-11	2A5 Purificado (5x 1µl com 0,22µg)	-
8D11	Vírus Cepa CVS-11	2A5 Precipitado (5x 1µl)	-
8D11	Vírus Cepa CVS-11	8D11 Purificado (5x 1µl com 0,18µg)	-
8D11	Vírus Cepa CVS-11	8D11 Precipitado (5x 1µl)	-
8D11	Vacina de Referência	LIA02 Purificado (5x 1µl com 0,52µg)	-
8D11	Vacina 1	LIA02 Precipitado (5x 1µl)	-
8D11	Vacina 2	2A5 Purificado (5x 1µl com 0,22µg)	-
8D11	Vacina 3	2A5 Precipitado (5x 1µl)	-
8D11	Vacina 4	8D11 Purificado (5x 1µl com 0,18µg)	-
8D11	Vacina 5	8D11 Precipitado (5x 1µl)	-
8D11	PBS	Vacina 1	-
8D11	PBS	Vacina 2	-
8D11	PBS	Vacina 3	-
8D11	PBS	Vacina 4	-
8D11	PBS	Vacina 5	-

8D11	PBS	Vírus Cepa CVS-11 (5x 1µl)	-
8D11	PBS	Vírus Cepa CVS/10% Triton-X (5x 1µl)	-
8D11	PBS	Vírus Cepa CVS/20% Triton-X (5x 1µl)	-
8D11	PBS	Lisado de Células BHK-21 Infectadas	+
8D11	PBS	Lisado de Células BHK-21 não Infectadas	-
8D11	Vírus Cepa CVS/10% Triton-X (5x 1µl)	LIA02 Purificado (5x 1µl com 0,52µg)	-
8D11	Vírus Cepa CVS/20% Triton-X (5x 1µl)	LIA02 Purificado (5x 1µl com 0,52µg)	-

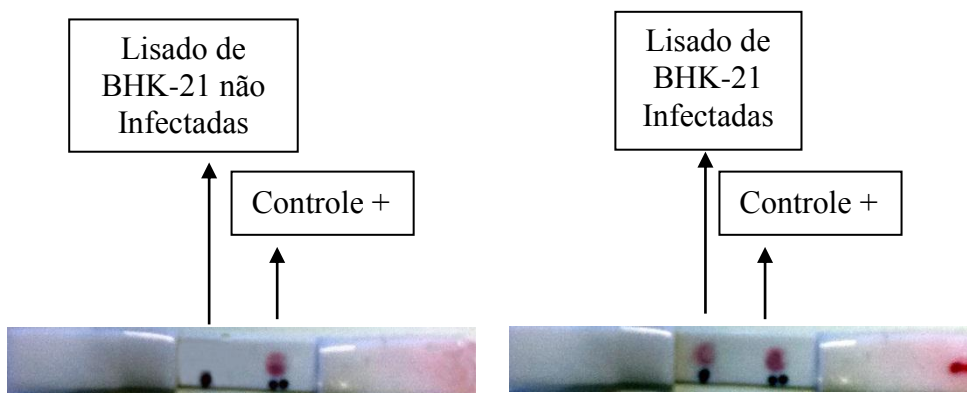


Figura 9: Imagem de um *strip test* contendo LIA02 conjugado com ouro coloidal, PBS como amostra de fluxo e lisado de células BHK-21 infectadas (b) e não infectadas

com vírus rábico (a) fixadas à membrana de nitrocelulose.

