



“Picobirnavírus: pesquisa de novos hospedeiros animais, identificação através de ensaio de *dot-blot* e métodos de purificação”

ISMAR ROCHA HAGA

Orientadora: Profa. Dra. Maria Silvia Viccari Gatti

Dissertação apresentada ao Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas, na Área de Microbiologia.

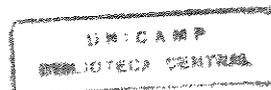
9904077

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida pelo(a) candidato a) Ismar Rocha Haga e aprovada por a) Prof. Dra. Maria Silvia Viccari Gatti em 30/11/98

**CAMPINAS - SP
1998**

H12p

36500/BC



UNIDADE	BC
N.º CHAMADA:	
V.	Ex.
TOMBO BC/	36500
PROC.	229/99
C	<input type="checkbox"/>
D	<input checked="" type="checkbox"/>
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	05/02/99
N.º CPD	

CM-00121920-9

FICHA CATALOGRAFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA - UNICAMP

Haga, Ismar Rocha

H12p Picobirnavírus: pesquisa de novos hospedeiros animais, identificação através de ensaio de *dot-blot* e métodos de purificação /Ismar Rocha Haga. -- Campinas, SP:[s.n.], 1998.
90f.:ilus.

Orientador: Maria Silvia Viccari Gatti

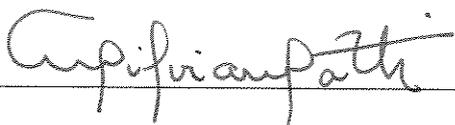
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Campinas.
Instituto de Biologia.

1. Vírus. 2. Ensaio imunoenzimático. 3. Purificação. I. Gatti, Maria Silvia Viccari . II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

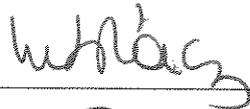
Campinas, 30 de Novembro de 1998

MEMBROS TITULARES

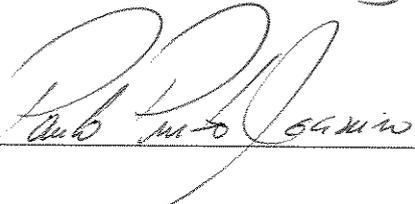
Profa. Dra. Maria Silvia Viccari Gatti
(orientadora)



Profa. Dra. Maria Lúcia Barbosa de Oliveira Rác



Prof. Dr. Paulo Pinto Joazeiro



MEMBRO SUPLENTE

Profa. Dra. Hatune Tanaka

Este trabalho foi desenvolvido no Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) e contou com o apoio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), processo 95/2010-3.

If one advances confidently in the direction of his dreams,
and endeavors to live the life that he has imagined,
he will meet with a success unexpected in common hours.

Henry David Thoreau

Me, my thoughts are flower strewn
ocean storm, bayberry moon.
I have got to leave to find my way.
Watch the road and memorize
this life that pass before my eyes.

(...)

There's no one left to take the lead,
but I tell you and you can see
we're closer now than light years to go.

Find the River

R.E.M.

Nosso presente não é o tempo absoluto.

Ephraim Medeiros

Aos meus pais, Issao e Marilce, e à minha irmã, Marilane,
por tudo.

AGRADECIMENTOS

-Aos amigos da turma do ano de 1991 do curso de Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP)

-Aos amigos do laboratório de Virologia:

Ângela Bonifácio Barbosa de Oliveira
Daniel Roberto Coradi de Freitas
Fabiana Estelles
Fernando Vicentini
Frank Jefferson Alarcón de Barrientos
Jonas Francisco Chnaiderman Figueroa
Márcia Okuda
Patrícia Thomann
Rosimary de Jesus Gomes Turri
Sandra Soares Martins
Silvério Takao Hosomi
Verena Hildegard Gyarfas Wolf
Vivian de Angelis Cerimele

-Aos amigos do Departamento de Microbiologia e Imunologia e Centro de Bioterismo da UNICAMP:

Alessandra Roque Pancetti
Alessandra Silva Coelho
Ana Lúcia Rodrigues da Soledade
Daniele Masseli Rodrigues
Francisco de Assis da Silva
Heloísa Helena Mithie Della Colleta

-Aos amigos distantes:

Ana Cláudia de Freitas Resende
Astrid Bohlen
Bruno César Dias da Silva
Helga Jenny Hrafnadóttir
Henna e Jenny Vantanen
Ilia Golemanov
Jeff O'Connell
Kiimo Ninninen
Paulo Alexandre M. C. Garcia
Riikka Hanninen
Rogério e Rodrigo de Almeida Tárzia
Stephan Stern
Vinícius de Melo Batalha
Zsolt Nagy

-Agradecimentos especiais:

Profa. Dra. Maria Silvia Viccari Gatti

Mirtis Maria Giaciani Ferraz

Rovilson Gilioli

Prof. Dr. Antônio Fernando Pestana de Castro

Profa. Dra. Clarice Weis Arns

Profa. Dra. Dagmar Ruth Stach-Machado

Prof. Dr. Domingos da Silva Leite

Profa. Dra. Lucila Costallat Ricci

Prof. Dr. Tomomasa Yano

Profa. Dra. Wirla Maria S. C. Tamashiro

Profa. Dra. Hatune Tanaka

Prof. Dr. José Paulo Gagliardi Leite

Profa. Dra. Luisa Lina Villa

Profa. Dra. Maria Lúcia Rác

Prof. Dr. Paulo Pinto Joazeiro

Dr. David Edgerton

Dr. Edward Rybicki

Dr. Harry Marks

Dr. Jeff Hughes

Profa. Ana Luiza Zink Degelo

Profa. Ione Motta Braga

Jonas José Kisielius e Marli Ueda

Profa. Dra. Iara Maria Silva de Luca, Marta Beatriz Leonardo e Martha Marques de Almeida

Profa. Dra. Laurecir Gomes

Marcos Ribeiro dos Santos e Pedro Gimenez Gomes

Dr. Carlos Bauer Nemen Lopes

-A todos os professores do Departamento de Microbiologia e Imunologia da UNICAMP

-A todos os funcionários do Departamento de Microbiologia e Imunologia da UNICAMP

-À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)

-Ao Instituto Adolfo Lutz

-Ao Parque Ecológico Cid A. Franco (Americana, SP)

-A todos aqueles que, direta ou indiretamente, colaboraram na execução desta dissertação

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO.....	1
2. OBJETIVOS.....	10
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	11
3.1- Amostras fecais.....	11
3.2- Preparo das suspensões fecais.....	14
3.3- Extração do ácido nucleico viral.....	14
3.4- Detecção do picobirnavírus por eletroforese em gel de poliacrilamida (EGPA).....	15
3.5- Impregnação do gel de poliacrilamida pelo método da prata.....	15
3.5.1- Secagem do gel.....	16
3.6- Concentração do picobirnavírus a partir de suspensões fecais.....	16
3.6.1- Adição de polietilenoglicol e cloreto de sódio.....	16
3.6.2- Ultracentrifugação em colchão de sacarose.....	17
3.6.3- Adição de cloreto de cálcio.....	17
3.7- Purificação do picobirnavírus a partir de suspensões fecais.....	18
3.7.1- Purificação por ultracentrifugação em gradiente de cloreto de cério (CsCl) e cloreto de rubídio (RbCl).....	18
3.7.2- Purificação por ultracentrifugação em gradiente de sacarose.....	18
3.7.3- Purificação por ultracentrifugação em gradiente de tartarato (ácido tartárico, sal dipotássico).....	18
3.8- Microscopia eletrônica.....	20
3.9- Obtenção de antissoros anti-picobirnavírus.....	20
3.10- Ensaio imunoenzimático para determinação do título de anticorpos anti-picobirnavírus.....	21
3.11- Ensaio imunoenzimático do tipo “dot-blot” para detecção de picobirnavírus em fezes de diferentes origens.....	22

4. RESULTADOS.....	24
4.1- Resultados relativos à pesquisa de novos hospedeiros para o picobirnavírus.....	24
4.2- Resultados relativos aos processos de concentração viral.....	27
4.3- Resultados relativos aos processos de purificação viral.....	32
4.4- Resultados relativos a realização do ensaio imunoenzimático do tipo “dot-blot”.....	40
5. DISCUSSÃO.....	43
6. CONCLUSÕES.....	62
7. APÊNDICE.....	63
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	64

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 - Nomes populares e científicos de aves pertencentes ao Parque Ecológico Cid A. Franco, localizado no município de Americana (SP), cujas amostras fecais foram analisadas, em eletroforese em gel de poliacrilamida (EGPA), para presença de picobirnavirus (PBV).....	12
Tabela 2 - Nomes populares e científicos de mamíferos pertencentes ao Parque Ecológico Cid A. Franco, localizado no município de Americana (SP), cujas amostras fecais foram analisadas, em eletroforese em gel de poliacrilamida (EGPA), para presença de picobirnavirus (PBV).....	13
Tabela 3 - Experimentos de concentração e purificação virais realizados a partir de fezes suínas, num total de 70 experimentos.....	28
Tabela 4 - Experimentos de concentração e purificação virais realizados a partir de fezes murinas, num total de 62 experimentos.....	29
Tabela 5 - Experimentos de concentração e purificação virais realizados a partir de fezes de tamanduá-bandeira (<i>Myrmecophaga tridactyla</i>), num total de 14 experimentos.....	30
Tabela 6 - Resultados obtidos, nos testes de “dot-blot” (DOT) e eletroforese em gel de poliacrilamida (EGPA), a partir de 190 amostras fecais de ratos, suínos e tamanduás-bandeira.....	42
Tabela 7 - Resultados obtidos nos testes de “dot-blot” (DOT) e eletroforese em gel de poliacrilamida (EGPA), de acordo com a origem da amostra utilizada.....	42
Tabela 8 - Tabela binária para cálculos de valores de sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo e valor preditivo negativo dos resultados obtidos em teste de “dot-blot” em relação aos obtidos por eletroforese em gel de poliacrilamida (EGPA).....	63

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 - Eletromicrografia de amostra positiva para PBV, obtida após ultracentrifugação em gradiente de cloreto de céσιο (CsCl). Amostra de fezes de tamanduá-bandeira.....	25
Figura 2 - Eletromicrografia de amostra positiva para PBV, obtida após ultracentrifugação em gradiente de cloreto de céσιο (CsCl). Amostra de fezes de tamanduá-bandeira.....	26
Figura 3 - Eletroforese em gel de poliacrilamida (EGPA) de RNAds de picobirnavírus (PBV) obtidos por extração de amostras de suspensões fecais.....	27
Figura 4 - Eletroforese em gel de poliacrilamida (EGPA) de RNAds de picobirnavírus e rotavírus obtidos a partir de ressuspensão do “pellet” obtido por ultracentrifugação em colchão de sacarose a 30% em tampão Tris.....	31
Figura 5 - Valores de densidade obtidos das frações coletadas após ultracentrifugação em gradiente de cloreto de céσιο -CsCl- de amostras de fezes de ratos.....	33
Figura 6 - Eletroforese em gel de poliacrilamida (EGPA) de RNAds de picobirnavírus obtidos a partir de frações coletadas após ultracentrifugação em gradiente de cloreto de céσιο (CsCl) de amostras de fezes de ratos (Séries 47 e 48).....	34
Figura 7 - Valores de densidade obtidos das frações coletadas após ultracentrifugação em gradiente de cloreto de rubídio (RbCl) de amostras de fezes de ratos.....	35
Figura 8 - Eletroforese em gel de poliacrilamida (EGPA) de RNAds de picobirnavírus obtidos a partir de frações coletadas após ultracentrifugação em gradiente de cloreto de rubídio (RbCl) de amostras de fezes suínas (Série 35).....	36

Figura 9 - Eletromicrografia de amostra positiva para PBV, obtida após ultracentrifugação em gradiente de cloreto de rubídio (RbCl). Amostra de fezes de suínos.....	37
Figura 10 - Eletromicrografia de amostra positiva para PBV, obtida após ultracentrifugação em gradiente de cloreto de céσιο (CsCl). Amostra de fezes de suínos.....	38
Figura 11 - Eletromicrografia de amostra positiva para PBV, obtida após ultracentrifugação em gradiente de cloreto de céσιο (CsCl). Amostra de fezes de ratos.....	39
Figura 12 - Resultados, em “dot-blot”, de amostras fecais de diferentes origens, frente a antissoro anti-picobirnavírus.....	41

RESUMO

O picobirnavirus (PBV) é um novo vírus, descritos em fezes de humanos, ratos, suínos, cobaias, aves e coelhos.

No presente trabalho, é relatada a primeira identificação, através de eletroforese em gel de poliacrilamida (EGPA), de picobirnavirus em fezes de um animal silvestre mantido em cativeiro, o tamanduá-bandeira (*Myrmecophaga tridactyla*). Este fato sugere a existência de possíveis novos hospedeiros para o PBV na natureza.

Também foram implementados e comparados diferentes métodos de concentração e purificação virais a partir de suspensões fecais de diferentes origens, buscando a obtenção de partículas virais purificadas para posteriores estudos de sua estrutura.

Quanto aos métodos de concentração, foram usadas a adição de cloreto de cálcio (CaCl_2), a adição de polietilenoglicol (PEG) e cloreto de sódio (NaCl) e a ultracentrifugação em colchão de sacarose, método este que apresentou os melhores resultados.

Em relação aos processos de purificação, foram testadas soluções de sacarose, tartarato (ácido tartárico, sal dipotássico), cloreto de céσιο (CsCl) e cloreto de rubídio (RbCl). A utilização do cloreto de rubídio (RbCl) mostrou-se uma alternativa viável à utilização do cloreto de céσιο (CsCl), amplamente difundido como protocolo de purificação viral, indicando que soluções de RbCl podem ser usadas como protocolos alternativos de purificação do PBV.

Foi ainda implementado o primeiro teste imunoenzimático para detecção de picobirnavirus em amostras fecais de diferentes origens, usando membranas de nitrocelulose como fase sólida. Foram observados resultados positivos nas amostras fecais das três espécies (ratos, suínos e tamanduás-bandeira), o que pode indicar que os picobirnavirus que infectam estes animais podem possuir antígenos comuns.

O teste pode ser utilizado como triagem de amostras em rotina diagnóstica, ao lado da eletroforese em gel de poliacrilamida (EGPA) como teste confirmatório. Esta é a primeira descrição de um ensaio imunoenzimático para detecção do PBV em amostras fecais.

ABSTRACT

A novel virus tentatively named picobirnavirus (PBV) has been described in faeces of several species of vertebrates (humans, rats, guinea pigs, pigs, rabbits and chickens). Examination by polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) of faecal specimens of giant anteaters (*Myrmecophaga tridactyla*) kept in captivity revealed the presence of the two equimolar bands resembling those of the picobirnaviruses. This is the first report of picobirnaviruses in faeces of a wild animal in captivity, suggesting that there might be other natural PBV hosts.

Different methods for virus concentration were tested: addition of calcium chloride (CaCl_2), addition of polyethylene glycol (PEG) and sodium chloride (NaCl) and centrifugation through sucrose cushion, the method that provided the most reliable results.

Cesium chloride (CsCl) solutions have been widely used for PBV purification protocols. Alternative protocols for density gradient centrifugation (rubidium chloride, sucrose and potassium tartrate) were tested. The results obtained by using rubidium chloride (RbCl) were compatible with those previously reported for CsCl solutions, indicating that RbCl solutions may be used as an alternative protocol for virus purification, not only for picobirnaviruses but for other viruses as well.

An enzyme immunoassay using nitrocellulose membranes is described for the detection of picobirnaviruses in faeces from different origins. In this study, positive results were detected in faecal samples from three different animals (rats, pigs and giant anteaters), suggesting that viruses identified in these animals might share common antigens.

The test characteristics indicate that it can be used as a screening test in routine diagnosis, along with a confirmatory polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) test. This is the first report of such an assay used to detect this new, and yet little known, virus in faecal specimens.

1. INTRODUÇÃO

Pereira et al (42), em 1988, pesquisando a presença de rotavírus em fezes de crianças, relataram a identificação de um novo vírus através da técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida (EGPA). Este vírus recebeu a denominação de picobirnavírus (PBV), em função de seu pequeno tamanho (pico) e da natureza de seu ácido nucleico, RNA dupla fita (double-stranded: ds) bi-segmentado. As partículas virais tinham aproximadamente 35 nm de diâmetro e apresentavam conformação provavelmente icosaédrica.

As características deste novo vírus foram comparadas àquelas de outros vírus compostos por RNAs, como os birnavírus, que também apresentam RNA bi-segmentado (39). Uma série de diferenças entre os vírus foi comprovada: o maior tamanho da partícula viral dos birnavírus (cerca de 60-65 nm de diâmetro), a menor densidade destes em CsCl (1,32-1,35 g/ml) em relação ao PBV (1,38-1,42 g/ml) e também o maior peso molecular dos segmentos genômicos dos birnavírus, de aproximadamente 3,3 e 3,8 kilo pares de bases (kpb) em relação ao PBV, de aproximadamente 1,3 e 2,5 kpb. Assim, as principais diferenças entre este novo vírus e outros, previamente descritos em vertebrados, referem-se ao tamanho e à morfologia da partícula e ao tamanho dos segmentos genômicos, porém apresentam, em certos aspectos, características em comum com alguns criptovírus do subgrupo I, como o número de segmentos genômicos, o tamanho da partícula e a ausência de estruturas definidas de superfície (45).

