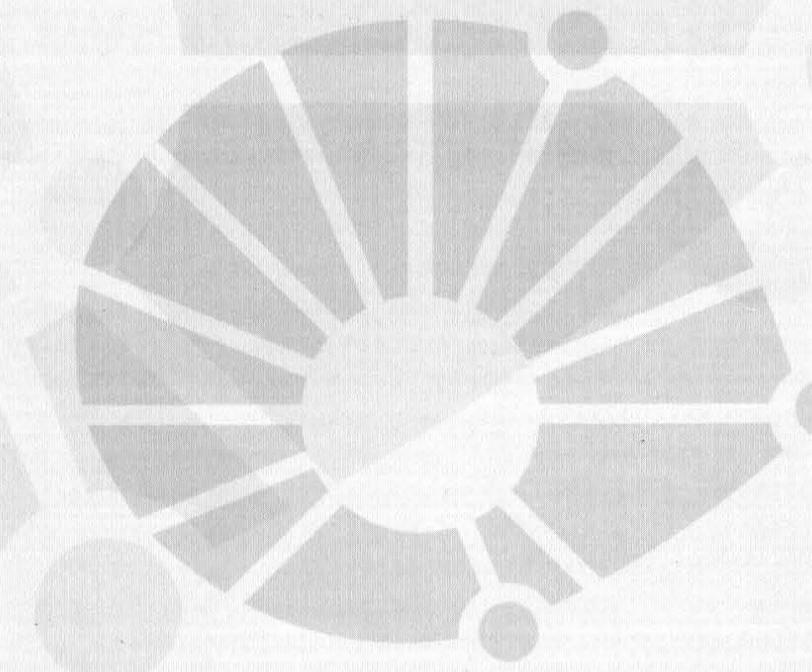


**UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE
CAMPINAS**

BC/43338

IB/81587



UNICAMP

INSTITUTO DE BIOLOGIA

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Helena Gallicchio Domingues

**VÍRUS RESPIRATÓRIO SINCICIAL
BOVINO: PADRONIZAÇÃO E
COMPARAÇÃO DE TÉCNICAS
SOROLÓGICAS**

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida pelo (a) candidato (a) Helena Gallicchio Domingues
e aprovada pela Comissão Julgadora. 20/10/2000

Tese apresentada ao Instituto de Biologia para obtenção do título de Mestre em Genética e Biologia Molecular na Área de Microbiologia

Orientadora: Prof. Dra. Clarice Weis Arns

2000

UNIDADE	IB/85587
N.º CHAMADA:	T/UNICAMP
V.	D713v
Ex.	
TOMBO BC	43338
PROC.	278/2000
C	<input type="checkbox"/>
D	<input checked="" type="checkbox"/>
PREC.	R\$ 11,00
DATA	30/12/2000
N.º CPD	

CM-00153368-1

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA - UNICAMP**

D713v

Domingues, Helena Gallicchio

Vírus respiratório sincicial bovino: padronização e comparação de técnicas sorológicas/Helena Gallicchio Domingues. - - Campinas-SP. [s.n.], 2000.

62f: ilus.

Orientadora: Clarice Weis Arns

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

1. Vírus respiratório sincicial bovino. 2. Dot-Elisa. 3. Soroneutralização
I. Arns, Clarice Weis. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto
de Biologia. III. Título

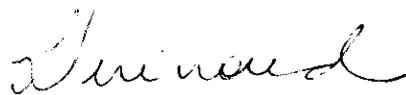
Data da Defesa: 17/10/2000

Banca Examinadora

Profa. Dra. Clarice Weis Arns



Profa. Dra. Liana Maria Cardoso Verinaud



Profa. Dra. Maria da Glória Buzinaro



Profa. Dra. Lucila Costallat Ricci

Aos

meus pais,

Nei e Diana

Pelo amor e constante incentivo,

mesmo que distantes.

Às minhas irmãs

Cláudia e Manoela

Pelo apoio, confiança e carinho; dedico este trabalho.

O presente trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Virologia do Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Biologia da UNICAMP, Campinas, São Paulo, em colaboração com o Laboratório de Imunologia Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Biologia da UNICAMP, Campinas, São Paulo.