Estudo anterior (NISHIZONO *et al.*, 2010) demonstrou a possibilidade da construção de um teste imunocromatográfico, *strip test*, no qual utilizaram-se anticorpos anti-proteína N do vírus rábico, específicas para epítomos diferentes, os quais um foi conjugado com ouro coloidal e o outro imobilizado na membrana de nitrocelulose. O teste mostrou-se eficaz, revelando positividade em fluxos de suspensões de cérebros de camundongos infectados tratadas com 10% de Triton-X. Neste caso, o teste pode trazer vantagens de forma a diminuir o custo dos testes diagnósticos de raiva comumente utilizados, os quais dependem de anticorpos conjugados comerciais muito caros. A aplicabilidade, porém, continuaria sendo baixa, devido a necessidade de mão de obra especializada para a realização dos procedimentos de suspensão cerebral 20%, assim como o sacrifício e remoção do cérebro dos animais suspeitos. O trabalho indicou inclusive a possibilidade de novos estudos que avaliem a presença do vírus na saliva de animais infectados.

No presente trabalho, por outro lado, o foco inicial era a construção de um teste que utilizasse a saliva de animais infectados como a principal fonte de amostra a ser testada. Diferentemente de outros trabalhos realizados com *strip tests*, ao invés de linhas de teste e de controle foram empregados pontos, devido à praticidade de aplicação. Inicialmente, na padronização do teste, foram utilizados fluxos de sobrenadantes de cultura de células BHK-21 infectadas.. Essa primeira tentativa não trouxe resultados satisfatórios, embora isso não se devesse à problemas na fabricação dos conjugados, uma vez que o controle positivo sempre funcionou.

Tentou-se então verificar a reatividade do conjugado aplicando-se diferentes vacinas, tanto fixadas à membrana quanto em fluxo. Os resultados, porém, foram insatisfatórios, possivelmente devido à baixa concentração de antígenos virais nas vacinas.

Considerando que os MAbs LIA02 e 2A5 provavelmente são contra antígenos internos do vírus (já que não apresentam reatividade à glicoproteína, tão pouco efeito neutralizante), tentou-se desenhar um ensaio onde o sobrenadante do vírus CVS-11 foi tratado com Triton-X (10% e 20%), da mesma forma utilizada por NISHIZONO em amostras

de cérebros infectados. No ensaio em que as amostras de vírus tratados foram fixadas, os resultados foram quase que na totalidade negativos, com exceção dos que tinham o LIA02 como conjugado, que demonstrou-se muito fracamente positivo.

Defrontando-se com resultados negativos com os conjugados produzidos com os anticorpos LIA02 e 2A5, acreditou-se que a ineficácia destes seria devido a concentração dos anticorpos de captura no ponto de teste, a concentração de antígeno nos fluxos ou concentração de antígenos virais nos pontos de fixação (no caso do LIA02 e 2A5 os antígenos reconhecidos são internos ao vírus). Acreditou-se, então, que um novo conjugado produzido com anticorpos reativos à glicoproteína viral (8D11) seria capaz de reagir com amostras de vírus com uma maior eficiência, o que de fato também não aconteceu.

O ensaio que demonstrou ter a melhor reatividade, apresentando uma alta capacidade dos conjugados produzidos de indicar a presença de antígeno, foi o realizado com lisado de células BHK-21, com 72 horas de infecção com vírus CVS-11. Este lisado fixado à membrana de nitrocelulose permitiu um maior acúmulo de anticorpos conjugados neste ponto (Figura 9b), o que se repetiu com qualquer dos conjugados produzidos. Porém, quando a mesma amostra de lisado foi utilizada como o agente do fluxo em ensaios nos quais anticorpos purificados foram fixados no ponto teste (mimetizando as condições nas quais o *strip test* seria utilizado), também não houve positividade. Estes resultados podem ser decorrentes da baixa concentração dos anticorpos purificados ou das características da membrana de nitrocelulose utilizada.

De qualquer maneira, um sistema de ensaio imunocromatográfico pôde ser construído, preparando o componente principal do *strip test*: o anticorpo de detecção marcado com um gerador de sinal, além da otimização dos tampões e componentes químicos e físicos. Notou-se a preservação das condições de reatividade das imunoglobulinas conjugadas, na presença de estabilizadores (BSA), sendo viável no período de pelo menos 1 mês após a sua produção (dados não mostrados).