Após o primeiro relato em fezes de crianças (42), vírus semelhantes foram identificados em ratos de vida livre (43) e, posteriormente, também em fezes e/ou conteúdos intestinais de outros vertebrados: cobaias (44), suínos (8,18,19,34,35,46), aves (32) e coelhos (14,37). Em estudos

Pongsuwanna et al (46) realizaram um estudo com 557 amostras fecais diarréicas de suínos na Tailândia. Destas amostras, 26 estavam positivas para rotavírus em EGPA, sendo 23 amostras com rotavírus do grupo A, uma do grupo B e duas do grupo C. Duas amostras apresentaram, em EGPA, as duas bandas típicas do PBV. Contudo, não foi possível determinar alguma associação entre a presença do vírus nas fezes e a ocorrência de diarreia.

Após a primeira identificação do PBV em fezes de coelhos por Gallimore et al (14), Ludert et al (37) examinaram um total de 211 amostras de fezes de coelhos mantidos sob sistema de barreira e verificaram a presença do PBV em 23 (11%) destas amostras. A partir de partículas virais purificadas, três coelhos recém desmamados foram inoculados oralmente e dois destes liberaram o vírus em suas fezes. Em um animal, a excreção do vírus ocorreu entre os dias 11 e 17 após a inoculação, e não nos oito dias seguintes, o que poderia sugerir uma infecção aguda auto-limitante.

Gallimore et al (14) haviam descrito a liberação do vírus nas fezes de um coelho por 48 dias, enquanto que em outros animais este período era menor. Diferentes interações vírus-hospedeiro parecem ocorrer, podendo estar associadas à imunocompetência do hospedeiro em relação ao vírus, ou a variações antigênicas do vírus ou ainda a outros fatores não definidos.

Em dois estudos, um realizado a partir de amostras fecais de bovinos e outro a partir de amostras fecais de eqüinos, foi relatada a presença de vírus semelhantes ao PBV. Em ambos os casos, todavia, os autores sugerem alguma relação dos vírus descritos com o PBV, sem a afirmação de que os mesmos sejam realmente picobirnavírus (5,52,53).

Partindo de amostras de fezes bovinas, Vanopdenbosch e Wellemans (52,53) descreveram a identificação de um vírus que apresentava características em comum com os birnavírus (birnavirus-like), mas que apresentava diâmetro de aproximadamente 40 nm, ao contrário dos 60 nm

característicos dos birnavírus. Este fato permitiu aos autores a inferência de uma possível associação deste vírus identificado em fezes bovinas com o picobirnavírus. No entanto não foram realizados experimentos que permitissem a definição do mesmo como um PBV.

Browning et al (5) realizaram, entre 1987 e 1989, um estudo sobre a prevalência de patógenos entéricos em fezes de potros na Inglaterra e na Irlanda. Foram examinadas 77 amostras de fezes normais e 326 amostras de fezes diarréicas. Em amostras diarréicas, a presença de rotavírus do grupo A foi verificada em cerca de 37% dos casos. O trabalho reporta ainda a presença de um provável picobirnavírus, encontrado em amostras de 6 animais. Assim como no exemplo anterior, não foram realizados outros estudos para definição destes vírus como PBV.

Em estudo realizado a partir de conteúdos intestinais de 257 galinhas (32), foi verificada a presença, além do picobirnavírus, de um outro provável novo vírus, chamado picotrinavírus (PTV), cujo ácido nucleico também é constituído por RNA dupla-fita, porém trisegmentado, com segmentos de aproximadamente 2,9, 2,4 e 0,9 kpb. Os valores calculados para os dois segmentos do PBV foram, aproximadamente, 2,6 e 1,9 kpb. A análise em microscopia eletrônica de frações positivas para PTV em EGPA revelou a presença de partículas virais com diâmetro aproximado de 35 a 40 nm, similares àquelas descritas para o PBV (43), sem estruturas distintas de superfície.

Com relação a identificações do PBV em fezes humanas, Ludert e Liprandi (36), em 1993, examinaram um total de 214 amostras de fezes diarréicas de crianças com gastroenterite. Em 1 amostra (0,5% do total) foi detectada, em EGPA, a presença das duas bandas de RNA viral do PBV. Os autores ressaltaram que a frequência observada não deveria ser uma indicação de prevalência, já que o estudo foi limitado a pacientes hospitalizados com diarreia. O papel do PBV como agente da doença, de acordo com o resultado obtido, foi considerado, se não inexistente, ao menos de pequena

importância.

Também em 1993, Grohmann et al (22), analisando, em EGPA, amostras de fezes de pacientes portadores do vírus da imunodeficiência humana (HIV), identificaram o PBV em 10 amostras obtidas de pacientes que apresentavam quadro de diarreia e em 2 amostras em ausência de diarreia. Estas 12 amostras, nas quais o PBV foi identificado, foram obtidas a partir de 6 pacientes. Estes resultados mostraram uma relação significativa entre liberação do vírus nas fezes e ocorrência de diarreia. Esta associação, porém, não pôde ser considerada conclusiva, pois um paciente apresentou um prolongado e inesperado período de liberação intermitente do vírus nas fezes e houve associação da presença do PBV com outro patógeno entérico em dois casos. O prolongado período de liberação do vírus poderia ser, segundo os autores, sugestivo de favorecimento da replicação viral por alterações fisiopatológicas. Os mesmos ressaltaram o aparecimento do vírus em um número pequeno de pacientes e salientaram a importância de novos estudos a este respeito.

Gallimore et al (15) realizaram, em 1995, uma investigação da prevalência de picobirnavírus em amostras de fezes humanas. O experimento foi realizado com amostras coletadas entre 1982 e 1993, com os pacientes divididos em três grupos: um com pacientes envolvidos em surtos de diarreia, outro com pacientes hospitalizados (com ou sem gastroenterite como principal doença) e o último formado por casos esporádicos de diarreia nos quais os pacientes não foram hospitalizados. Foram utilizados dois métodos de extração do ácido nucleico viral: por fenol-clorofórmio e por tiocianato de guanidina/sílica. Foram observadas taxas de prevalência entre 3,5 e 13%, sendo que a taxa de detecção pelo segundo método de extração foi três vezes maior do que pelo primeiro. De todas as amostras positivas para PBV em EGPA, em apenas duas foi visualizada a partícula viral do PBV em microscopia eletrônica. A variação das taxas de prevalência verificadas em estudos semelhantes

(22,36,42) pode ser devida, segundo os autores, à diferença de idade dos pacientes pesquisados em cada trabalho. Assim como anteriormente citado (22), foi observado um período longo de liberação do vírus nas fezes, desta feita em um paciente imunocompetente que apresentou, por certo período, quadro de diarreia. Um possível papel patogênico do vírus no trato gastrointestinal humano parece pouco provável, dada a falta de correlação entre doença e replicação viral.

Gallimore et al (16), analisando 54 amostras de fezes humanas contendo oocistos de *Cryptosporidium* típico de *C. parvum*, identificaram, em 37% destas amostras, a presença de um vírus semelhante ao PBV, chamado picobirnavírus atípico (APBV), que apresentava segmentos genômicos equimolares menores (aproximadamente 1,75 e 1,55 kpb) quando comparado ao PBV, e um perfil eletroforético chamado de "estreito". Neste trabalho, a metodologia empregada para a extração do RNA viral utilizou tiocianato de guanidina/sílica. Os eletroferótipos encontrados para os APBV foram similares, ao contrário dos verificados em relação aos PBV (15). A associação entre APBV e *Cryptosporidium* não foi definida, podendo ir de um favorecimento da replicação do APBV em presença de *Cryptosporidium* até o fato de ser o APBV um vírus de protozoários, e não um vírus animal. Em trabalhos realizados com fezes suínas em nosso laboratório, não foi detectada a presença de *Cryptosporidium* em nenhuma amostra positiva para PBV (Gatti, comunicação pessoal)¹.

Apesar da falta de informações conclusivas a respeito do papel do PBV em casos de diarreia em humanos, este vírus está sendo utilizado como parâmetro em estudos etiológicos. Cox et al (10) realizaram um acompanhamento clínico em um total de 296 pacientes submetidos a transplante de medula óssea. Casos de diarreia aguda são comuns nos primeiros 100 dias pós-transplante, mesmo em pacientes que não ingerem alimentos. A preparação para o transplante inclui uma forte terapia

¹Gatti, M. S. V. - Laboratório de Virologia, DMI, IB, UNICAMP

citoreduziva, logo imunossupressora, que também pode causar danos à mucosa intestinal, provocando diarreia. Estes danos, porém, não costumam ultrapassar 20 dias após o transplante. Do 20^o ao 100^o dia pós-transplante, os casos de diarreia podem ser provocados por agentes infecciosos ou não. Na maioria dos casos, o agente é não infeccioso: efeitos colaterais de medicamentos, doença enxerto-contra-hospedeiro (10). Para a determinação de possíveis agentes infecciosos (bactérias, fungos, vírus, parasitas), vários testes foram utilizados, entre eles a eletroforese em gel de poliacrilamida (EGPA) para detecção do PBV. Este vírus não foi encontrado em nenhuma amostra, mas o fato de a pesquisa da presença do PBV ter sido incluída ao lado de outros vírus causadores de diarreia nestes casos (rotavírus, astrovírus, citomegalovírus, adenovírus, agente Norwalk) deve ser ressaltado.

Em um estudo realizado com crianças que apresentavam quadro de diarreia aguda, Cascio et al (6) verificaram a presença do PBV em 0,43% dos casos (3 casos em 690 amostras), um valor pouco significativo e que também não pode ser considerado conclusivo para uma definição do papel do PBV como agente causador de diarreia em humanos, ainda que não tenham sido encontrados outros patógenos entéricos nas amostras positivas para PBV.

Em todos os trabalhos, amostras fecais serviram como fonte de obtenção do PBV, já que ainda não foi definido um modelo de cultura celular para a adaptação do vírus. Pereira et al (44) sugeriram um ciclo de multiplicação do tipo abortivo, com detecção do ácido nucleico viral somente na primeira passagem do vírus em cultivos celulares (células de embrião de cobaia, fibroblastos diplóides humanos -MRC5-, cultura primária de células de rim de macaco e células humanas Hep2).

Em trabalhos realizados em nosso laboratório, com a utilização de culturas primárias de células de rim de camundongos e ratos e de culturas de células das linhagens MA-104 (células originárias de rim de macaco verde da África), CaCo-2 e HT-29 (células originárias de intestino

humano), também não foi possível a definição de um modelo de cultura celular para o PBV. Assim como anteriormente relatado (44), em alguns destes sistemas foi possível detectar, em EGPA, o RNAds típico do PBV a partir de sobrenadantes obtidos em passagens iniciais, sugerindo também um ciclo do tipo abortivo nestas células (Vicentini, comunicação pessoal)¹.

Poucos trabalhos apresentaram dados a respeito da composição proteica do PBV. Ludert et al (35) identificaram, a partir de partículas virais, dois polipeptídeos em eletroforese em gel de poliacrilamida contendo duodecil sulfato de sódio (SDS-EGPA), sendo um de 50×10^3 daltons (kDa), que corresponderia a 80% do total de proteínas do virion, e outro de 33 kDa. Gatti (19), após purificação das partículas virais, identificou a presença de três polipeptídeos de, respectivamente, 77, 16,5 e 13 kDa, com o último sendo caracterizado como uma possível proteína *major*.

Diversos aspectos relacionados ao PBV continuam indefinidos e são objeto de estudos, como a utilização de diferentes técnicas de extração do RNA viral, determinação do local da infecção por PBV, tentativas de propagação deste em culturas celulares e determinação de novos hospedeiros para o PBV. A continuidade dos estudos a respeito do PBV passa ainda por outros pontos, como a utilização de metodologias para purificação viral e o desenvolvimento de técnicas alternativas de diagnóstico a partir de suspensões fecais.

Nos trabalhos aqui citados, a EGPA foi a metodologia de escolha para o diagnóstico da presença do PBV. A microscopia eletrônica, apesar de ser um dos possíveis métodos diagnósticos e um importante parâmetro de estudo, não vem sendo rotineiramente empregada com este propósito principalmente pelo fato de o PBV estar presente em concentrações muito baixas nas fezes dos animais infectados. Este fato faz com que, em muitas ocasiões, mesmo com a utilização de diferentes

¹Vicentini.F. - Laboratório de Virologia, DMI, IB, UNICAMP

métodos de concentração viral a partir das suspensões fecais, seja pouco provável a identificação do PBV por microscopia eletrônica.

De tal forma, torna-se clara a necessidade da introdução de ferramentas metodológicas que possam levar a uma melhor caracterização do PBV, tanto quanto à sua constituição como quanto ao seu diagnóstico, visando uma futura definição do seu papel em gastroenterites. Além disso, outros possíveis hospedeiros devem ser identificados como forma de definição da distribuição do vírus na natureza e de possíveis formas de transmissão para o homem.

2. OBJETIVOS

1. Pesquisa da presença do picobirnavírus (PBV) em fezes de diferentes espécies.
2. Implementação e avaliação de diferentes métodos de concentração e purificação do picobirnavírus (PBV) a partir de suspensões fecais de diferentes origens (extratos de fezes de ratos, porcos e tamanduás-bandeira).
3. Padronização de um ensaio imunoenzimático (“dot-blot”) como método de triagem de amostras fecais de diferentes origens.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1-Amostras fecais

A pesquisa de novos hospedeiros para o picobirnavírus (PBV) foi baseada em coletas de amostras de fezes dos animais pertencentes ao Parque Ecológico Municipal Cid A. Franco, localizado na zona urbana do município de Americana (SP). As tabelas 1 e 2 mostram as espécies pesquisadas e o número de amostras fecais coletadas de cada animal. As coletas não foram realizadas individualmente, sendo as fezes coletadas no chão de cada um dos recintos.

As amostras de fezes suínas foram obtidas a partir de material rotineiramente enviado, por granjas da região de Campinas (SP), ao laboratório de Virologia (DMI/UNICAMP) para pesquisa da presença de rotavírus e picobirnavírus.

As amostras de fezes murinas foram obtidas a partir de animais experimentalmente inoculados. Foram utilizados ratos da linhagem WISTAR, procedentes do Centro Multi-Institucional de Bioterismo da Universidade Estadual de Campinas (CEMIB-UNICAMP). Estes animais são descendentes de matrizes gnotobióticas obtidas do *Zentralinstitut für Versuchstierzucht* de Hannover (Alemanha) e são mantidos em isoladores do tipo Trexler, com pressão positiva, em salas com sistema de barreira e controle ambiental (temperatura de 20 a 22°C, umidade relativa de 55 a 75%, ar filtrado e pressurizado). Os animais foram retirados assepticamente das câmaras em módulos de transferência e enviados ao biotério do Departamento de Microbiologia e Imunologia (DMI) da UNICAMP, onde foram colocados em isoladores previamente preparados. O material a ser utilizado dentro dos isoladores passou por processos de esterilização e/ou desinfecção química. Os animais foram

inoculados por via oral, recebendo uma suspensão fecal filtrada contendo o picobirnavírus (PBV). Os animais foram identificados individualmente e as fezes coletadas utilizando coletores individuais.

Tabela 1 - Nomes populares e científicos de aves pertencentes ao Parque Ecológico Cid A. Franco, localizado no município de Americana (SP), cujas amostras fecais foram analisadas, em eletroforese em gel de poliacrilamida (EGPA), para presença de picobirnavírus (PBV).

Nome Popular	Nome Científico	Número de amostras coletadas
Arara canindé	<i>Ara ararauna</i>	2
Arara vermelha	<i>Ara chloroptera</i>	2
Ararajuba	<i>Aratinga guaruba</i>	2
Avestruz	<i>Struthio camelus</i>	8
Casuar	<i>Casuaris casuaris</i>	4
Ema	<i>Rhea americana</i>	7
Jacu	<i>Penelope obscura</i>	2
Maritaca bronzeada	<i>Ara nobilis</i>	2
Mutum	<i>Miter mitu tomentosa</i>	2
Mutum de penacho	<i>Crax fasciolata</i>	2
Papagaio de cauda vermelha	<i>Amazona brasiliensis</i>	3
Papagaio do mangue	<i>Amazona amazonica</i>	2
Papagaio do peito roxo	<i>Amazona vinacea</i>	3
Papagaio galego	<i>Amazona xanthops</i>	2
Papagaio verde	<i>Amazona farinosa</i>	3
Pavão branco	<i>Pavo cristatus alba</i>	5
Pavão verde	<i>Pavo muticus</i>	4
Pingüim	<i>Sphenicus magelanicus</i>	1
Tucano de bico verde	<i>Ramphastos dicolorus</i>	6
Tucano toco	<i>Ramphastos toco</i>	4

Tabela 2 - Nomes populares e científicos de mamíferos pertencentes ao Parque Ecológico Cid A. Franco, localizado no município de Americana (SP), cujas amostras fecais foram analisadas, em eletroforese em gel de poliacrilamida (EGPA), para presença de picobirnavírus (PBV).