AGRADECIMENTOS

À Prof. Dra. Clarice Weis Arns pela orientação, crédito e apoio durante toda a elaboração desta tese e, pela oportunidade e confiança à mim depositada.

A Profa. Dra. Dagmar Ruth Stach-Machado pela paciência e valiosas sugestões oferecidas.

Aos meus pais que souberam incentivar, valorizar e respeitar meu propósito de concluir esta dissertação.

Às minhas irmãs, Cláudia e Manoela pelo amor, incentivo e amizade.

Aos meus Avós, José Antônio e Dinah pelo carinho e por sempre acreditarem em mim.

Aos meus "pusti Pais", Cláudia e Paulo e, às minhas "pusti irmãs", Mariana e Stefânia por terem sido minha família aqui em Campinas.

Ao Milan pelo amor, carinho e apoio nos momentos mais difíceis.

Às minhas "amigas de infância" Lia, Renata, Regina e Luciane pela amizade, companheirismo e pela ajuda durante a realização deste trabalho.

A Família Zelenika por ter me acolhido.

À Família Martins pelos preciosos conselhos e pelos momentos de convívio.

Aos meus amigos de Caxias do Sul, que nunca me deixaram sozinha e que ocupam um lugar especial na minha vida.

Aos colegas de pós-graduação e professores do Departamento de Microbiologia e Imunologia, IB, UNICAMP, que pela amizade e ensinamentos contribuíram para o nascimento desta tese.

Ao funcionário Geneci Davi Fernandes pela valiosa contribuição e colaboração na fase experimental deste trabalho.

Aos animais que tiveram sua vida sacrificada em prol da ciência.

À FAPESP, pelo auxílio prestado, pela concessão de uma bolsa de mestrado para execução deste trabalho.

A todos que sempre acreditaram em mim e que de alguma maneira acreditaram neste trabalho.

ABSTRACT

DOMINGUES, H.G. 2000 Vírus Respiratório Sincicial Bovino (BRSV): Desenvolvimento e padronização de técnicas sorológicas. Tese de Mestrado, Departamento de Microbiologia e Imunologia, Instituto de Biologia, UNICAMP, República Federativa do Brasil.

Two Enzyme-Linked Immunosorbent Assay techniques (dot-ELISA e S-ELISA) were developed to detection of antibodies against Bovine Respiratory Syncytial Virus (BRSV). The antigen was produced in Chicken Embryo Related (CER) continuous cell line, inoculated with virus strain, BRSV-25-BR, isolated in Brazil, and it was processed by centrifugation through a discontinue sucrose gradient (30-55% p/v). Four hundred twenty-three bovine serum samples were analised by the standard test of serum neutralization (SN), and 67,8% were positive. Dot-ELISA test was standardized, utilizing 0,7 µg of purified BRSV protein per nitrocelulosis disc, and 3,0 µg per well in the S-ELISA test. The dot-ELISA test detected 71,6% of positives serum samples, showing a sensitivity of 92,3% and a specificity of 71,3%. The S-ELISA test, detected 72,5% of positive serum samples, with a sensitivity of 91,6% and specificity by 68,4%. These results show that dot-ELISA and S-ELISA tests may be an option to detect anti-BRSV antibodies in labarotory and field.

RESUMO

DOMINGUES, H.G. 2000 Vírus Respiratório Sincicial Bovino (BRSV): Desenvolvimento e padronização de técnicas sorológicas. Tese de Mestrado, Departamento de Microbiologia e Imunologia, Instituto de Biologia, UNICAMP, República Federativa do Brasil.