De acordo com CDC (2011), o melhor diagnóstico para a detecção do vírus ainda é o ensaio direto de fluorescência (DFA) e que no momento ainda não existe nenhum *kit* de teste rápido comercialmente

autorizado, devida a baixa especificidade e sensibilidade destes, além de levantarem questionamentos sobre a utilidade sobre um teste que detecta a presença de vírus rábico na saliva de animais infectados, já que pode haver grande variação da quantidade de vírus nesta, que a excreção de partículas virais na saliva é intermitente e que o comportamento de excreção é diferente, e muitas vezes nem conhecida, para diferentes animais. Afirmam, ainda, que estes testes precisariam ser validados através de extensas comparações de sensibilidade e especificidade com o teste de imunofluorescência direta, para que haja segurança na sua indicação.

Outros testes alternativos como o de aglutinação em látex e o teste rápido de imuno-histoquímica direta (FAT)- (LEMBO *et al.*, 2006) - também têm sido desenvolvidos para detecção de amostras de vírus rábico. No entanto, estas técnicas também ainda não são amplamente aceitas como método de diagnóstico e não são substitutas para o teste de padrão ouro – o da imunofluorescência direta.

Ressalta-se, por fim, que dados de vigilância são as informações mais importantes para a avaliação, controle e eliminação da raiva em áreas endêmicas. O custo e a necessidade de pessoal bem treinado são obstáculos à disponibilidade de laboratórios em tais áreas. Portanto, um meio rápido, preciso e de baixo custo do diagnóstico laboratorial é necessário e desejável, a fim de fazer um diagnóstico de casos suspeitos no local, especialmente para o diagnóstico *intra vitam* de animais raivosos.

Com relação aos resultados de testes alternativos, falsos negativos têm consequências mais graves do que falsos positivos, pois o diagnóstico errôneo pode ter consequências fatais para indivíduos expostos ao vírus rábico.

Conclusão

O presente trabalho de conclusão de curso resultou na marcação de três anticorpos monoclonais anti-rábicos anteriormente produzidos pelo grupo LIA-UFSC com partículas de ouro coloidal. Os conjugados obtidos mantiveram sua especificidade ao vírus rábico em análises de imunofluorescência indireta e mostraram-se empregáveis em testes imunocromatográficos, identificando amostras virais produzidas em células BHK-21 infectadas com a cepa CVS-11. A construção de um

strip test detector de vírus rábicos em amostras biológicas poderá ser explorada mais detalhadamente utilizando-se os conjugados produzidos. A detecção de vírus rábico em amostras de saliva possivelmente não seria viável, devido as características da doença e efemeridade do vírus neste fluido. O teste poderia, por outro lado, contribuir com a diminuição de tempo e dinheiro dispendidos em análises de amostras de sistema nervoso central onde a concentração de vírus é garantida.

Perspectivas

- Testar os conjugados produzidos em sistemas de *strip tests* que utilizem antígenos e anticorpos altamente concentrados;
- Experimentar a fixação dos MAbs em membranas de nitrocelulose de diferentes valores de porosidade;
- Utilizar outros MAbs disponíveis no LIA-UFSC para a fixação no ponto teste;
- Experimentar um *strip test* funcional em amostras de saliva de e SNC de animais infectados;
- Comparar a sensibilidade do *strip test* com outros testes diagnósticos, como a imunofluorescência indireta.

7. Referências

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H. **Cellular and molecular immunology**. 5. ed. Philadelphia: W.B. Saunders Company, 2003.

BRADBURY, A.R.M; MARKS, J.D. Antibodies from phage antibody libraries. **Journal of immunological methods**. V. 290, p. 29–49, 2004.

BADRANE, H; BAHLOUL, C; PERRIN, P; TORDO, N. Evidence of two lyssavirus phylogroups with distinct pathogenicity and immunogenicity. **Journal of virology**. p. 3268-3276, 2001.