Nome Popular	Nome Científico	Número de amostras coletadas
Alpaca	<i>Lama pacas</i>	6
Anta	<i>Tapirus terrestris</i>	6
Ariranha	<i>Pteromura brasiliensis</i>	3
Aoudad	<i>Ammotragus lervia</i>	5
Cachorro do mato	<i>Cerdocyon thous</i>	8
Cachorro vinagre	<i>Speothos venaticus</i>	8
Capivara	<i>Hydrochaeris hydrochaeris</i>	2
Chipanzé	<i>Pan troglodytes</i>	2
Furão	<i>Galictis vittata</i>	2
Hipopótamo	<i>Hippopotamus amphibius</i>	2
Leão	<i>Pantera leo</i>	4
Lobo guará	<i>Chrysocyon brachyurus</i>	8
Macaco aranha de cara vermelha	<i>Ateles paniscus paniscus</i>	2
Mico de cheiro	<i>Saimiri sireus</i>	2
Mico leão de cara dourada	<i>Leon crysomelas</i>	17
Onça pintada	<i>Pantera onca palustris</i>	7
Onça preta	<i>Pantera onca</i>	6
Sagüi de cara branca	<i>Callithrix geoffroyi</i>	2
Sagüi de coleira	<i>Saguinus bicolor</i>	2
Sagüi da serra escura	<i>Callithrix aurita</i>	2
Sagüi de tufo branco	<i>Callithrix jacchus jacchus</i>	2
Sagüi de tufo preto	<i>Callithrix jacchus penicilata</i>	2
Sagüi de Wild	<i>Callithrix kuhlii</i>	2
Sagüi preto	<i>Saguinus midas niger</i>	2
Tamanduá-bandeira	<i>Myrmecophaga tridactyla</i>	17
Tatu-peba	<i>Euphractus sexcinctus</i>	1
Veado catigueiro	<i>Mazama gouazoupira</i>	8

3.2-Preparo das suspensões fecais

As amostras de fezes foram diluídas a aproximadamente 10% em tampão Tris (100mM Tris/HCl, 1,5mM Ca^{2+} , pH 7,4). Após homogeneização, as amostras foram centrifugadas a 1.500 g durante 10 minutos em rotor JA-14 (J2-21 Centrifuge, Beckman Instruments) e os sobrenadantes foram recolhidos e mantidos a 4°C (43).

3.3-Extração do ácido nucleico viral

O RNA viral foi obtido a partir do sobrenadante da suspensão de fezes (25). Desta solução foram retirados 500 μl , aos quais foram acrescentados 50 μl de duodecil sulfato de sódio (SDS) a 10% em água destilada. Após homogeneização, a mistura foi incubada em banho-maria a 37°C durante 30 minutos. Foram então adicionados 500 μl de uma solução de fenol-clorofórmio (v/v). Após 3 minutos de agitação em "Vortex", as amostras foram centrifugadas em centrífuga Eppendorf 5402 a 15.000 g durante 10 minutos a 4°C. O sobrenadante resultante foi coletado e acrescido de 50 μl de uma solução de cloreto de sódio (NaCl) a 20% (p/v) em água destilada e 1 ml de álcool etílico. Após homogeneização, as amostras permaneceram a -20°C durante 18 horas para a precipitação do ácido nucleico viral. Decorrido este tempo, as amostras foram centrifugadas em centrífuga Eppendorf 5402 a 15.000 g durante 10 minutos a 4°C e os sobrenadantes totalmente eliminados. Os precipitados resultantes foram colocados em vácuo até secagem total e acrescidos de 20 μl de mistura dissociante (0,0625M Tris/HCl pH 6,8; 5M uréia; 5% 2-mercaptoetanol; 3% SDS e 0,01% azul de bromofenol). Esta solução foi incubada a 56°C durante 10 minutos antes da aplicação em gel de poliacrilamida

(3.4).

Uma amostra fecal positiva para rotavírus do grupo A recebeu o mesmo tratamento e foi incluída nos testes de EGPA como controle positivo.

3.4-Detecção do PBV por eletroforese em gel de poliacrilamida (EGPA)

Foram seguidas as recomendações de Herring et al (25), segundo as observações de Laemmli (31).

Duas placas de vidro de 12,5 cm x 16,5 cm foram separadas entre si por espaçadores de 1 mm de espessura. Após selagem das placas com ágar noble a 1,5% em água destilada, o filme de gel separador de poliacrilamida a 7% foi introduzido entre elas e, após polimerização, o gel concentrador de poliacrilamida a 3,5% foi a ele sobreposto. Neste gel foi introduzido um "pente" que permitiu a formação de canaletas nas quais foram introduzidos os materiais a serem examinados. As amostras foram aplicadas no gel concentrador após a polimerização deste e o preenchimento dos reservatórios superior e inferior da cuba com tampão 0,1M Tris-0,83M Glicina (pH 8,3). O gel permaneceu sob corrida eletroforética a uma corrente de 10 mA durante 18 horas, à temperatura ambiente.

3.5-Impregnação do gel de poliacrilamida pelo método da prata

Foi utilizado o método descrito por Sammons et al (49), modificado por Herring et al (25). Após a corrida eletroforética, o gel foi transferido para uma cuba contendo uma solução de 0,5% de ácido acético e 10% de álcool etílico em água destilada e mantido sob agitação constante durante uma

hora, sendo então colocado em uma solução de nitrato de prata a 0,11M em água destilada, mantido sob agitação por 30 minutos e lavado rapidamente em água destilada por 3 vezes. A revelação foi feita através da adição de uma solução de hidróxido de sódio a 0,75M em água destilada, acrescida de 0,2M de formalina. Assim que apareceram bandas nítidas na amostra padrão de rotavírus, a revelação foi interrompida transferindo-se o gel para uma solução de ácido acético a 5% em água destilada. Após observação dos resultados, o gel foi transferido para uma solução de etanol a 10% em água destilada, fotografado para documentação e seco.

3.5.1- Secagem do gel

A secagem do gel foi realizada segundo o método de Juang et al (28). O gel foi transferido para uma solução de metanol a 65% e glicerol a 0,5% em água destilada e deixado sob agitação constante por um período de 3 a 4 horas, sendo então colocado entre duas folhas de papel celofane molhado, evitando a formação de bolhas de ar ou rugas, e prensado. A secagem durou cerca de 24 horas à temperatura ambiente.

3.6-Concentração do picobirnavírus a partir de suspensões fecais

3.6.1- Adição de polietilenoglicol (PEG) e cloreto de sódio (NaCl)

Segundo a metodologia proposta por Beards para rotavírus (3), a concentração das partículas virais presentes nas amostras fecais foi feita pela adição de polietilenoglicol, PEG PM=6000

(concentração final de 8% p/v) e cloreto de sódio, NaCl, (concentração final de 0,5M) ao extrato fecal a 10% em tampão Tris (3.2). Após agitação constante por 18 horas a 4°C, os precipitados foram coletados por centrifugação a 15.000 g por 30 minutos em rotor JA-20 (J2-21 Centrifuge, Beckman Instruments) e ressuspensos no mínimo volume necessário do mesmo tampão. Em alguns experimentos, o tampão Tris utilizado para ressuspensão do precipitado foi acrescido de 0,1% v/v de Triton X-100 (47).

3.6.2- Ultracentrifugação em colchão de sacarose

O extrato fecal a 10% em tampão Tris foi submetido a concentração sobre uma solução de sacarose a 45% ou 30% em tampão Tris, com ultracentrifugação por 4 horas a 4°C a 200.000 g em rotor SW-41 (LM-8 Centrifuge, Beckman Instruments). O sobrenadante foi desprezado e o precipitado ressuspenso em um volume mínimo de tampão Tris.

3.6.3- Adição de cloreto de cálcio (CaCl₂)

A partir da metodologia proposta por Molitor et al (38), a suspensão fecal recebeu, gota a gota, uma solução de cloreto de cálcio (CaCl₂) até uma concentração final de 25 mM. Após 30 minutos sob agitação constante a 4°C, a suspensão foi centrifugada a 10.000g por 20 minutos, em rotor JA-20 (J2-21 Centrifuge, Beckman Instruments) sendo o sobrenadante desprezado e o precipitado ressuspenso em volume mínimo de tampão Tris.

3.7-Purificação do picobirnavírus a partir de suspensões fecais

Os precipitados obtidos conforme descrito em 3.6 e ressuspensos em tampão Tris foram então submetidos a ultracentrifugação em diferentes soluções: cloreto de cézio (CsCl), cloreto de rubídio (RbCl), sacarose e tartarato.

3.7.1- Purificação por ultracentrifugação em gradiente de cloreto de cézio (CsCl) e cloreto de rubídio (RbCl)

Alguns dos precipitados ressuspensos em tampão Tris foram adicionados a uma solução de cloreto de cézio (CsCl) ou de cloreto de rubídio (RbCl), em tampão Tris, com densidade ajustada para 1,41 g/ml, e ultracentrifugada em rotor SW41 (LM-8 Centrifuge, Beckman Instruments) a 120.000 g durante 60 horas (4°C) para formação do gradiente.

3.7.2- Purificação por ultracentrifugação em gradiente de sacarose

A amostra foi adicionada sobre um gradiente pré-formado a partir de soluções com diferentes concentrações de sacarose (5-10-15-20-25% em tampão Tris), e submetida a ultracentrifugação conforme descrito no item anterior.

3.7.3- Purificação por ultracentrifugação em gradiente de tartarato

O gradiente de tartarato (ácido tartárico, sal dipotássico) e glicerol, a partir das recomendações de Ashley e Caul (2), foi utilizado com o mesmo período de ultracentrifugação. Neste caso, foram preparadas duas soluções-mãe, uma de glicerol (30% p/v) e outra de tartarato (60% p/v). A partir destas soluções foram preparadas cinco outras, através da diluição progressiva da solução de tartarato na solução de glicerol. O gradiente foi formado pela adição sucessiva destas soluções ao tubo de ultracentrifugação, sendo que na parte inferior do mesmo ficava a solução-mãe de tartarato e na parte superior a solução-mãe de glicerol, entremeadas pelas soluções obtidas após as diluições da primeira solução na segunda. De tal forma, formou-se um gradiente de concentração e viscosidade, sendo que a parte inferior do tubo apresentava maior concentração que a superior, em função da maior concentração de tartarato nesta parte, concentração esta que diminuía na direção vertical. Quanto à viscosidade, houve a formação de um gradiente no sentido inverso: a parte superior do tubo apresentava maior viscosidade em função da maior concentração de glicerol, que diminuía em direção ao fundo do mesmo.

Em todos os gradientes realizados, foram coletadas frações de aproximadamente 0,7 ml pela parte superior do tubo e suas densidades determinadas por pesagem de 100 µl, realizada em duplicata. Cada fração foi dialisada em tampão Tris por cerca de 18 horas a 4°C e analisada em EGPA, após tratamento de uma alíquota de 100 µl de cada fração acrescida de 400 µl de tampão Tris e submetida à extração do ácido nucleico viral, conforme descrito no item 3.3. Em EGPA, a presença do PBV foi indicada pelo encontro das duas bandas típicas de RNAs.

As frações positivas para PBV foram, ainda, submetidas à leitura em espectrofotômetro em comprimentos de onda de 260 e 280 nm para estimativa da concentração proteica (em mg/ml), através da fórmula proposta por Kalckar (29):

Concentração proteica = $1,45 \times \text{DO}(280 \text{ nm}) - 0,74 \times \text{DO}(260 \text{ nm})$

3.8-Microscopia eletrônica

As frações positivas para PBV em EGPA (obtidas como descrito em 3.7) foram aliqüotadas para análise em microscopia eletrônica. Cerca de 20 µl de cada fração foram colocados em uma película de parafilme e, sobre a gota formada por este volume de amostra, foi colocada uma tela de cobre previamente carbonizada. Após alguns minutos, a tela foi lavada rapidamente por três vezes em salina tamponada com fosfato (PBS, pH 6,8) e transferida para uma gota de ácido fosfotúngstico (PTA) a 2% por cerca de 2 minutos, para realização da coloração negativa (15,34,36). Após a secagem das telas, as mesmas foram analisadas em microscópio eletrônico de transmissão (Phillips M400T), no Instituto Adolfo Lutz, em São Paulo (SP).

3.9-Obtenção de antissoros anti-picobirnavírus

Foram utilizadas aliqüotas de frações coletadas em gradiente de cloreto de céσιο (CsCl), positivas para PBV em EGPA. Para efeito de cálculo, foi tomado por base o valor de estimativa da concentração proteica obtido a partir das leituras espectrofotométricas em 260 e 280 nm (29). A imunização foi feita em coelhos albinos.

Os animais foram sangrados para obtenção do soro pré-imune e receberam inoculação intradérmica de aproximadamente 50 µg de proteínas do PBV, acrescidos de 1 volume de adjuvante de Freund completo e dois volumes de Tween 80 (0,1%). Decorridos 14 dias, os animais foram

novamente inoculados, com o mesmo valor aproximado de concentração proteica, acrescido de 1 volume de adjuvante de Freund incompleto. No 21^o dia após a primeira inoculação, os animais sofreram sangria de prova para avaliação do título de anticorpos anti-PBV, sendo submetidos a sangria branca dois dias após (41). O complemento do soro foi inativado por incubação a 56°C por 30 minutos.

3.10-Ensaio imunoenzimático (EIE) para determinação do título de anticorpos anti-picobirnavírus

O ensaio imunoenzimático seguiu as recomendações de Pereira et al (41), propostas para rotavírus e adenovírus.

Para a sensibilização das placas de poliestireno, foram utilizadas como antígeno alíquotas de frações positivas para PBV em EGPA. Também neste caso o cálculo foi baseado no valor estimado de concentração proteica obtido a partir de leituras espectrofotométricas (29). Concentrações de 0,25, 0,5, 1, 3 e 5 µg/ml do antígeno foram adicionadas à placa. Além dos controles habituais, uma amostra de rotavírus SA-11 obtida em cultura celular foi utilizada como controle do antígeno, nas diluições de 1:100, 1:200, 1:500 e 1:1000, feitas em tampão carbonato-bicarbonato pH 9,6. A placa foi incubada durante 18 horas a 4°C e em seguida lavada com salina tamponada com fosfato (PBS) pH 7,4 contendo 0,05% de Tween 20 (PBST) por 3 vezes. O bloqueio foi realizado pela adição, a cada poço, de 200 µl de PBST acrescido de 2,5% de leite desnatado (PBSTL). Após duas horas a 37°C em câmara úmida, a placa foi lavada por três vezes com PBST e incubada novamente durante duas horas a 37°C com diferentes diluições, em PBST, do soro obtido conforme o item anterior e também

com diferentes diluições do soro pré-imune. A placa foi lavada em PBST e incubada com anti-IgG de coelho conjugada com peroxidase (Calbiochem), na diluição de 1:10.000 em PBST, durante duas horas a 37°C em câmara úmida. Após novas lavagens em PBST, foi acrescentado o substrato: uma solução de ortofenilenodiamina (OPD) a 0,04% em tampão ácido cítrico/fosfato 0,1M pH 5,6 contendo 0,5% de H₂O₂ 30 volumes. A reação foi interrompida pela adição de 50 µl de ácido sulfúrico (H₂SO₄) 2M e a leitura da placa foi realizada em espectrofotômetro Multiskan a 492 nm.

3.11- Ensaio imunoenzimático do tipo “dot-blot” para detecção de picobirnavírus em fezes de diferentes origens

O ensaio foi realizado a partir das recomendações de Hawkes et al (24) e Gouvea et al (20), com modificações.

A membrana de nitrocelulose foi inicialmente cortada e colocada em uma placa de 24 poços. Foram utilizadas como antígenos as seguintes amostras: rotavírus (RV) SA-11 obtido em cultivo celular e suspensão fecal suína positiva para rotavírus em EGPA (controles negativos), suspensões fecais positivas para PBV em EGPA, de amostras de fezes suínas, murinas e de tamanduá-bandeira e suspensões fecais suínas e murinas negativas tanto para RV como para PBV em EGPA. Cada amostra foi testada em duplicata.

Os antígenos foram diluídos (1:3) em tampão carbonato-bicarbonato (0,25M, pH 9,6) e aproximadamente 10 µl de cada amostra foram aplicados diretamente à membrana de nitrocelulose. Após a secagem das membranas, foi feito o bloqueio das mesmas pela adição de tampão PBST (PBS contendo 0,05% Tween 20) contendo 5% de leite desnatado (PBSTL), durante uma hora (nos

primeiros experimentos), sendo este período posteriormente ampliado para duas horas. As membranas foram então lavadas por três vezes em PBST e posteriormente incubadas durante duas horas com o antissoro anti-PBV (1:25 em tampão PBST). Após três novas lavagens com PBST, as membranas foram incubadas durante duas horas com o anticorpo (de origem caprina) anti-IgG de coelho conjugado com peroxidase (Calbiochem), diluído (1:10.000) em PBST. Após 2 horas sob agitação, as membranas foram novamente lavadas com PBST antes da adição do substrato: 5 mg de diaminobenzidina (DAB, Sigma) em 30 ml de PBST, acrescidos de 150 µl de H₂O₂ 30 volumes. A reação foi interrompida pela retirada desta solução e pela adição de PBST. Após a observação dos resultados, as placas foram descartadas em solução de hipoclorito de sódio a 1%. Foram também incluídos na reação os controles de bloqueio, anticorpo primário e anticorpo conjugado com peroxidase.