Neste trabalho foram adaptados e padronizados dois ensaios imunoenzimáticos (dot-ELISA e S-ELISA), para auxiliar no diagnóstico do vírus respiratório sincicial bovino (BRSV). A amostra viral padrão, BRSV-25-BR isolada no Brasil foi utilizada nos dois ensaios, tendo sido produzida em célula CER e processadas por ultracentrifugação em gradiente descontínuo de sacarose 30-55% (v/v). Foram analisadas 423 amostras de soros coletados nos principais centros de bovinocultura do país, as quais foram submetidas ao teste padrão de soroneutralização (SN), onde 67,8% das amostras foram positivas. A técnica de dot-ELISA, utilizando 0,7µg de proteína purificada por disco, detectou 71,6% de amostras positivas, apresentando uma sensibilidade de 92,3% e especificidade de 71,3%. O teste de S-ELISA, utilizando 3,0 µg de proteína bruta por poço, detectou 72,5% de amostras positivas, com sensibilidade de 91,6% e especificidade de 68,4%. Por meio dos dados coletados, valida-se os testes de S-ELISA e dot-ELISA para a detecção de anticorpos anti-BRSV como alternativa para o uso em laboratório e no campo.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO.....	1
OBJETIVOS	7
1. MATERIAL E MÉTODOS.....	8
1.1. OBTENÇÃO DE SOROS DE BOVINOS PARA OS TESTES SOROLÓGICOS.....	8
1.1.1. Amostras de Campo	8
1.1.2. Controle Positivo/ Negativo.....	8
1.2. VÍRUS E CÉLULAS	9
1.2.1. Amostras Virais	9
1.2.2. Cultivos Celulares:.....	9
1.3. PRODUÇÃO DE ANTÍGENO BRUTO	10
1.4. CONCENTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO VIRAL.....	11
1.5. DETERMINAÇÃO DO TÍTULO INFECTANTE VIRAL.....	11
1.6. DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO PROTÉICA.....	12
1.7. PRODUÇÃO DOS SOROS HIPERIMUNES POLICLONAIS	12
1.7.1. Imunização de Coelhos.....	12
1.8. TESTES SOROLÓGICOS	14
1.8.1. Padronização da Técnica de dot- ELISA.....	14
1.8.2. Padronização da Técnica de S-ELISA (ELISA "sandwich").....	16
1.8.3. Teste de Soroneutralização (SN).....	19
1.9. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	20
1.9.1. Determinação da Sensibilidade, Especificidade e Valores Preditivos.....	20
1.9.2. Determinação do Índice de Concordância Kappa (κ).....	22
2. RESULTADOS.....	23
2.1. OBTENÇÃO DOS SOROS COLETADOS	23
2.2. TITULAÇÃO	24
2.2.1. Titulação da Amostra Viral Bruta e Purificada.....	24
2.3. CONCENTRAÇÃO PROTÉICA.....	25
2.4. PRODUÇÃO DE SOROS HIPERIMUNES POLICLONAIS	25
2.5. PADRONIZAÇÃO DOS TESTES IMUNOENZIMÁTICOS	25
2.5.1. Teste Imunoenzimático dot- Elisa.....	25
2.5.2. Teste Imunoenzimático S- Elisa.....	26
2.6. ANÁLISE COMPARATIVA ENTRE OS TESTES DE SORONEUTRALIZAÇÃO, DOT-ELISA E S-ELISA.....	28
2.6.1. Análise da Positividade.....	28
2.6.2. Análise da Especificidade e Sensibilidade.....	30
2.6.3. Análise dos Valores Preditivos Positivos e Negativos	32
2.6.4. Determinação do índice de concordância Kappa (κ).....	33
3. DISCUSSÃO.....	34
4. CONCLUSÕES	41
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	42

INTRODUÇÃO

O vírus respiratório sincicial bovino (Bovine Respiratory Sincitial Virus-BRSV) é classificado como membro do gênero *Pneumovirus*, família *Paramyxoviridae* e subfamília *Pneumovirinae*. No mesmo gênero também estão incluídos os vírus da doença respiratória sincicial humana (HRSV), pneumonia dos camundongos, rinotraqueíte dos perus (TRT) e síndrome da cabeça inchada das galinhas (SHS), (STOTT & TAYLOR, 1985; PICAULT, 1989).

As partículas virais são arredondadas, mas bastante pleomórficas, medindo 80 a 500 nm e apresentam envelope com projeções de 12 nm, e na sua maioria incompletas e provavelmente não infecciosas (MALLIPEDDI *et al.*, 1990).

A infectividade é perdida por ação do clorofórmio, tripsina (0,25%) e dioxicolato de sódio (0,1%). Inativa-se a pH 3,0 , é estável a pH 4,0 , termolábil, com vida média de 0,5 a 2,8 minutos a 56°C, de 1 a 7 horas a 37°C e estável à -50°C por vários meses (STOTT & TAYLOR, 1985 e MALLIPEDDI *et al.*, 1990).