BAKKER, A. B. H; MARISSSEN, W. E; KRAMER, R. A; RICE, A. B; WELDON, W. C; NIEZGODA, M; HANLON, C. A; THIJSSSE, S; BACKUS, H. H. J; KRUIF, de J; DIETZSCHOLD, B; RUPPRECHT, C. E; GOUDSMIT, J. Novel human monoclonal antibody combination effectively neutralizing natural rabies virus variants and individual in

vitro escape mutants analysis. **Journal of virology**. V. 79, p. 9062–9068, 2005.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Mapas da Raiva no Brasil - Dados Parciais.** Disponível em <
http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/area.cfm?id_area=1567>. Acesso em 09 de novembro de 2010.

Botivinkin, A.D; Poleschuk, E.M; Kuzmin, I.V; Borisova, T.I; Gazaryan, S.V; Yager, P; Rupprecht, C.E. Novel lyssaviruses isolated from bats in russia. **Emergent infectious diseases**. V. 9, p. 1623–1625, 2003.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL (CDC). Investigation of rabies infections in organ donor and transplant recipients – Alabama, Arkansas, Oklahoma, and Texas, **Morb. Mort. Wkly**. V. 53, P. 1-3., 1999.

DAVIES, M. C.; ENGLERT, M. E.; SHARPLESS, G. R.; CABASSO, V. J. The electron microscopy of rabies virus in cultures of chicken embryo tissues. **Virology**. V. 21, p. 642-651, 1963.

DIAZ, A.M., et al. Antigenic analysis of rabies virus isolates from Latin America and the Caribbean. **Journal of veterinary medicine**. V. 41, p. 153-160, 1994.

FABET, M.; PULMANAUSAHAKUL, R.; HODAWADEKAR, S.S.; SPITSIN, S.; MCGETTIGAN, J.P.; SCHNELL, M.J.; DIETZSCHOLD, B.; Overexpression of the rabies virus glycoprotein results in enhancement of apoptosis and antiviral immune response. **Journal of Virology**. V. 76, P. 3374-81, 2004.

GUPTA, P. K; SHARMA, S; WALUNJ, S. S; CHATURVEDI, V. K; RAUT, A. A; PATIAL, S; RAI, A; PANDEY, K.D; SAINI, M. Immunogenic and antigenic properties of recombinant soluble glycoprotein of rabies virus. **Veterinary Microbiology**. V. 108, p. 207-214, 2005.

KAPLAN, M.M; WIKTOR, T.J; KOPROWSKI, H. Pathogenesis of

rabies in immunodeficient mice. **Journal of Immunology**, V. 114, p. 1761-65, 1975.

KENT, U. M. Purification of Antibodies Using Ammonium Sulfate Fractionation or Gel Filtration. **Methods in Molecular Biology**. V. 115, p. 11-18, 1999.

KOTAIT, I; CARRIERI, M. L; TAKAOKA, N. Y. Raiva – Aspectos gerais e clínica. **Manual Técnico do Instituto Pasteur**. N.8, p. 1-34, 2009.

HUGHES, G.J; ORCUARI, L.A; RUPPRECHT, C.E. Evolutionary timescale of rabies virus adaptation to North American bats inferred from the substitution rate of the nucleoprotein gene. **Journal of general virology**. V. 86, p. 1467–1474, 2005.

KÖHLER, G.; MILSTEIN, C. Continuous culture of fused cells secreting antibody of predefined specificity. **Nature**. V. 256, p. 495-497, 1975.

LEE, Eun Young. Development of a rapid, immunochromatographic strip test for serum asialo α -1-acid glycoprotein in patients with hepatic disease. **Journal of Immunological Methods**. V. 308, p. 116– 123, 2006.

LENTZ, T.L; BURRAGE, T.G; SMITH, A.L. *et al.* Is the acetylcholine receptor a rabies virus receptor?. **Science**. V. 215, P. 182-184, 1982.

MARQUES, J. M. B. Epidemiologia e importância sócio-econômica da raiva dos herbívoros no litoral norte catarinense. 2000. 62 f. **Monografia** (Especialização em Saúde Animal) - Universidade do Estado de Santa Catarina, Joinville, 2000.