Os valores de sensibilidade e especificidade do teste de Dot-blot foram calculados segundo a tabela binária anteriormente proposta para tais cálculos (17,21,51,54), reproduzida na tabela 8 (Apêndice). Os resultados obtidos em EGPA foram o outro parâmetro, além dos resultados obtidos no Dot-blot, utilizado para este fim.

4. RESULTADOS

4.1-Resultados relativos à pesquisa de novos hospedeiros para o picobirnavírus

As amostras fecais coletadas no Parque Ecológico Municipal Cid A. Franco de Americana (SP) foram submetidas à extração de ácidos nucleicos descrita no item 3.3 de Material e Métodos. Foi coletado um total de 196 amostras de 47 diferentes espécies (aves e mamíferos, Tabelas 1 e 2, Material e Métodos).

A análise inicial, em EGPA, revelou a presença do perfil eletroforético típico do PBV em amostras de fezes de tamanduá-bandeira (*Myrmecophaga tridactyla*).

Em função dos valores previamente definidos para os tamanhos dos segmentos genômicos do rotavírus SA-11 (13), foram calculados valores de aproximadamente 1,9 e 2,3 kpb para os segmentos do PBV encontrado em fezes de tamanduá-bandeira. Este perfil pode ser visualizado na figura 4, referente ao processo de concentração viral por ultracentrifugação em colchão de sacarose. Frações, positivas em EGPA, obtidas após ultracentrifugação em gradiente de cloreto de cério foram testadas em microscopia eletrônica, com a detecção de partículas virais de dois diâmetros diferentes (aproximadamente 21 e 30 nm), conforme figuras 1 e 2. A definição do ácido nucleico como um RNA de fita dupla (RNA_{ds}) foi obtida por digestão enzimática (43).

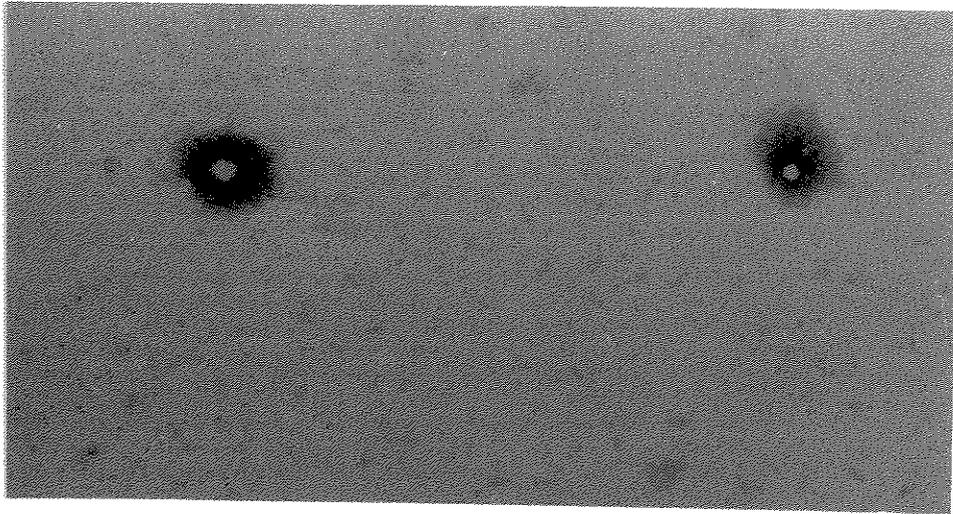


Figura 1 - Eletromicrografia de amostra positiva para PBV, obtida após ultracentrifugação em gradiente de cloreto de céσιο (CsCl). Amostra de fezes de tamanduá-bandeira. Aumento de aproximadamente 115.000 vezes.

Partículas virais de aproximadamente 30 (à esquerda) e 21 (à direita) nm de diâmetro.

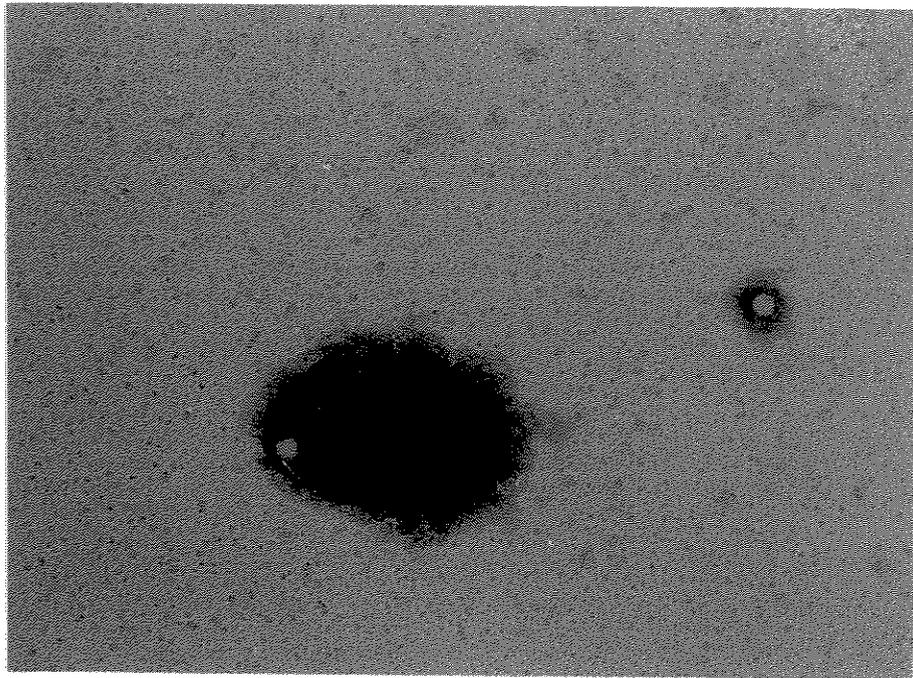


Figura 2 - Eletromicrografia de amostra positiva para PBV, obtida após ultracentrifugação em gradiente de cloreto de cério (CsCl). Amostra de fezes de tamanduá-bandeira. Aumento de aproximadamente 115.000 vezes.

Partículas virais de aproximadamente 30 nm de diâmetro.

4.2-Resultados relativos aos processos de concentração viral

Foram utilizados três métodos para concentração viral a partir de suspensões fecais: a adição de polietilenoglicol (PEG) e cloreto de sódio (NaCl) seguida de centrifugação, a adição de cloreto de cálcio seguida de centrifugação e a ultracentrifugação em colchão de sacarose a 45 e 30%. Todas as suspensões fecais utilizadas haviam sido previamente testadas em eletroforese em gel de poliacrilamida (EGPA) com visualização do perfil eletroforético típico do picobirnavírus (PBV), exemplificado na figura 3.

Um resumo dos experimentos de concentração e purificação de amostras fecais suínas, murinas e de tamanduá-bandeira pode ser visto, respectivamente, nas tabelas 3, 4 e 5.

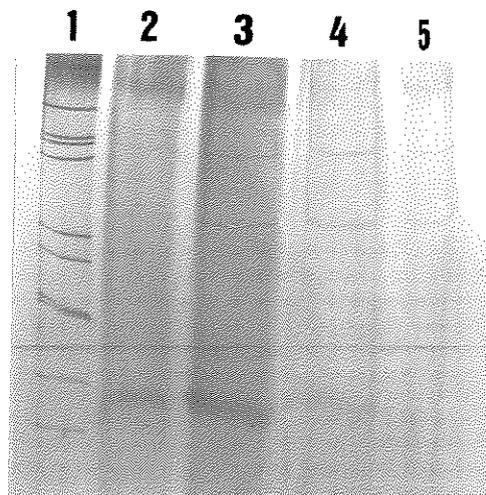


Figura 3 - Eletroforese em gel de poliacrilamida (EGPA) de RNAs de picobirnavírus (PBV) obtidos por extração de suspensões fecais de ratos.

Canaleta 1 - RNAs de rotavírus do grupo A

Canaletas 2, 3, 4, 5 - RNAs de picobirnavírus

Tabela 3 - Experimentos de concentração (adição de PEG/NaCl, adição de CaCl₂, untracentrifugação em colchão de sacarose a 45 e 30%) e purificação (ultracentrifugação em gradientes de cloreto de cézio, cloreto de rubídio, sacarose e tartarato) realizados a partir de fezes suínas, num total de 70 experimentos.

Método de concentração	Método de purificação	Número de experimentos	Número de resultados positivos em EGPA
Adição de PEG/NaCl	CsCl	7	6
	RbCl	5	4
	Sacarose	5	0
	Tartarato	5	0
Adição de CaCl ₂	CsCl	8	0
	RbCl	0	0
	Sacarose	0	0
	Tartarato	0	0
Ultracentrifugação em colchão de sacarose a 45%	CsCl	12	7
	RbCl	5	3
	Sacarose	4	0
	Tartarato	5	0
Ultracentrifugação em colchão de sacarose a 30%	CsCl	10	6
	RbCl	4	3
	Sacarose	0	0
	Tartarato	0	0

Tabela 4 - Experimentos de concentração (adição de PEG/NaCl, adição de CaCl₂, ultracentrifugação em colchão de sacarose a 45 e 30%) e purificação (ultracentrifugação em gradientes de cloreto de cério, cloreto de rubídio, sacarose e tartarato) realizados a partir de fezes murinas, num total de 62 experimentos.

Método de concentração	Método de purificação	Número de experimentos	Número de resultados positivos em EGPA
Adição de PEG/NaCl	CsCl	9	5
	RbCl	7	4
	Sacarose	5	0
	Tartarato	5	0
Adição de CaCl ₂	CsCl	7	0
	RbCl	0	0
	Sacarose	0	0
	Tartarato	0	0
Ultracentrifugação em colchão de sacarose a 45%	CsCl	10	7
	RbCl	5	3
	Sacarose	3	0
	Tartarato	3	0
Ultracentrifugação em colchão de sacarose a 30%	CsCl	5	4
	RbCl	3	2
	Sacarose	0	0
	Tartarato	0	0

Tabela 5 - Experimentos de concentração (ultracentrifugação em colchão de sacarose a 45 e 30%) e purificação (ultracentrifugação em gradientes de cloreto de cézio, cloreto de rubídio e tartarato) realizados a partir de fezes de tamanduá-bandeira (*Myrmecophaga tridactyla*), num total de 14 experimentos.

Método de concentração	Método de purificação	Número de experimentos	Número de resultados positivos em EGPA
Ultracentrifugação em colchão de sacarose a 45%	CsCl	8	2
	RbCl	2	0
	Sacarose	0	0
	Tartarato	2	0
Ultracentrifugação em colchão de sacarose a 30%	CsCl	2	2
	RbCl	0	0
	Sacarose	0	0
	Tartarato	0	0

A EGPA foi novamente empregada para verificação da presença ou não das bandas de RNAs do PBV após a realização destes experimentos. Aliquotas dos materiais obtidos após a ressuspensão dos precipitados obtidos por centrifugação ou ultracentrifugação foram submetidos à metodologia de extração de ácidos nucleicos descrita no item 3.3 de Material e Métodos.

Não importando a origem da amostra fecal utilizada, não houve a detecção, em EGPA, das bandas típicas do PBV com a utilização da metodologia de adição de cloreto de cálcio.

Tanto em experimentos que utilizaram a adição de PEG/NaCl como nos que empregaram a ultracentrifugação em colchão de sacarose, observou-se a presença das bandas típicas do PBV em EGPA. Na figura 4 está representado um dos resultados obtidos com ultracentrifugação em colchão de sacarose a 30%. Foram obtidos resultados semelhantes com a utilização de solução de sacarose a 45%.

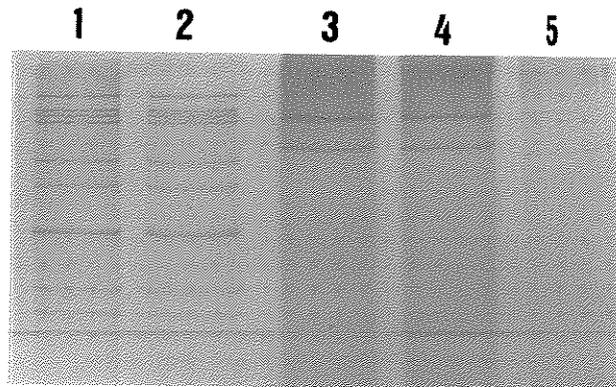


Figura 4 - Eletroforese em gel de poliacrilamida (EGPA) de RNAs de picobirnavírus e rotavírus obtidos a partir de ressuspensão do “pellet” obtido por ultracentrifugação em colchão de sacarose a 30% em tampão Tris.

Canaletas 1, 2 - RNAs de rotavírus do grupo A

Canaletas 3, 4 - RNAs de picobirnavírus (amostra de fezes de tamanduá-bandeira)

Canaleta 5 - RNAs de picobirnavírus (amostra de fezes suínas)

4.3-Resultados relativos aos processos de purificação viral

As amostras obtidas após os experimentos de concentração foram então submetidas às quatro metodologias empregadas para fins de purificação viral, baseadas na ultracentrifugação para formação de um gradiente de densidade. Um resumo dos experimentos de concentração e purificação virais pode ser visto nas tabelas 3, 4 e 5, sendo cada uma relativa às diferentes origens das amostras fecais utilizadas.

No caso da metodologia que utilizava um gradiente pré-formado de sacarose, com concentrações mínimas e máximas de, respectivamente, 5 e 25%, não houve detecção do ácido nucleico do PBV em EGPA após extração de aliquotas retiradas das frações coletadas a partir dos gradientes. O valor máximo de densidade verificado foi de aproximadamente 1,17 g/ml.

Também com a utilização do gradiente pré-formado de tartarato e glicerol não foram observadas, em EGPA, as bandas típicas do PBV. A densidade máxima verificada nestes experimentos não ultrapassou 1,41 g/ml, valor que corresponde à faixa de densidade esperada para o PBV, segundo a literatura.

Já com os outros dois sais utilizados, o cloreto de cézio (CsCl) e o cloreto de rubídio (RbCl), houve a detecção do RNA viral em EGPA após a ultracentrifugação. Este fato ocorreu com amostras fecais de diferentes origens.

As densidades máximas verificadas nos gradientes foram, aproximadamente, 1,56 g/ml para o cloreto de cézio e 1,48 g/ml para o cloreto de rubídio. As densidades das frações positivas para PBV em EGPA variaram entre, aproximadamente, 1,36 g/ml e 1,43 g/ml.

A concentração proteica destas amostras foi estimada por leitura espectrofotométrica (29).

Com a utilização do cloreto de céσιο, foi verificado um valor médio de 0,213 (\pm 0,086) mg/ml. Para os experimentos com cloreto de rubídio, o valor médio encontrado foi 0,187 (\pm 0,033) mg/ml.

Alguns destes resultados estão ilustrados pelas figuras 5, 6, 7 e 8. As figuras 5 e 6 representam os resultados obtidos em dois dos experimentos que utilizaram cloreto de céσιο (CsCl). As figuras 7 e 8 representam um dos experimentos realizados com cloreto de rubídio (RbCl).

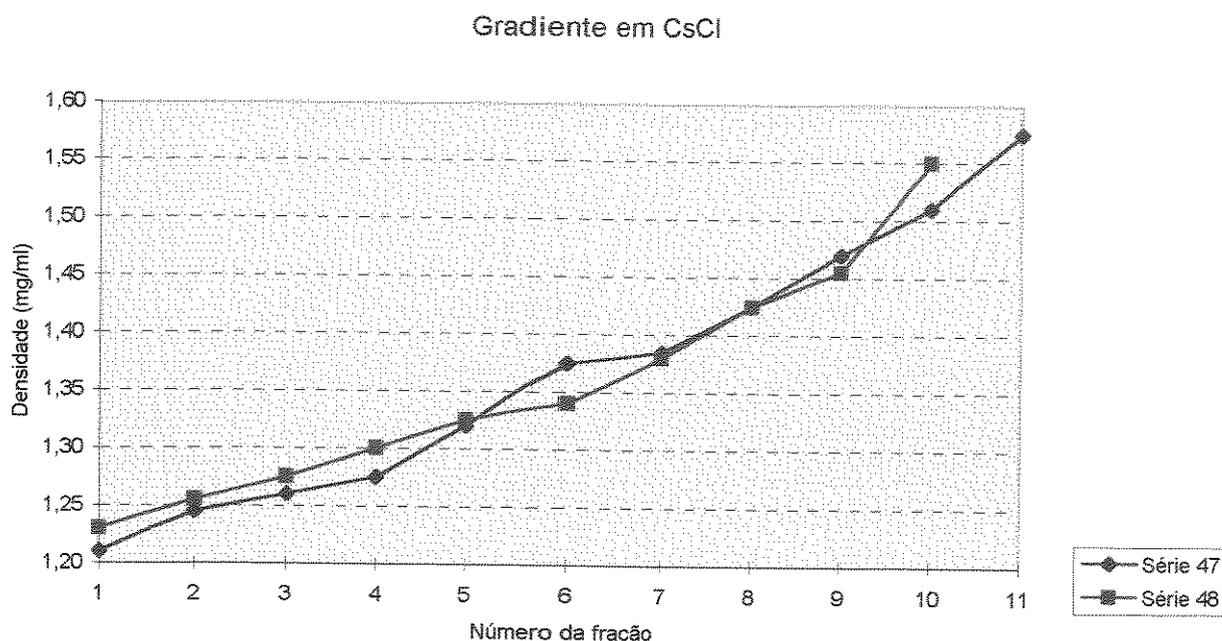


Figura 5 - Valores de densidade obtidos das frações coletadas após ultracentrifugação em gradiente de cloreto de céσιο -CsCl- de amostras de fezes de ratos.