O genoma viral codifica 10 proteínas, 8 estruturais e 2 não estruturais. Existem duas glicoproteínas maiores, G e F, sendo a glicoproteína G responsável pela adsorção da partícula viral à célula hospedeira e a glicoproteína F promove a penetração da partícula à célula hospedeira e dispersão do vírus entre as células por fusão celular (BAKER & VELICER, 1991). Além destes componentes virais, possuem ainda fosfoproteínas (P), proteínas do nucleocápside (N), proteínas matrizes (M e M2), proteínas hidrofóbicas menores (SH), proteínas maiores (L) e proteínas não estruturais (1B e 1C) (MALLIPEDDI *et al.*,1990).

O BRSV é um dos agentes mais importantes nas enfermidades respiratórias e está distribuído mundialmente, causando severas infecções (SAMAL & ZAMORA, 1991). O BRSV foi primeiramente isolado na Suíça em 1970, por PACCAUD & JACQUIER, no Japão por INABA *et al.*, (1972) e nos Estados Unidos por ROSENQUIST (1974) e ROSSI & KIESEL (1974).

Os sintomas clínicos desta enfermidade são semelhantes a outras doenças respiratórias, tais como aumento de temperatura, apatia e inapetência. O desenvolvimento de pneumonia intersticial é um evento ocorrente e, pode evoluir para broncopneumonia acompanhada de rinite e tosse. Portanto, existe a dificuldade de se detectar a infecção nos estágios iniciais, onde a doença produz sintomatologia de forma mais aguda e menos persistente (KIMMAN *et al.*, 1988; JACOBS & EDINGTON, 1975).

A infecção pode durar de 3 a 10 dias, dependendo das infecções secundárias. Nos casos acompanhados de broncopneumonia, a taxa de mortalidade é elevada (PIRIE *et al.*, 1981). Aos exames de necrópsia, os tecidos se caracterizam por apresentar áreas com falta de dilatação nos bronquíolos necrosados. As complicações incluem edema intersticial, enfisema intersticial e uma pneumonia catarral ou fibrinosa causada por uma invasão bacteriana secundária. A quantidade de gás presente no sangue revela uma severa hipóxia em bezerros afetados (SHARMA & WOLDEHIWET, 1990a & 1992a).

Apesar da severa manifestação da enfermidade em infecções naturais, tem sido difícil reproduzi-la experimentalmente em bezerros (VERHOEFF *et al.*, 1988; VAN den INGH *et al.*, 1982). Por esta razão, existem muitos estudos experimentais utilizando-se de ovelhas, por elas apresentarem similaridade fisiológica com os bovinos, susceptibilidade,

baixo custo e menor tempo de geração (SHARMA & WOLDEHIWET, 1990b & VERHOEFF *et al.*, 1985).

O BRSV é um agente amplamente distribuído, e que produz enormes perdas na criação comercial do rebanho bovino, chegando em casos extremos a atingir mortalidades de até 30% entre bezerros de 0-6 meses de idade (BRYSON *et al.*, 1991), desempenhando um importante papel como agente iniciador do complexo de doenças respiratórias em bovinos (STEINHAGEN & HUEBERT, 1995; AMES, 1993). A infecção com BRSV é um evento comum, corroborado por altas percentagens de animais com títulos de anticorpos para BRSV (DUBOVI, 1993).

Nos países onde a infecção parece ser um evento comum, é alta a porcentagem de bovinos com anticorpos para BRSV, como é demonstrado na França com 50% soropositivos, até 90% na Inglaterra, e entre 65% até 81% nos Estados Unidos (AMES, 1993).

No Brasil, o vírus foi detectado pela primeira vez por GONÇALVES *et al.* (1993) através de imunofluorescência em corte de tecido congelado, a partir de pulmões de bezerros obtidos em frigoríficos no Rio Grande do Sul. O isolamento e identificação viral foi realizado por CAMPALANS & ARNS (1995) a partir de 33 amostras de secreções nasotraqueais inoculadas sucessivamente em cultura de células CER e MDBK, de bezerros com sintomas respiratórios procedentes do Rio Grande do Sul, a qual foi denominada BRSV-25-BR.