MAZARAKIS, N.D; AZZOUZ M.; ROHELL J.B. Rabies virus glycoprotein pseudotyping of lentiviral vectors enables retrograde axonal transport and access to the nervous system after peripheral delivery. **Hum. Mol. Genet**. V. 10, P. 2109-21, 2001.

NIGG, A. J; WALKER, P. L. Overview, prevention and treatment of rabies. **Pharmacotherapy**. V. 10, p. 1182-1195, 2009.

OLIVEIRA, Rafael de Novaes *et al.* Rabies virus in insectivorous bats: Implications of the diversity of the nucleoprotein and glycoprotein genes for molecular epidemiology. **Virology**. V. 405, p. 352–360, 2010.

OLIVER, C. Conjugation of Colloidal Gold to Proteins. **Methods in molecular biology**. V. 115, p. 331-334, 1999.

PAEK, Se-Hwan. Development of Rapid One-Step Immunochromatographic Assay. **Methods**. V. 22, p. 53-60, 2000.

ROTIVEL, Y; GOLDAL, M; PERRIN, P; TORDO, N. Une historie de La vaccination contre la rage. **Virologie**. V. 6, p. 89-104, 2002.

RUPPRECHT, C.E; HANLON, C.A; HEMACHUDHA, T. Rabies re-examined. **Lancet infectious diseases**. V.2, p. 327–343, 2002.

TORDO, N; DE HAAN, P; GOLDBACH, R; POCH, O. Evolution of negative-stranded RNA genomes. **Seminars in virology**. V. 3, p. 341-357, 1992.

TORDO, N. Characteristics and molecular biology of the rabies virus. In: MESLIN, F.X.; KAPLAN, M.M.; KOPROWSKI, H. **Laboratory techniques in rabies**, 4^a ed. World Health Organization, Geneva, p. 28-51, 1996.

TSIANG, H. Evidence for an intraaxonal transport of fixed and street rabies virus. **Journal of Neuropathology Exp. Neurol**. V. 38, P. 286–296, 1979.

WARRELL, M.J; WARRELL, D.A. Rabies and other lyssaviruses disease. **Lancet**, V. 363, p. 959-969, 2004.

WILKINSON, J. The Development off the virus concept as reflected in corpora of studies on idividual pathogens. **Medical History**, 21^a ed, p. 15-31, 1977.

WIKTOR, T.J; KOPROWSKI, H. Monoclonal antibodies against rabies virus produced by somatic cell hybridization: detection of antigenic variants. **Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America**, V. 75, n. 8, p. 3938-3942, 1978.

WINKLER, W.G; FASHINELL, T.R; LEFFINGWELL L.; HOWARD P.; CONOMY J.P; Airborne rabies transmission in a laboratory worker. **Journal of the American Medical Association**, V. 226, p. 1219-21, 1973.

WHO[a]. World Health Organization, 2010. **Rabies Incidence**. Disponível em: <<http://www.who.int/rabies/en>> Acesso em: 30 de setembro de 2010.

WHO[b]. **WHO consultation on a rabies monoclonal antibody cocktail for rabies post exposure treatment**. Disponível em <http://www.who.int/rabies/vaccines/en/mabs_final_report.pdf>. Acesso em 30 de setembro de 2010.

WUNNER, W. H. Rabies virus. In: JACKSON, A. C; WUNNER, W. H. Rabies, **Academic Press**, San Diego, p. 23-61, 2002.

WUNNER, W. H. Rabies in the 21st Century – A global challenge. **Vaccine**. V. 27, p. 7139-7218, 2010.

ZANLUCA, C; AIRES, L. R. P.; MUELLER, P; SANTOS, V; CARRIERI, M; PINTO, A.; ZANETTI, C. Novel monoclonal antibodies that bind to wild and fixed rabies virus strains. **Journal of Virological Methods**, V. 175, p. 66-73, 2011.