Frações positivas para PBV em EGPA	Valor estimado de concentração proteica
47-7 (d= 1,385 g/ml)	0,213 mg/ml
47-8 (d= 1,425 g/ml)	0,195 mg/ml
48-7 (d= 1,38 g/ml)	0,205 mg/ml
48-8 (d= 1,425 g/ml)	0,162 mg/ml

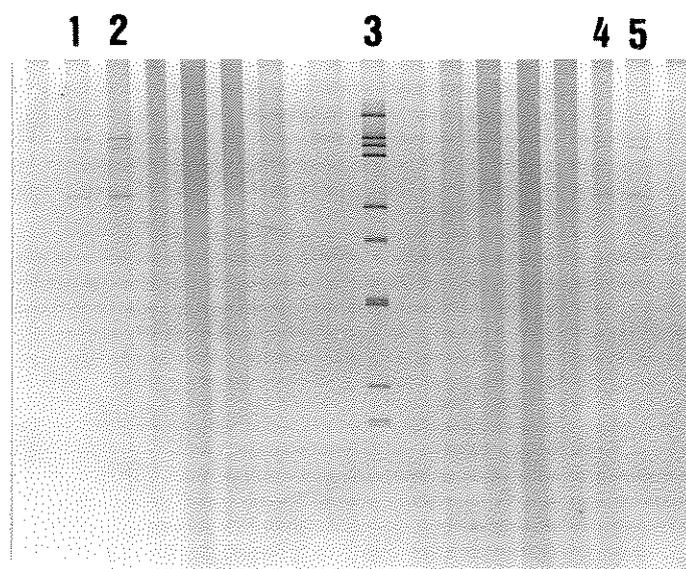


Figura 6 - Eletroforese em gel de poliacrilamida (EGPA) de RNAds de picobirnavirus obtidos a partir de frações coletadas após ultracentrifugação em gradiente de cloreto de céσιο (CsCl) de amostras de fezes de ratos.

Canaletas 1, 2 - RNAds de picobirnavirus (PBV) - notar mistura de dois PBV (Série 48)

Canaleta 3 - RNAds de rotavirus grupo A

Canaletas 4, 5 - RNAds de picobirnavirus (PBV) - Série 47

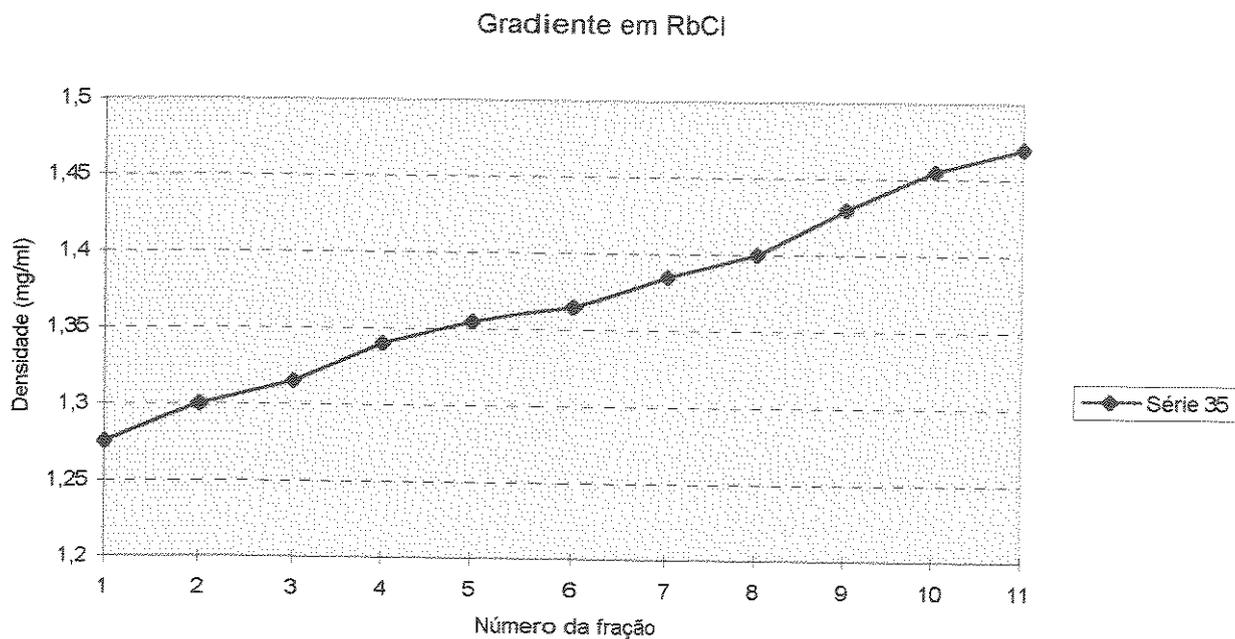


Figura 7 - Valores de densidade obtidos das frações coletadas após ultracentrifugação em gradiente de cloreto de rubídio (RbCl) de amostras de fezes suínas.

Frações positivas para PBV em EGPA	Valor estimado de concentração proteica
35-8 (d= 1,4 g/ml)	0,193 mg/ml
35-9 (d= 1,43 g/ml)	0,166 mg/ml

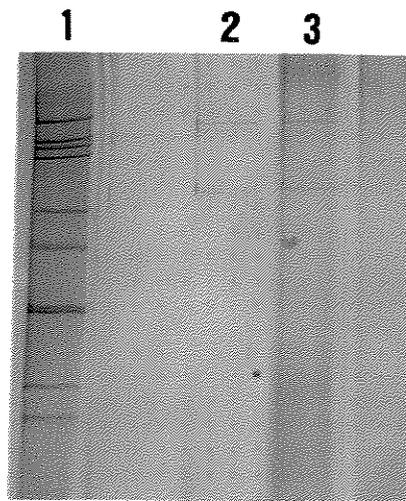


Figura 8 - Eletroforese em gel de poliacrilamida (EGPA) de RNAs de picobirnavirus obtidos a partir de frações coletadas após ultracentrifugação em gradiente de cloreto de rubídio (RbCl) de amostras de fezes suínas.

Canaleta 1 - RNAs de rotavírus grupo A

Canaletas 2, 3 - RNAs de picobirnavirus (PBV)

Após a verificação da presença do ácido nucleico viral em EGPA, sete amostras (sendo 4 suínas, 1 murina e 2 de tamanduá-bandeira) foram examinadas em microscópio eletrônico de transmissão no Instituto Adolfo Lutz, em São Paulo (SP). Foram visualizadas, tanto em amostras vindas de gradientes de CsCl como de gradientes de RbCl, partículas virais de diâmetros diferentes, uma com aproximadamente 21 nm e outra com aproximadamente 30 nm (figuras 9, 10 e 11), bem como algumas partículas sugestivas de bacteriófagos. Na figura 11 pode ainda ser visualizada uma partícula viral vazia.

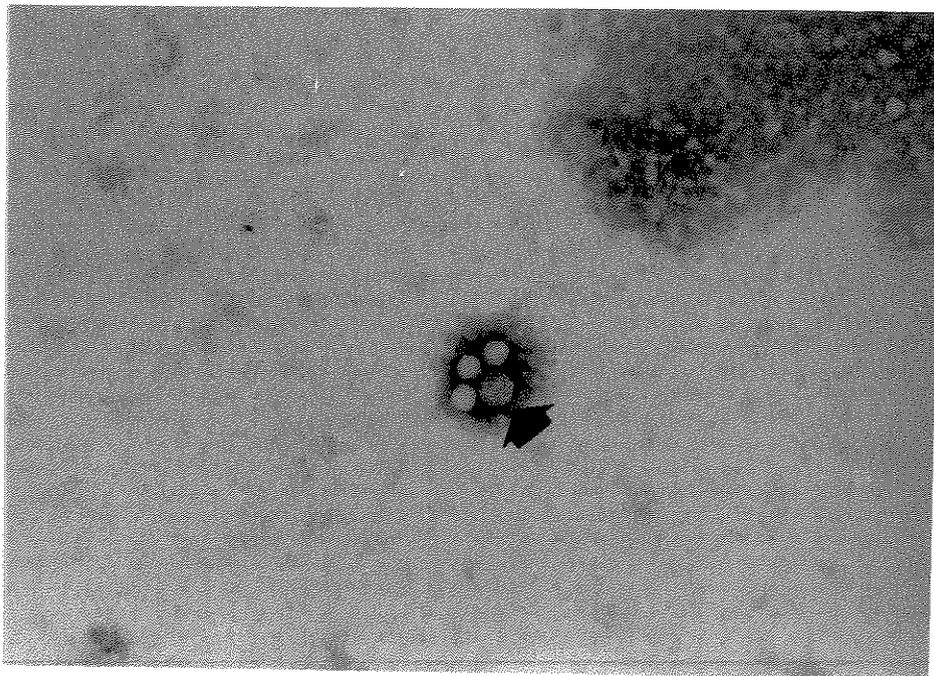


Figura 9 - Eletromicrografia de amostra positiva para PBV, obtida após ultracentrifugação em gradiente de cloreto de rubídio (RbCl). Amostra de fezes de suínos. Aumento de aproximadamente 170.000 vezes.

Partículas de aproximadamente 30 nm (seta) e 21 nm (as demais) de diâmetro.

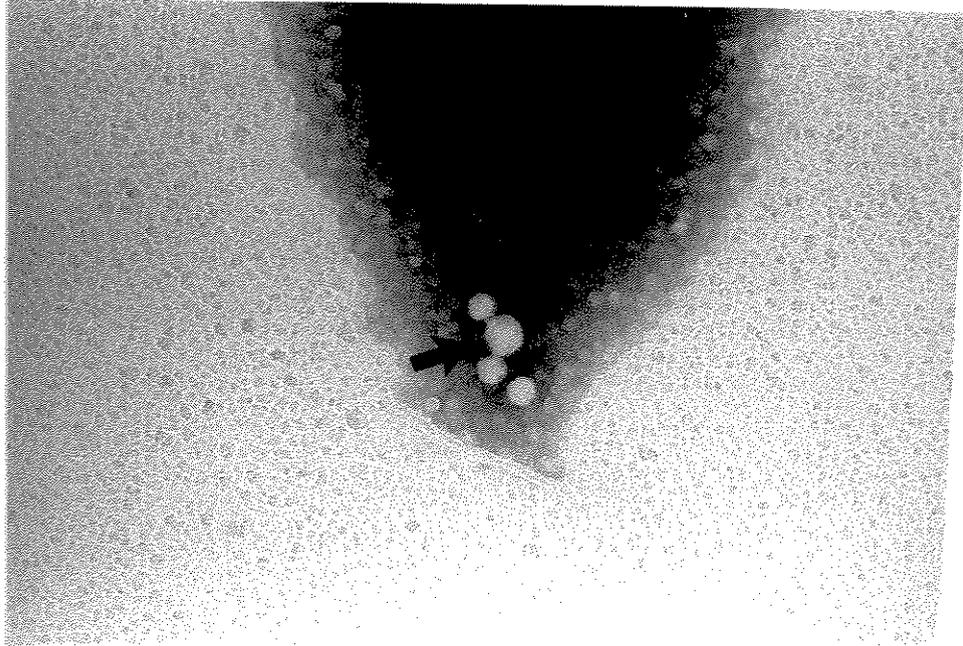


Figura 10 - Eletromicrografia de amostra positiva para PBV, obtida após ultracentrifugação em gradiente de cloreto de cézio (CsCl). Amostra de fezes de suínos. Aumento de aproximadamente 185.000 vezes.

Partículas de aproximadamente 30 (seta) nm e 21 nm (as demais) de diâmetro.

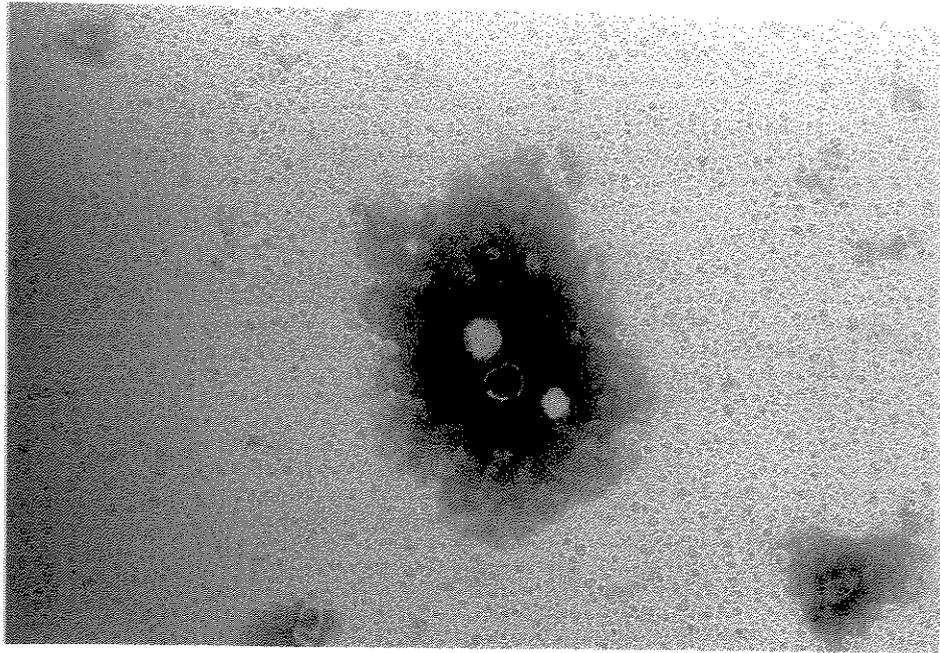


Figura 11 - Eletromicrografia de amostra positiva para PBV, obtida após ultracentrifugação em gradiente de cloreto de cério (CsCl). Amostra de fezes de ratos. Aumento de aproximadamente 185.000 vezes. Partículas virais de aproximadamente 30 (seta) e 21 nm de diâmetro, e ainda uma partícula viral vazia.

4.4-Resultados relativos a padronização da reação de “dot-blot”

O teste de “dot-blot”, descrito no item 3.12 de Material e Métodos, foi realizado com antissoro anti-picobirnavírus obtido conforme descrito em 3.10. Em ensaio imunoenzimático (3.11), o soro obtido apresentou um baixo valor de título, ao redor de 1:25.

A figura 12 ilustra o resultado obtido em um dos experimentos realizados. Na tabela 6 estão esquematizados os resultados verificados, em “dot-blot” e em EGPA, para 190 amostras de suspensões fecais de diferentes origens: suínas (151), murinas (30) e de tamanduá-bandeira (9). Deste total, 71 amostras foram positivas em ambos os testes e 91 negativas para ambos os testes. Foram encontradas 8 amostras negativas em “dot-blot” e positivas em EGPA e 20 amostras positivas em “dot-blot” e negativas em EGPA.

Foram obtidos valores de 89% de sensibilidade e 81% de especificidade, sendo os valores preditivos positivo e negativo de, respectivamente, 78 e 91%.

Na tabela 7, os resultados obtidos em “dot-blot” e EGPA são dispostos de acordo com a origem da amostra utilizada. Das 151 amostras suínas, 70 foram positivas e 81 negativas em “dot-blot”, enquanto que 57 foram positivas e 94 negativas em EGPA. Entre as 30 amostras murinas, 12 foram positivas e 18 negativas em “dot-blot”, em EGPA foram verificadas 13 amostras positivas e 17 negativas. Todas as 9 amostras de tamanduá-bandeira utilizadas foram positivas tanto em “dot-blot” como em EGPA.

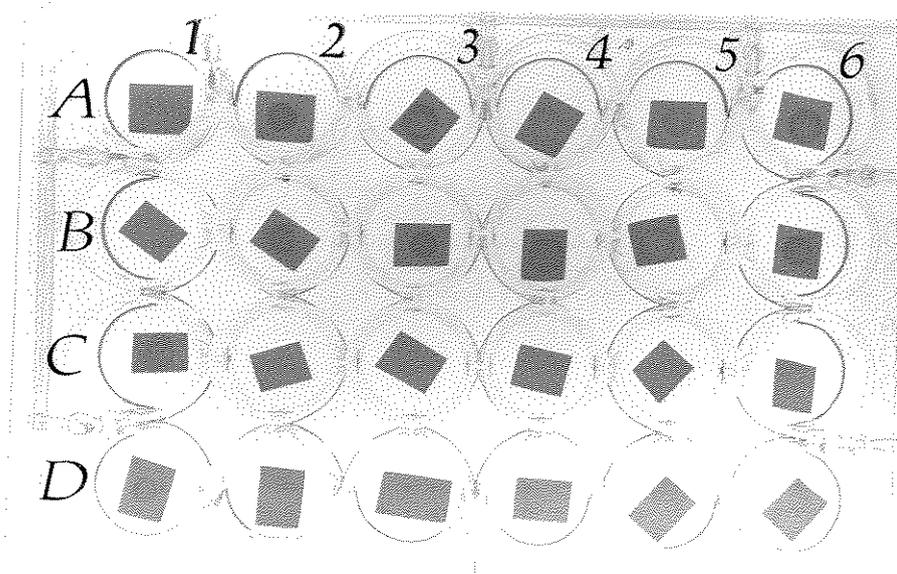


Figura 12 - Resultados, em “dot-blot”, de amostras fecais de diferentes origens, frente a antissoro anti-picobirnavírus.