Relatos sorológicos sobre a presença do BRSV no Brasil foram realizados por CAMPALANS & ARNS (1994; 1997), com 864 amostras de soros procedentes dos estados do sul e sudeste do país através dos testes de soroneutralização (SN) e ensaio imunoenzimático (ELISA). Ambos os testes mostraram um alto nível de positividade anti-BRSV (68% e 75% respectivamente) com diferença significativa ($p < 0.05\%$). Não foram observadas grandes

diferenças entre as regiões estudadas, entretanto observou-se uma ligeira tendência a uma maior soropositividade em maiores latitudes. Animais jovens apresentaram índices maiores de soropositividade (média 85%), sendo o teste de SN o mais sensível nessa faixa etária, refletindo a maior susceptibilidade a infecções primárias dos bezerros em relação a animais adultos. A alta prevalência de título de anticorpos para todas as viroses respiratórias, reflete a ampla dispersão natural destes microrganismos (KIMMAN *et al.*, 1987; COLLINS *et al.*, 1993).

O BRSV é um importante patógeno de bovinos, sendo a sua detecção, ainda um desafio. Dificuldades são freqüentes no diagnóstico laboratorial incluindo os problemas no seu isolamento e qualidade dos reagentes utilizados. Além disso, nos bezerros a resposta sorológica é influenciada por anticorpos maternos (DUBOVI, 1993).

O teste sorológico padrão para detecção de anticorpos específicos contra BRSV é o teste de soroneutralização (SN), realizado em microplacas e leva em média de 5 a 7 dias (DUBOVI, 1993). Outros testes como a fixação de complemento, imunofluorescência direta para detecção de anticorpos e imunodifusão têm sido desenvolvidos, porém, pouco utilizados.

O título de neutralização viral é dado pela recíproca da mais alta diluição do soro, capaz de inibir o efeito citopático de 100 DICC 50% do vírus (AL-DARRAJI *et al.*, 1982).

O teste de SN tem sido empregado, embora apresente fatores limitantes como quantidade de antígeno e cultivo prévio de células, o que resulta em uma metodologia trabalhosa e demorada, com possibilidades de reações cruzadas (CHERNESKY, 1996).

O uso do ensaio imunoenzimático (ELISA) para estudar as respostas sorológicas à viroses respiratórias em bovinos foi introduzido por GILLETTE (1983), demonstrando sensibilidade e especificidade bem como adaptação à automação (FLORENT & MARNEFFE,

1986). O ELISA tem a vantagem de ser mais rápido, detectar a resposta de Imunoglobulina do tipo M (IgM) e eliminar o problema associado a diagnósticos de bezerros que não apresentam diferenças significativas nos níveis de anticorpos pré e pós- infecção devido a interferência dos anticorpos maternos (WESTENBRINK & KIMMAN, 1987; DUBOVI, 1993). Além disso, outros testes imunoenzimáticos podem ser feitos selecionando o tipo de imunoglobulina a ser usada (M, G, E, A) segundo o interesse do pesquisador.

A técnica de ELISA tem sido amplamente utilizada em todo o mundo no diagnóstico de infecções em medicina veterinária, sendo que na maioria dos testes é empregado o sistema de enzima cromogênica-substrato (HILDEBRAND, 1979; WRIGTH *et al.*, 1993). O princípio básico consiste na reação de soros testes com antígeno previamente aderido à superfície dos poços de microplacas. A presença do anticorpo no soro teste é demonstrada pela adição de anti- imunoglobulina, marcada com enzima, seguido por ensaio da reação enzima com o seu substrato. Deste modo, o método indireto possui uma relação positiva entre a intensidade de cor produzida e a quantidade de anticorpos ligados (WRIGTH, 1987). Outras vantagens apontadas no uso da técnica é que ela, além de poder ser automatizada, possui reagentes estáveis, tornando sua execução mais rápida e econômica, o que possibilita o exame de um grande número de amostras e seu emprego em levantamentos sorológicos de rotina. A principal desvantagem da técnica é encontrada na necessidade de se utilizar equipamento próprio para a leitura.