- Poços A1 e B1 - Amostra de rotavírus SA-11 obtido em cultivo celular
- Poços A2 e B2 - Amostra de suspensão fecal suína positiva para PBV em EGPA
- Poços A3 e B3 - Amostra de suspensão fecal suína positiva para PBV em EGPA
- Poços A4 e B4 - Amostra de suspensão fecal suína positiva para PBV em EGPA
- Poços A5 e B5 - Amostra de suspensão fecal murina positiva para PBV em EGPA
- Poços A6 e B6 - Amostra de suspensão fecal de tamanduá positiva para PBV em EGPA
- Poços C1 e D1 - Amostra de suspensão fecal murina positiva para PBV em EGPA
- Poços C2 e D2 - Amostra de suspensão fecal suína negativa para PBV em EGPA
- Poços C3 e D3 - Amostra de suspensão fecal murina negativa para PBV em EGPA
- Demais poços - Controles do experimento

Tabela 6 - Resultados obtidos, nos testes de “dot-blot” (DOT) e eletroforese em gel de poliacrilamida (EGPA), a partir de 190 amostras fecais de ratos, suínos e tamanduás-bandeira.

	EGPA positivo	EGPA negativo	TOTAL
DOT positivo	71	20	91
DOT negativo	8	91	99
TOTAL	79	111	190

- Sensibilidade: 89%
- Especificidade: 81%
- Valor Preditivo Positivo: 78%
- Valor Preditivo Negativo: 91%

Tabela 7 - Resultados obtidos nos testes de “dot-blot” (DOT) e eletroforese em gel de poliacrilamida (EGPA), de acordo com a origem da amostra utilizada.

	Amostra Suína	Amostra Murina	Amostra Tamand.
	Positivo	Negativo	Positivo
DOT	70	81	12
EGPA	57	94	13

5. DISCUSSÃO

Pereira et al (42), em 1988, identificaram duas bandas de RNA dupla fita, utilizando a técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida (EGPA) para pesquisa de rotavírus em fezes de crianças. Estudos com amostras que continham este material revelaram partículas virais uniformes de aproximadamente 35 nm de diâmetro, conformação provavelmente icosaédrica e densidade entre 1,38 e 1,40 g/ml em gradiente de cloreto de cério (CsCl). Este pequeno (pico) vírus, cujo material genômico era composto por RNA bi-segmentado, recebeu o nome de picobirnavírus (PBV).

Os primeiros relatos de identificação do PBV ocorreram a partir de amostras fecais humanas (42) e de ratos de vida livre (43). Posteriormente, outros trabalhos mostraram a identificação do picobirnavírus em suínos (8,18,19,34,35,46), cobaias (44), aves (32) e coelhos (14,37). Vírus semelhantes foram, ainda, descritos em bovinos (52,53) e eqüinos (5). Outros estudos relataram, sob diferentes perspectivas, a presença do PBV em fezes humanas (6,15,16,22,36).

Vários aspectos da biologia destes vírus permanecem obscuros e apresentando dados conflitantes. Por exemplo, questões como a associação entre liberação do PBV nas fezes e ocorrência de diarreia (18,34) e a constituição proteica do PBV (19,35) permanecem sem dados conclusivos.

Dentre os estudos sendo realizados a respeito do PBV, podem ser destacados a utilização de diferentes técnicas de extração do RNA viral, a determinação do local da infecção por PBV e tentativas de propagação deste em culturas celulares.

Um dos aspectos não previamente estudados a respeito do PBV é sua distribuição na natureza. Na maior parte dos estudos publicados sobre este vírus, a identificação do mesmo ocorreu em amostras de fezes de animais de laboratório e/ou de interesse econômico ou, no caso das amostras

humanas, em ambientes hospitalares. Com a exceção dos ratos de vida livre (43), o PBV ainda não havia sido identificado em outros animais fora das características acima mencionadas.

A fim de pesquisar a existência de picobirnavírus em fezes de novos hospedeiros, foram coletadas amostras fecais dos animais pertencentes ao Parque Ecológico Municipal Cid A. Franco de Americana, São Paulo.

Foram identificadas, em EGPA, as bandas características do PBV a partir de suspensões fecais de tamanduá-bandeira (*Myrmecophaga tridactyla*), com a definição do tamanho dos segmentos genômicos do vírus encontrado. Através de regressão linear, e tomando como base de cálculo os valores estipulados por Estes e Cohen (13) para os segmentos de rotavírus SA-11, foram obtidos os valores de, aproximadamente, 1,9 e 2,3 kpb para os dois segmentos de RNA viral. Estas suspensões foram submetidos à metodologia de concentração por ultracentrifugação em colchão de sacarose e posterior purificação por ultracentrifugação em gradiente de cloreto de cério (CsCl).

As frações coletadas, após extração, foram analisadas em EGPA, com a verificação da presença das duas bandas típicas do PBV em frações com densidades aproximadas de 1,38 g/ml. Em microscopia eletrônica, foram encontradas partículas virais de, aproximadamente, 21 e 30 nm de diâmetro. A caracterização dos segmentos como RNA dupla-fita (ds) foi realizada através de digestão enzimática (43).

Esta descoberta pode auxiliar o melhor entendimento das condições observadas em tamanduás mantidos em zoológicos, já que há poucas informações disponíveis em relação às patologias que podem acometer estes animais (11,12). Em um dos raros trabalhos científicos publicados sobre tamanduás-bandeira (11), não há menção à pesquisa de vírus como possíveis causadores de gastroenterites, ainda que problemas do trato gastrointestinal sejam responsáveis por

26% das patologias encontradas em animais capturados. Apesar de não haver sido detectada correlação entre a liberação do PBV nas fezes e diarreia, a presença de vírus nas fezes é um importante parâmetro a ser considerado em futuros estudos sobre estes animais.

Um ponto importante a respeito da liberação do PBV em fezes de tamanduá-bandeira é o fato de que, ao longo de uma série de coletas semanais, houve detecção do vírus em praticamente todas as amostras. Não foi possível coletar as amostras individualmente, já que as fezes coletadas estavam no chão do recinto no qual vivem três animais. Pode-se inferir que pelo menos um destes animais apresentou um período longo de liberação do vírus nas fezes, o que caracterizaria uma infecção crônica. Tal fato foi também descrito em humanos (22), com um indivíduo HIV-positivo apresentando um período de dois meses de liberação do PBV nas fezes, não associado a casos de diarreia.

Este trabalho também levanta a hipótese da existência de mais animais hospedeiros para o PBV, sendo que alguns destes podem ser animais silvestres ou mesmo representar um possível reservatório natural para o vírus.

Este projeto, que continua em andamento no laboratório de Virologia, pode levar à descoberta de novos hospedeiros para o PBV, ou mesmo de um reservatório natural para o vírus, fatores importantes para o esclarecimento a respeito da origem e distribuição deste vírus, e de uma possível via de transmissão do mesmo para seres humanos e outros animais.

Para que os estudos a respeito do PBV tenham seqüência, é necessário que haja uma metodologia eficiente de concentração e purificação virais. É a partir deste ponto, por exemplo, que poderá ser feito o sequenciamento do RNA viral que, por sua vez, pode levar à padronização de um teste de reação em cadeia da polimerase (PCR) para detecção do PBV, cuja relevância será

novamente ressaltada adiante.

No presente estudo, foram utilizados três métodos de concentração viral: adição de cloreto de cálcio seguida de centrifugação (38), adição de polietilenoglicol (PEG) e cloreto de sódio (NaCl) seguida de centrifugação (3) e ultracentrifugação da suspensão fecal em colchão de sacarose.

As tabelas 2, 3 e 4 mostram os resultados obtidos nos experimentos de concentração e purificação virais, de acordo com a origem da amostra fecal utilizada. Inicialmente, torna-se necessário esclarecer que nem todos os métodos foram utilizados concomitantemente. Assim, por exemplo, no início da comparação entre os métodos de concentração, a utilização dos gradientes de cloreto de rubídio (RbCl), sacarose e tartarato como forma de purificação ainda não havia sido implementada, justificando a ausência destes experimentos junto à concentração por adição de cloreto de cálcio (CaCl₂). Quando o uso de cloreto de rubídio, sacarose e tartarato foi iniciado, o método de concentração por adição de cloreto de cálcio já havia sido descartado em função dos resultados negativos obtidos anteriormente.

Da mesma forma, não foram testados experimentos mesclando concentração por ultracentrifugação em colchão de sacarose a 30% e purificação em gradientes de sacarose e tartarato, em função dos resultados negativos obtidos com a utilização destes dois últimos gradientes. Observe-se que o único método de purificação presente em todos os experimentos foi aquele com a utilização do cloreto de cério (CsCl).

As amostras fecais de tamanduá-bandeira (tabela 4), por sua vez, foram incorporadas durante a execução do projeto, e, para fins de concentração e purificação, optou-se pela utilização conjunta de métodos que haviam apresentado resultados positivos com amostras de fezes das demais origens (murina e suína), ao lado de dois experimentos baseados na purificação em gradiente de tartarato.

Estes últimos, assim como para as amostras das outras duas origens, apresentaram resultados negativos, quando avaliados em EGPA para verificação da presença das bandas típicas do PBV.

De acordo com os dados das tabelas 2 e 3, percebe-se inicialmente que o método de concentração por adição de cloreto de cálcio mostrou-se ineficaz. Já os demais métodos de concentração apresentaram recuperação do PBV, após purificação, em ao menos dois dos sais utilizados para este fim, o cloreto de cério (CsCl) e o cloreto de rubídio (RbCl).

Em relação dos métodos de purificação, nota-se que não houve recuperação do vírus em experimentos nos quais foram empregados gradientes de sacarose e tartarato.

Em uma análise mais detalhada dos resultados obtidos nos experimentos de concentração e purificação, resumidos nas tabelas 2, 3 e 4, verifica-se que a primeira metodologia de concentração (adição de cloreto de cálcio), quando avaliada em EGPA para verificação da presença das duas bandas típicas do PBV, não se mostrou eficiente. Este resultado pode ser indicativo de que o cloreto de cálcio não teria a capacidade de precipitar o PBV ou mesmo de que este sal, na concentração utilizada nesta técnica, estaria, de alguma forma, influenciando na estabilidade da partícula viral (38).

As demais metodologias apresentaram recuperação do PBV quando avaliadas em EGPA. Verificou-se que, quando da utilização de PEG/ NaCl , ocorria, após a centrifugação, a formação de um precipitado denso que demandava um maior volume de tampão para sua ressuspensão, quando comparado ao mesmo volume necessário para ressuspensão do precipitado formado após a ultracentrifugação em colchão de sacarose.

Acrescentou-se então ao tampão 0,1% v/v de Triton X-100 (47), como forma de eliminar ao menos parte do material de origem lipídica acumulado no precipitado. Em função deste precipitado formado, tornava-se mais trabalhosa a manipulação do material. Por vezes, tornava-se necessário que

este material fosse submetido à ultracentrifugação em colchão de sacarose como forma de clarificação da amostra.

Apesar dos resultados obtidos em relação à recuperação do vírus (após realização da EGPA, parâmetro utilizado para fins de avaliação do processo de concentração), semelhantes para ambos os métodos, optou-se pela ultracentrifugação em colchão de sacarose como método de escolha para concentração do PBV a partir de suspensões fecais.

Como mencionado, havia uma maior dificuldade de manipulação do material submetido à concentração por PEG/NaCl em função das características do precipitado formado. Apesar da maior simplicidade deste método e de o mesmo não demandar o uso de ultracentrífuga, havia ainda a possibilidade de uma maior contaminação da amostra a ser submetida às técnicas de purificação, já que outros elementos, inclusive outros vírus e ainda bactérias, poderiam também estar sendo precipitados juntamente com o PBV (3), tornando necessário um passo de clarificação da amostra.

A ultracentrifugação em colchão de sacarose, além de ter se mostrado eficiente como método de concentração viral, também tem como característica a capacidade de clarificar a amostra (32).

Tanto a utilização da ultracentrifugação em colchão de sacarose a 45% como a 30% mostraram-se efetivas na recuperação do ácido nucleico viral quando avaliadas em EGPA. Por questões de praticidade, poder-se-ia recomendar o uso de uma solução de sacarose a 30%.

Com estes dados, passou-se então à avaliação dos quatro processos de purificação, as ultracentrifugações em gradientes de cloreto de céσιο (CsCl), cloreto de rubídio (RbCl), sacarose e tartarato (ácido tartárico, sal dipotássico)-glicerol (2). Buscou-se encontrar um procedimento alternativo para a utilização do cloreto de céσιο, que é amplamente empregado para fins de purificação viral (9,27,50). Este método foi o de escolha de todos os estudos já realizados com relação à

purificação do picobirnavírus (14,32,34,37,43,44).

No caso do gradiente de sacarose, o mesmo é pré-formado pela adição sucessiva de soluções contendo diferentes concentrações do açúcar, variando, no presente estudo, entre 5 e 25%. Após o período de ultracentrifugação, o valor máximo de densidade encontrado no gradiente foi de 1,17 g/ml, abaixo da faixa de densidade esperada para o PBV. Não houve, em EGPA, a detecção do ácido nucleico viral em nenhuma das frações coletadas. Em função destes pontos, a não detecção do ácido nucleico viral em EGPA e as baixas densidades finais encontradas, a utilização do gradiente de sacarose acabou sendo descartada.

Ainda como forma de busca de novas alternativas, foi implantada uma nova metodologia de purificação, baseada no trabalho desenvolvido por Ashley e Caul (2) para estudo de parvovírus, assim como o PBV também um vírus relativamente pequeno e muitas vezes presente em quantidades pequenas nas fezes (32).

Esta metodologia utiliza uma mistura de tartarato (ácido tartárico, sal dipotássico) e glicerol no lugar dos sais rotineiramente empregados em processos de purificação. No trabalho anteriormente mencionado (2), houve uma significativa melhora da recuperação de partículas de parvovírus com a utilização do gradiente de tartarato/glicerol. O gradiente é pré-formado, com a mistura de diferentes volumes de soluções-estoque das duas substâncias, sendo que a porção inferior do tubo recebe maior quantidade de solução de tartarato -o que confere maior densidade à mesma- e a porção superior recebe uma maior proporção de glicerol, conferindo maior viscosidade -e menor densidade- a esta parte do gradiente.

Os resultados obtidos com esta metodologia foram semelhantes aos verificados anteriormente em relação ao gradiente de sacarose: não houve detecção do ácido nucleico em EGPA e o valor

máximo de densidade observado (aproximadamente 1,41 g/ml) corresponde ao que seria esperado para o PBV (7). Este valor máximo foi obtido após modificações na metodologia original, inicialmente com o aumento da concentração de tartarato utilizada, diminuição da concentração de glicerol (que acabava por diluir o sal) e por fim a eliminação do glicerol, com a utilização apenas do tartarato para a preparação do gradiente.

Apesar dos resultados obtidos no trabalho original (2), não houve reprodutibilidade dos mesmos em relação ao PBV e esta metodologia acabou também sendo descartada.

A utilização dos gradientes de cloreto de rubídio (RbCl) e cloreto de céσιο (CsCl) apresentou melhores resultados. Os experimentos realizados com cloreto de rubídio apresentaram um valor máximo de densidade de solução (aproximadamente 1,48 g/ml) inferior ao valor encontrado para os experimentos que utilizaram cloreto de céσιο (aproximadamente 1,56 g/ml), mas este valor é superior àquele esperado para o PBV, o que não elimina o RbCl como uma possível alternativa para o CsCl. Houve detecção, em EGPA, do ácido nucleico viral a partir de frações coletadas em experimentos utilizando o cloreto de rubídio. As densidades das frações positivas para PBV em EGPA também concordam com os dados disponíveis na literatura (7,14,15,32,34,37,42,43,44).

A estimativa de concentração proteica realizada a partir de leituras espectrofotométricas (29) das frações positivas para PBV em EGPA apresentou valores que podem ser considerados baixos (item 4.3 de Resultados). Mesmo sendo uma metodologia pouco precisa como método de quantificação proteica, esta pode ser um parâmetro a mais em uma comparação entre a utilização dos dois sais. No presente trabalho, o valor médio encontrado nas frações obtidas em gradientes de cloreto de céσιο ($0,213 \pm 0,086$ mg/ml) foi maior do que aquele encontrado com a utilização do cloreto de rubídio ($0,187 \pm 0,033$ mg/ml).

Não se pode afirmar, com os dados obtidos, que um sal proporcione melhores resultados ou ainda que a partícula viral é mais estável em uma solução do que na outra. Para tais afirmações, seriam necessários testes com as partículas virais, como, por exemplo, a inoculação experimental em animais e verificação da sua infectividade. Para a realização de outros testes, torna-se necessário que a estrutura e composição do PBV estejam definidas.

No caso do rotavírus, que conta com esta definição, e que pode ser tomado como parâmetro para uma comparação com o PBV em função de algumas características que ambos os vírus têm em comum (ambos são vírus entéricos, constituídos por RNAs segmentado), há alguns fatores que podem influir tanto na estabilidade como na própria densidade da partícula viral quando em solução de cloreto de cério. Em primeiro lugar, linhagens diferentes do próprio vírus podem apresentar características distintas, sendo um vírus de determinada origem, por exemplo, mais estável, em relação à temperatura, que outro de origem diversa. Isto poderia ser causado pela variação de genes virais específicos (9).

A infectividade do vírus após a realização dos gradientes é outro fator a ser considerado. Um prolongado período de estocagem poderia acarretar perda de infectividade, que neste caso também poderia estar relacionada à temperatura. A própria exposição a uma concentração alta de sal (que ocorre em tais gradientes) poderia influir neste ponto, além de poder ser responsável por um possível processo de degradação da partícula. A integridade da partícula também pode ser afetada pela concentração de íons Ca^{2+} na solução. Quanto à densidade da partícula, a própria composição química do ácido nucleico viral pode influir. Assim, diferentes linhagens virais com diferentes proporções de bases GC poderiam apresentar diferentes densidades em CsCl. Uma outra possibilidade a ser estudada seria a permeabilidade dos vírus aos íons Cs^+ . No caso dos poliovírus, por exemplo, a densidade das

partículas aumenta significativamente na presença de CsCl (9).

Todos estes fatores, que foram aplicados ao estudo da estabilidade dos rotavírus em solução de cloreto de cézio, deveriam ser levados em consideração numa comparação entre o uso de CsCl e de RbCl. Para tanto, seria imprescindível que tanto a estrutura genética como a proteica do PBV estivessem claramente definidas, o que ainda não foi possível.

Já que ainda não se dispõe de um cultivo celular definido para o PBV, um possível estudo de infectividade viral poderia ser realizado através de inoculação experimental em ratos. Esta utilizaria partículas obtidas tanto a partir de gradientes de cloreto de cézio (CsCl) como de cloreto de rubídio (RbCl). Uma possível diferença de infectividade poderia ser detectada, o que sugeriria modificações na integridade do receptor viral, em função do sal utilizado no processo de purificação. No entanto, uma comparação mais acurada entre o uso de CsCl e RbCl para a purificação do PBV seria, na atual conjuntura, pouco viável. No entanto, pode-se sugerir a utilização do RbCl como método alternativo ao CsCl em protocolos de purificação não somente do PBV, mas também em casos nos quais haja dúvida sobre a estabilidade de uma determinada partícula viral em soluções de CsCl ou, como no exemplo do PBV, em casos nos quais a quantidade de informações a respeito da composição química do vírus é limitada.

Um dos possíveis parâmetros para a comparação entre soluções de RbCl e CsCl seria o estudo, em microscopia eletrônica (ME), das partículas virais obtidas nas frações coletadas dos gradientes de ambos os sais. Foram encontradas partículas sugestivas de PBV tanto em frações coletadas em gradientes de RbCl como de CsCl. Foi verificada a presença de partículas de diferentes diâmetros: uma maior, com o diâmetro de aproximadamente 30 nm, e uma menor, com o diâmetro aproximado de 21 nm. Em uma amostra também foi verificada a presença de uma provável partícula

viral vazia (figura 11).

A presença de partículas de diferentes tamanhos em amostras positivas para PBV foi anteriormente verificada em diferentes trabalhos (14,15). Foram verificadas variações no tamanho aproximado das partículas, de, respectivamente, 26 a 30 nm e de 35 a 41 nm. Diferentes hipóteses podem ser propostas para um eventual esclarecimento deste fato. Inicialmente, deve-se considerar que ambas as partículas apresentam a mesma densidade, ou uma densidade próxima o suficiente para não permitir uma separação das mesmas após ultracentrifugação em gradiente de cloreto de cério (CsCl) ou cloreto de rubídio (RbCl). Uma possibilidade seria o fato de o vírus apresentar duplo capsídeo. Assim, a maior partícula seria completa e a menor teria perdido o capsídeo externo.

Estas partículas poderiam ser, também, dois diferentes vírus, sendo o PBV apenas uma delas. O ácido nucleico do outro vírus poderia não ser detectado pelas metodologias utilizadas no laboratório, por não ser RNA dupla fita. Em outra hipótese, uma das partículas poderia ser um “PBV atípico” (APBV), conforme descrito por Gallimore et al (16), cujo eletroferótipo não seria detectado em EGPA em função de sua menor concentração na amostra.

Há, ainda, a possibilidade de uma destas partículas exercer uma função “helper”, sendo a outra uma partícula defectiva, o que tornaria fundamental sua presença e justificaria tanto a detecção de ambas as partículas em todas as amostras analisadas como a variação de tamanho encontrada (48).

Um fator verificado em todas as amostras, além da variação no tamanho das partículas, foi a pequena concentração das mesmas. Não foram encontrados aglomerados de partículas, com estas, em sua grande maioria, encontrando-se isoladas.

Este pequeno número de partículas pode justificar a não detecção do ácido nucleico viral em EGPA, fato ocorrido em vários experimentos (vide tabelas 2, 3 e 4). Inicialmente, um ponto a ser

considerado é o tempo de estocagem do material fecal utilizado nestes experimentos. As amostras são testadas em EGPA logo após sua chegada ao laboratório e, em caso de detecção das bandas do PBV, as mesmas são estocadas a 4°C. O tempo de estocagem poderia ser um fator limitante quanto à estabilidade da partícula, assim como a temperatura. Em alguns casos, uma amostra previamente testada e positiva para PBV em EGPA mostra-se, após um novo teste, negativa. Tal fato também ocorreu quando algumas alíquotas de amostras positivas foram mantidas a -20°C. A não recuperação do ácido nucleico viral após certo tempo de estocagem pode sugerir a existência de algum fator físico influenciando a estabilidade da partícula, o que é refletido posteriormente nos experimentos de purificação.

Amostras de fezes de ratos experimentalmente inoculados com PBV e mantidos conforme descrito no item 3.1 de Material e Métodos foram testadas em EGPA e, após a detecção do ácido nucleico deste vírus, submetidas ao processo de concentração por ultracentrifugação em colchão de sacarose e purificação por ultracentrifugação em gradiente de cloreto de césio. Após a determinação das frações positivas em EGPA, as mesmas foram lidas espectrofotômetro (260 e 280 nm) para estimativa da concentração proteica (29). O inóculo foi realizado em dois coelhos albinos, de acordo com a metodologia utilizada por H.G. Pereira (item 3.9 de Material e Métodos).

Com este procedimento, foi obtido um antissoro anti-PBV para utilização no teste seguinte, baseado em reações sorológicas, o “dot-blot”. Conforme anteriormente mencionado, o valor de título observado para este antissoro foi baixo (1:25), o que pode estar diretamente ligado ao fato de o PBV apresentar proteínas de baixo peso molecular, menos imunogênicas que proteínas de alto peso molecular, que desencadeariam uma resposta imune fraca, justificando o valor encontrado para o título do antissoro.

O teste de “dot-blot” foi implementado a partir das recomendações de Hawkes et al (24) e Gouvea et al (20). Algumas modificações foram feitas, como a não utilização de um antissor de captura, e sim a adsorção direta da amostra contendo o antígeno (no caso, suspensões fecais), diluído em tampão carbonato-bicarbonato pH 9,6, à membrana de nitrocelulose. O período de bloqueio com PBST contendo 5% de leite desnatado (PBSTL) foi, inicialmente, de uma hora. Os resultados mostravam indícios de ligações inespecíficas ocorrendo em toda a superfície da membrana, mesmo em partes sobre as quais não haviam sido aplicadas as amostras, fato que acarretou o aumento do período de bloqueio para um mínimo de 2 horas. O mesmo intervalo de tempo foi utilizado nos passos de incubação das membranas com o anticorpo primário e com o anticorpo secundário (conjugado com peroxidase).

As amostras utilizadas como antígeno foram: sobrenadante de cultura celular de rotavírus (RV) SA-11, suspensões fecais de amostras de fezes suínas, murinas e de tamanduá-bandeira, também positivas para PBV em EGPA, e suspensões fecais suínas e murinas negativas para ambos os vírus.

Os resultados obtidos em “dot-blot” foram comparados com as informações previamente disponíveis quanto à presença ou não, em EGPA, do ácido nucleico viral do PBV em suspensões fecais. Sendo a EGPA e o “dot-blot” testes distintos que visam a identificação de diferentes substâncias, ácidos nucleicos para o primeiro e determinados componentes de natureza proteica (componentes estes que podem ou não estar associados a partículas virais) para o segundo, não seria indicado comparar diretamente parâmetros como sensibilidade e especificidade das duas metodologias. Seus resultados devem, portanto, ser avaliados com critério, em função das características de cada técnica.

Conforme anteriormente mencionado, dispõe-se, atualmente, de dois métodos diagnósticos

para o picobirnavírus, a eletroforese em gel de poliacrilamida (EGPA), que detecta a presença das duas bandas típicas do RNA viral, e a microscopia eletrônica, com a observação de partículas virais sugestivas de picobirnavírus. Não há, ainda, métodos imunoenzimáticos que sejam rotineiramente usados para o diagnóstico deste vírus. Sendo este tipo de metodologia uma importante e difundida ferramenta utilizada para a detecção da presença de um determinado vírus (ou do anticorpo produzido contra o mesmo) em amostras biológicas diversas, procurou-se implementar um teste diagnóstico para identificação do PBV baseado em reações sorológicas, de realização e leitura simplificadas.

O “dot-blot” vem sendo utilizado como método diagnóstico em diferentes rotinas laboratoriais, indo desde a identificação de antígenos de parasitas como *Toxoplasma gondii* (4) à identificação de vírus entéricos (33), além de rotavírus e adenovírus (20), por exemplo. Baseado, assim como os ensaios imunoenzimáticos do tipo ELISA, em reações sorológicas, o “dot-blot” apresenta algumas vantagens em relação a estes últimos. Normalmente, este último é realizado em placas de poliestireno, sendo o antígeno (ou o anticorpo de captura, dependendo do ensaio) diretamente adsorvido a uma fase sólida, no caso parte da própria superfície da placa. Sua realização demanda uma série de lavagens que, ao contrário do “dot-blot” (no qual estas podem ser realizadas manualmente), muitas vezes requerem um aparelho próprio para este fim. Outra vantagem do “dot-blot” é a leitura visual dos resultados, sem a necessidade de um aparelho de leitura espectrofotométrica. A soma deste fatores torna o “dot-blot” um teste de realização mais simples e de custo mais baixo em relação ao ELISA, justificando sua escolha. Outro ponto favorável à utilização do “dot-blot” será discutido adiante.

Um exemplo do valor diagnóstico do “dot-blot” foi descrito recentemente por Nunamaker et al (40), em estudo realizado com o vírus “bluetongue” (BTV). Os pesquisadores verificaram que tanto o “dot-blot” quanto o ELISA apresentavam rendimentos semelhantes no

diagnóstico da infecção deste vírus em seu vetor, uma espécie de mosquito (*Culicoides variipennis sonorensis*). A utilização de imunoeletromicroscopia mostrou melhores resultados que os testes anteriormente mencionados, mas os próprios autores ressaltam a importância dos custos dos testes quando da definição da metodologia diagnóstica, maiores no caso da microscopia e equivalentes para “dot-blot” e ELISA. No entanto, o primeiro conta com as mesmas vantagens, em relação ao segundo, já descritas no parágrafo anterior.

Foram testadas, em “dot-blot”, 190 amostras de suspensões fecais estocadas no laboratório de Virologia, previamente analisadas em EGPA quanto à presença do ácido nucleico do PBV. Destas amostras, como mostrado no quadro 1, 71 mostraram-se positivas e 91 negativas, para ambos os testes. Foram encontradas 8 amostras negativas em “dot-blot” e positivas em EGPA e 20 amostras positivas em “dot-blot” e negativas em EGPA.

Conforme mencionado, estes testes são distintos quanto à metodologia e princípio, tornando necessário novamente ressaltar o propósito da implementação do teste de “dot-blot”, que é ter à disposição um teste simplificado para triagem das amostras fecais. Partindo deste ponto, utilizou-se a EGPA como confirmação ou não da presença do PBV na amostra, e a partir da comparação de seus resultados com os verificados no “dot-blot”, foram obtidos os valores de sensibilidade e especificidade deste último. Deve-se salientar, portanto, que, para fins de cálculo de tais valores, considerou-se o resultado em EGPA como confirmatório ou não da presença do PBV em uma determinada amostra.

Foram obtidos valores de 89% e 81% para, respectivamente, valores de sensibilidade e especificidade do teste de “dot-blot”. O valor preditivo positivo do teste foi de 78% e o valor preditivo negativo de 91%.

De acordo com os dados apresentados na tabela 7, observa-se que a discordância dos resultados obtidos nas duas metodologias (“dot-blot” e EGPA), encontra-se fundamentalmente

nas amostras suínas. Em primeiro lugar, deve-se considerar o maior número destas amostras em relação às outras duas amostras utilizadas.

Um segundo fator seria a própria origem da amostra fecal utilizada como inóculo para a obtenção do antissoro anti-PBV, uma amostra murina. De acordo com os resultados mostrados na tabela 7, verifica-se que, em relação à utilização de amostras fecais murinas e de tamanduás-bandeira, há uma maior correlação entre os resultados obtidos em “dot-blot” e EGPA do que aquela verificada para as amostras suínas. Mesmo com o menor número de amostras de fezes destas espécies (em relação ao número de amostras suínas), pode-se considerar a possibilidade de o PBV murino possuir mais antígenos em comum com o PBV de tamanduás-bandeira do que com o PBV suíno, o que poderia explicar a maior discordância de resultados verificada com a utilização de amostras fecais suínas.

Nas amostras suínas poderia, ainda, estar presente um maior número de outros componentes proteicos que poderiam estar reagindo com o antissoro, contribuindo para as variações encontradas para estas amostras, componentes estes muitas vezes detectados pela EGPA. Novamente ressalta-se a possibilidade de o PBV possuir proteínas de baixo peso molecular, que provocariam uma reação imune fraca, levando ao baixo valor encontrado para o título do antissoro e, conseqüentemente, a um maior número de reações inespecíficas.

Uma análise inicial dos resultados mostrados na figura 6 poderia acabar determinando o abandono do mesmo como método diagnóstico, mas alguns pontos devem ser lembrados. Testes que identifiquem, *per se*, com 100% de sensibilidade e 100% de especificidade, a presença de um determinado antígeno ou anticorpo fazem parte de um número extremamente reduzido de casos (21). No caso da utilização conjunta de dois testes, o que é aqui proposto em relação ao “dot-blot” e à EGPA, deve-se ter em mente o fato de que um dos testes (EGPA) funciona basicamente como confirmatório do resultado do outro (“dot-blot”).

Na utilização conjunta de dois ou mais testes diagnósticos, requer-se que o mais específico seja utilizado como teste confirmatório (21,51). Em função de suas características, considera-se a EGPA um método altamente específico para detecção de RNA dupla fita, fato que, ressaltado pelas características próprias do RNA dupla fita do PBV (genoma bisegmentado, equimolar e com eletroferótipo definido), fazem com que esta metodologia seja a indicada para confirmação dos resultados do “dot-blot”. Além disto, a metodologia de impregnação do gel pela prata é capaz de detectar limites de cerca de 300 a 400 pg de RNA (25), conferindo uma boa sensibilidade à EGPA.

Sendo o propósito fundamental da implementação do “dot-blot” a obtenção de um teste que possa ser usado para fins de triagem e/ou exclusão de amostras negativas, é indicado que este teste seja basicamente sensível. A redução dos valores de especificidade pode ser aceitável particularmente em casos nos quais não há outros testes disponíveis com melhores indicadores (21). Um ponto a ser considerado neste caso é, mais uma vez, o baixo valor de título verificado para o antissoro obtido, o que pode aumentar o número de reações inespecíficas e, conseqüentemente, o número de resultados falso-positivos em um ensaio sorológico. Deve-se salientar, no entanto, a não reação cruzada entre o antissoro e as amostras positivas para rotavírus incluídas como controles nos testes de “dot-blot”.

Quando um determinado teste diagnóstico é avaliado, deve-se ter definido o propósito básico do mesmo, se confirmar ou excluir uma determinada possibilidade (21). No primeiro caso, é indicada a escolha de um teste mais restritivo, o que equivaleria a uma maior especificidade e uma menor sensibilidade. No segundo caso, se o propósito do teste é a exclusão de uma possibilidade, é indicado que o mesmo tenha maior sensibilidade em detrimento de sua especificidade.

No caso da implementação do “dot-blot”, buscou-se um método alternativo de

diagnóstico da presença do picobirnavírus em amostras fecais que pudesse ser utilizado como triagem anteriormente à realização do teste em EGPA. Assim, o propósito básico do teste é excluir amostras negativas, sendo as positivas posteriormente confirmadas ou não pela EGPA. De tal forma, o “dot-blot” pertence à categoria de testes na qual a sensibilidade é o principal fator a ser considerado, ao lado do valor preditivo negativo.

A EGPA já foi, em estudos anteriores (22) considerada mais eficiente que a microscopia eletrônica para a detecção de PBV a partir de amostras fecais. Além disto, esta vem sendo a metodologia de escolha para o diagnóstico da presença de PBV em uma amostra fecal. Visando a identificação do ácido nucleico viral, a técnica demanda a realização de um procedimento de extração do ácido nucleico a partir da amostra, resultando em um maior tempo gasto para sua execução do que o necessário para a realização do “dot-blot”.

A realização do teste de “dot-blot” mostrou-se confiável como método inicial de diagnóstico da presença do PBV em uma amostra fecal. A implantação deste método na rotina laboratorial conta ainda com outros pontos favoráveis, a começar pela possibilidade de utilização de outras amostras além de suspensões fecais, como material provindo de lavagem intestinal.

Além do seu valor diagnóstico, os resultados obtidos nos testes de “dot-blot”, no qual o mesmo antissoro reagiu com amostras de fezes dos três animais utilizados (ratos, suínos e tamanduás-bandeira), sugerem que os vírus presentes nestes animais possam apresentar antígenos em comum, um importante ponto a ser considerado em futuros estudos sobre diferenças antigênicas entre picobirnavírus de diferentes origens.

Conforme mencionado anteriormente, há uma série de estudos sendo realizados a respeito do picobirnavírus e um dos principais diz respeito ao sequenciamento de seu RNA. Para que isto seja possível, torna-se necessária a existência de métodos eficazes de concentração e purificação virais, que possam fornecer material suficiente para realização de tal técnica. Tendo em mãos ao

menos parte da seqüência do RNA viral, pode-se construir uma sonda que tornaria viável a implementação de um teste de reação em cadeia da polimerase (PCR), aliado à transcriptase reversa (RT-PCR). Este método poderia também ser utilizado como forma de identificação da presença do PBV em amostras fecais, aliado aos já existentes: EGPA, microscopia eletrônica e “dot-blot”.

Exemplos recentes mostram que ensaios imunoenzimáticos do tipo “dot-blot” também podem ser utilizados para a detecção de proteínas virais, com a utilização de anticorpos monoclonais, como no caso da proteína não estrutural nsP2 do Semliki Forest vírus (30), ou ainda para fins de quantificação proteica (1,26), além do já citado exemplo de utilização do método de “dot-blot” para diagnóstico viral, ao lado de outros ensaios, relatado por Nunamaker et al (40) para detecção do vírus “bluetongue” (BTV) em mosquitos (*Culicoides variipennis sonorensis*).

De tal forma, além de seu valor diagnóstico, a implementação da técnica do “dot-blot” pode vir a ter outras aplicações futuras no que se refere ao estudo do PBV, justificando sua padronização e utilização.

Ainda há uma série de trabalhos a serem realizados para que se consiga uma mais completa definição das características estruturais e antigênicas do PBV, bem como da epidemiologia de sua infecção e de seu papel etiológico. Esta definição passa pelos aspectos discutidos no presente trabalho, como a definição de hospedeiros naturais para o vírus, o estabelecimento de métodos eficazes de concentração e purificação virais e a implementação de novos métodos de diagnóstico.

A continuidade dos estudos a respeito deste novo vírus pode levar ao reconhecimento de uma nova família, tendo em vista o fato de que as características do PBV não se encaixam em nenhum dos taxons virais já definidos, o que seria um importante ponto dentro dos estudos sobre origem e filogenia dentro da Virologia.

6. CONCLUSÕES

- Este é o primeiro relato de identificação de picobirnavírus (PBV) em fezes de um animal silvestre (tamanduá-bandeira, *Myrmecophaga tridactyla*) mantido em cativeiro, o que pressupõe a existência de outros hospedeiros naturais para o vírus.

- Dentre as metodologias de concentração viral a partir de suspensões fecais, os resultados mais expressivos foram obtidos com a ultracentrifugação em colchão de sacarose a 30 ou 45%.

- A utilização dos gradientes de sacarose e tartarato mostrou-se ineficiente.

- A utilização do cloreto de rubídio (RbCl) como método alternativo ao cloreto de céσιο (CsCl) em protocolos de purificação do PBV mostrou-se eficiente.

- O teste de “dot-blot” implementado representa o primeiro relato de um ensaio imunoenzimático para detecção do PBV em suspensões fecais.

- Apesar de ter apresentado valores relativamente baixos de especificidade e predição positiva, o “dot-blot” pode ser utilizado como um teste de triagem em uma rotina diagnóstica, ao lado de um teste confirmatório como a eletroforese em gel de poliacrilamida (EGPA).

7. APÊNDICE

Tabela 8 - Tabela binária para cálculos de valores de sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo e valor preditivo negativo dos resultados obtidos em teste de “dot-blot” em relação aos obtidos por eletroforese em gel de poliacrilamida (EGPA).

	EGPA positivo	EGPA negativo
“Dot-blot” positivo	a	b
“Dot-blot” negativo	c	d

Sensibilidade: $a/a+c$

Especificidade: $d/b+d$

Valor Preditivo Positivo: $a/a+b$

Valor Preditivo Negativo: $d/c+d$

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ÅGREN, U.M.; TAMMI, R. & TAMMI, M. A dot-blot assay of metabolically radiolabeled hyaluronan. **Anal. Biochem.** 217:311-315, 1994.
2. ASHLEY, C.R. & CAUL, E.O. Potassium tartrate-glycerol as a density gradient substrate for separation of small, round viruses from human feces. **J. Clin. Microbiol.** 16:377-381, 1982.
3. BEARDS, G.M. A method for the purification of rotaviruses and adenoviruses from faeces. **J. Virol. Methods** 4:343-352, 1982.
4. BROOKS, R.G.; SHARMA, S.D. & REMINGTON, J.S. Detection of *Toxoplasma gondii* antigens by a dot-immunobinding technique. **J. Clin. Microbiol.** 21:113-116, 1985.
5. BROWNING, G.F.; CHALMERS, R.M.; SNODGRASS, D.R.; BATT, R.M.; HART, C.A.; ORMAROD, S.E.; LEADON, D.; STONEHAM, S.J. & ROSSDALE, P.D. The prevalence of enteric pathogens in diarrhoeic thoroughbred foals in Britain and Ireland. **Equine Vet. J.** 23:405-409, 1991.
6. CASCIO, A.; BOSCO, M.; VIZZI, E.; GIAMMANCO, A.; FERRARO, D. & ARISTA, S. Identification of picobirnavirus from faeces of Italian children suffering from acute diarrhea. **Eur. J. Epidemiol.** 12:545-547, 1996.

7. CHANDRA, R. Picobirnavirus, a novel group of undescribed viruses of mammals and birds: a minireview. *Acta Virologica* **41**:59-62, 1997.
8. CHASEY, D. Porcine picobirnavirus in UK. *Vet. Rec.* **126**:465, 1990.
9. CHEN, D. & RAMIG, R.F. Determinants of rotavirus stability and density during CsCl purification. *Virology* **186**:228-237, 1992.
10. COX, G.J.; MATSUI, S.M.; LO, R.S.; HINDS, M.; BOWDEN, R.A.; HACKMAN, R.C.; MEYER, W.G.; MORI, M.; TARR, P.I.; OSHIRO, L.S.; LUDERT, J.E.; MEYERS, J.D. & McDONALD, G.B. Etiology and outcome of diarrhea after marrow transplantation: a prospective study. *Gastroenterology* **107**:1398-1407, 1994.
11. DINIZ, L.S.M.; COSTA, E.O. & OLIVEIRA, P.M.A. Clinical disorders observed in anteaters (Myrmecophagidae, Edentata) in captivity. *Vet. Res. Com.* **19**:409-415, 1995.
12. ELLIS, J. & ELLIS, G. Animal collections in Brazilian zoological parks. *Int. Zoo Yb.* **27**:192-216, 1988.
13. ESTES, M.K. & COHEN, J. Rotavirus gene structure and function. *Microbiol. Rev.* **53**:410-449, 1989.

14. GALLIMORE, C.; LEWIS, D. & BROWN, D. Detection and characterization of a novel bisegmented double-stranded RNA virus (picobirnavirus) from rabbit faeces. **Arch. Virol.** **133**:63-73, 1993.
15. GALLIMORE, C.I.; APPLETON, H.; LEWIS, D.; GREEN, J. & BROWN, D.W.G. Detection and characterisation of bisegmented double-stranded RNA viruses (picobirnaviruses) in human faecal specimens. **J. Med. Virol.** **45**:135-140, 1995.
16. GALLIMORE, C.I.; GREEN, J.; CASEMORE, D.P. & BROWN, D.W.G. Detection of a picobirnavirus associated with *Cryptosporidium* positive stools from humans. **Arch. Virol.** **140**:1275-1278, 1995.
17. GALLO, D.; DIGGS, J.L.; SHELL, G.R.; DAILEY, P.J.; HOFFMAN, M.N. & RIGGS, J.L. Comparison of detection of antibody to the acquired immune deficiency syndrome virus by enzyme immunoassay, immunofluorescence and Western blot methods. **J. Clin. Microbiol.** **23**:1049-1051, 1986.
18. GATTI, M.S.V.; PESTANA DE CASTRO, A.F.; FERRAZ, M.M.G.; FIALHO, A.M. & PEREIRA, H.G. Viruses with bisegmented double-stranded RNA in pig faeces. **Res. Vet. Sci.** **47**:397-398, 1989.
19. GATTI, M.S.V. Picobirnavirus: um novo vírus animal? Características gerais, infecção experimental em ratos e estudos epidemiológicos em suínos. Tese de Doutorado. Escola Paulista de Medicina (Universidade Federal de São Paulo), 1994.

20. GOUVEA, V.S.; de CASTRO, L. & PEREIRA, H.G. A combined dot nitrocellulose-enzyme immunoassay for rotavirus and adenovirus. **J. Virol. Methods** 18:57-65, 1987.
21. GRINER, P.F.; MAYEWSKI, R.J.; MUSHLIN, A.I. & GREENLAND, P. Selection and interpretation of diagnostic tests and procedures: principles and applications. **Ann. Intern. Med.** 94:553-600, 1981.
22. GROHMANN, G.S.; GLASS, R.I.; PEREIRA, H.G.; MONROE, S.S.; HIGHTOWER, A.W.; WEBER, R. & BRYAN, R.T. Enteric viruses and diarrhea in HIV-infected patients. **N. Engl. J. Med.** 329:14-20, 1993.
23. GROS, C. & WENGLER, C. Large scale purification of Rubella virus and the isolation of native viral core protein. **Arch. Virol.** 140:757-764, 1995.
24. HAWKES, R.; NIDAY, E. & GORDON, J. A dot-immunobinding assay for monoclonal and other antibodies. **Anal. Biochem.** 119:142-147, 1982.
25. HERRING, A.J.; INGLIS, N.F.; OJEH, C.K.; SNODGRASS, D.R. & MENZIES, J.D. Rapid diagnosis of rotavirus infection by direct detection of viral nucleic acid in silver stained polyacrylamide gels. **J. Clin. Microbiol.** 16:473-477, 1982.
26. JAHN, R.; SCHIEBLER, W. & GREENGARD, P. A quantitative dot-immunobinding assay for proteins using nitrocellulose membrane filters. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 81:1684-1687, 1984.

27. JIANG, B.M.; SAIF, L.J.; KANG, S.Y. & KIM, J.H. Biochemical characterization of the structural and nonstructural polypeptides of a porcine group C rotavirus. **J. Virol.** 64:3171-3178, 1990.
28. JUANG, R.H.; CHANG, Y.D.; SUNG, H.Y. & SU, J.C. Owendrying method for polyacrylamide gel slab packed in cellophane sandwich. **Anal. Biochem.** 141:348-350, 1984.
29. KALCKAR, H.M. Differential spectrophotometry of purine compounds by means of specific enzymes. **J. Biol. Chem.** 167:461-475, 1947.
30. KUJALA, P.; RIKKONEN, M.; AHOLA, T.; KELVE, M.; SAARMA, M. & KÄÄRIÄINEN, L. Monoclonal antibodies specific for Semliki Forest virus replicase protein nsP2. **J. Gen. Virol.** 78:343-351, 1997.
31. LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature (London)** 227:680-685, 1970.
32. LEITE, J.P.G.; MONTEIRO, S.P.; FIALHO, A.M. & PEREIRA, H.G. A novel avian virus with trisegmented double-stranded RNA and further observations on previously described similar viruses with bisegmented genome. **Virus Res.** 16:119-126, 1990.

33. LOH, P.C.; DOW, M.A. & FUJIOKA, R.S. Use of nitrocellulose-enzyme immunosorbent assay for rapid, sensitive and quantitative detection of human enteroviruses. **J. Virol. Methods** 12:225-234, 1985.
34. LUDERT, J.E.; HIDALGO, M.; GIL, F. & LIPRANDI, F. Identification in porcine faeces of a novel virus with a bisegmented double-stranded RNA genome. **Arch. Virol.** 117:97-107, 1991.
35. LUDERT, J.E. & LIPRANDI, F. Picobirnavirus de porcos. In: Anais do VI Encontro Nacional de Virologia. São Lourenço, MG, 1992.
36. LUDERT, J.E. & LIPRANDI, F. Identification of viruses with bi- and trisegmented double-stranded RNA genome in faeces of children with gastroenteritis. **Res. Virol.** 144:219-224, 1993.
37. LUDERT, J.E.; ABDUL-LATIFF, L.; LIPRANDI, A. & LIPRANDI, F. Identification of picobirnavirus, viruses with bisegmented double stranded RNA, in rabbit faeces. **Res. Vet. Sci.** 59:222-225, 1995.
38. MOLITOR, T.W.; JOO, H.S. & COLLETT, M.S. Porcine parvovirus: virus purification and structural and antigenic properties of virion polypeptides. **J. Virol.** 45:842-854, 1983.

- 39.MURPHY, F.A.; FAUQUET, C.M.; BISHOP, D.H.L.; GHABRIAL, S.A.; JARVIS, A.W.; MARTELLI, G.P.; MAYO, M.A. & SUMMERS, M.D. Virus Taxonomy. Classification and Nomenclature of Viruses. Sixth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Springer, Wien New York (**Arch. Virol. Suppl.** 10), 1995.
- 40.NUNAMAKER, R.A.; MECHAM, J.O.; WIGINGTON, J.G. & ELLIS, J.A. Bluetongue virus in laboratory-reared *Culicoides variipennis sonorensis*: applications of dot-blot, ELISA and immunoelectron microscopy. **J. Med. Entomol.** 34:18-23, 1997.
- 41.PEREIRA, H.G.; AZEVEDO, R.S.; LEITE, J.P.G.; ANDRADE, Z.P. & de CASTRO, L. A combined enzyme immunoassay for rotavirus and adenovirus (EIARA). **J. Virol. Methods** 10:21-28, 1985.
- 42.PEREIRA, H.G.; FIALHO, A.M.; FLEWETT, T.H.; TEIXEIRA, J.M.S. & ANDRADE, Z.P. Novel virus in human faeces. **Lancet** **ii**: 103-104, 1988.
- 43.PEREIRA, H.G.; FLEWETT, T.H.; CANDEIAS, J.A.N. & BARTH, O.M. Virus with bisegmented double-stranded RNA in rats faeces. **J. Gen. Virol.** 69:2749-2754, 1988.
- 44.PEREIRA, H.G.; de ARAÚJO, H.P.; FIALHO, A.M.; de CASTRO, L. & MONTEIRO, S.P. A virus with bisegmented double-stranded RNA genome in guinea pig intestines. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz** 84:137-140, 1989.
- 45.PEREIRA, H.G. Double-stranded RNA viruses. **Sem. Virol.** 2:39-53, 1991.

46. PONGSUWANNA, Y.; TANIGUCHI, K.; CHIWAKUL, M.; URASAWA, T.; WAKASUGI, F.; JAYAVASU, C. & URASAWA, S. Serological and genomic characterization of porcine rotaviruses in Thailand: detection of a G10 porcine rotavirus. **J. Clin. Microbiol.** **34**:1050-1057, 1996.
47. RODITI, I.; WYLER, T.; SMITH, N. & BRAUN, R. Virus-like particles in *Eimeria nieschulzi* are associated with multiple RNA segments. **Mol. Biochem. Parasitol.** **63**:275-282, 1994.
48. ROUX, L.; SIMON, A.E. & HOLLAND, J.J. Effects of defective interfering viruses on virus replication and pathogenesis *in vitro* and *in vivo*. **Adv. Virus Res.** **40**:181-211, 1991.
49. SAMMONS, O.W.; ADAMS, L.D. & MISHIKAWA, E.E. Ultrasensitive silver base color staining of polypeptides in polyacrylamide gels. **Electrophoresis** **2**:135-141, 1981.
50. TAI, J.H.; CHANG, S.C.; CHOU, C.F. & ONG, S.J. Separation and characterization of two related giardaviruses in the parasitic protozoan *Giardia lamblia*. **Virology** **216**:124-132, 1996.
51. van der GROEN, G.; VERCAUTEREN, G. & PIOT, P. Immunofluorescence tests for HIV antibody and their value as confirmatory tests. **J. Virol. Methods** **17**:35-43, 1987.
52. VANOPDENBOSCH, E. & WELLEMANS, G. Birna-type virus in diarrhoeic calf faeces. **Vet. Rec.** **125**:610, 1989.

53. VANOPDENBOSCH, E. & WELLEMANS, G. Bovine birna type virus: a new etiological agent of neonatal calf diarrhoea? *Vlaams Diergeneeskd. Tijdschr.* **59**:137-140, 1990.
54. WEISS, S.H.; GOEDERT, J.J.; SARNGADHARAN, M.G.; BODNER, A.J.; GALLO, R.C. & BLATTNER, W.A. Screening test for HTLV-III antibodies: specificity, sensitivity and applications. *J. Am. Med. Assoc.* **253**:221-225, 1985.