SANTOS *et al.* (1996) e, mais recentemente PARIMAL & VENUGOPALAN (1999), desenvolveram um dot- ELISA para detectar anticorpos anti- vírus da doença de Newcastle. Estes verificaram que o teste oferece rapidez, sensibilidade, especificidade e principalmente simplicidade, podendo ser realizado em condições de temperatura ambiente e

não requerendo equipamento especializado para sua leitura. A técnica constitui-se de um imunoensaio em fase sólida, que pode ser usado tanto na detecção de antígenos quanto de anticorpos. Contém o mesmo princípio básico do ELISA, ou seja, o antígeno ou anticorpo é imobilizado por adsorção a um suporte sólido, como, por exemplo, a nitrocelulose (PAPPAS *et al.*, 1986).

Dada a importância do BRSV, a complexidade do diagnóstico e a ocorrência de novos casos em forma de surtos em algumas regiões do Brasil, nos últimos anos, foram propostos neste trabalho o desenvolvimento e a padronização de ensaios imunoenzimáticos para a detecção de anticorpos anti- BRSV.

Considerando que, o ELISA tem como fator limitante para a sua execução a necessidade de sucessivas e demoradas purificações antigênicas, bem como o uso de equipamentos caros, com a possível perda da partícula viral, quando submetidas às forças centrífugas elevadas, procuramos desenvolver a reação de ELISA indireto com anticorpo de captura ("sandwich ELISA").

Também desenvolvemos uma outra técnica de o ELISA modificada (dot- ELISA). Essa, segundo PAPPAS *et al.* (1984), tem sido utilizada com sucesso no diagnóstico de diversas infecções causadas por protozoários e tende a ser promissora no diagnóstico de infecções de origem bacteriana e viral.

Em face do exposto e, levando-se em consideração que os "Kits" de ELISA utilizados em nosso país para o diagnóstico de BRSV, são importados, decidimos empreender a presente investigação, que tem como objetivo fundamental padronizar e avaliar comparativamente os métodos de S-ELISA e dot-ELISA, para a detecção de anticorpos nos rebanhos nacionais contra o BRSV.

OBJETIVOS

Esta tese de MESTRADO visou contribuir para a melhoria das condições sanitárias dos rebanhos, através da adaptação de testes imunoenzimáticos, enfocando os seguintes aspectos :

- Adaptação dos ensaios imunoenzimáticos (S-ELISA e DOT-ELISA) para a detecção de anticorpos anti-BRSV em soros de bovinos,
- Estabelecimento da relação entre os dois testes quanto a especificidade e sensibilidade na detecção de anticorpos anti-BRSV,
- Análise da viabilidade dos ensaios imunoenzimáticos por nós adaptados e padronizados frente a diferentes amostras de soros bovinos coletadas.

1. MATERIAL E MÉTODOS

1.1. OBTENÇÃO DE SOROS DE BOVINOS PARA OS TESTES SOROLÓGICOS

1.1.1. Amostras de Campo

Para as análises sorológicas foram realizadas colheitas de sangue procedentes dos principais centros de bovinocultura do país.

Os soros colhidos foram centrifugados a 1.500g por 10 minutos, inativados (56°C por 30 minutos), aliquotados e estocados a temperatura de -20°C até o momento de uso.

1.1.2. Controle Positivo/ Negativo

Os soros de bovinos utilizados como controles positivo e negativo para os testes imunoenzimáticos são provenientes da coleção de soros do laboratório de Virologia Animal, Depto. de Microbiologia e Imunologia, instituto de Biologia, UNICAMP.

1.2. VÍRUS E CÉLULAS

1.2.1. Amostras Virais

O trabalho foi desenvolvido com uma amostra brasileira de Pneumovírus bovino, denominada BRSV-25-BR, procedente de bezerros do Rio Grande do Sul com sintomas respiratórios isolada após passagens em célula MDBK e CER (CAMPALANS e ARNS, 1995). A suspensão viral foi utilizada para a obtenção de antígeno bruto para a realização das técnicas de purificação e titulação viral, e ainda para a adaptação desenvolvimento e padronização dos testes sorológicos.

1.2.2. Cultivos Celulares:

Foram utilizadas linhagens contínuas de células CER (Chicken Embryo Related). A linhagem CER foi doada pelo Prof. Dr. H. M. Hafez (Freie Universitat Berlin, Alemanha). Esta célula resultou da mistura de cultura primária de embrião de galinha com célula renal de Hamster, (SMITH *et al.*, 1977).

As células foram cultivadas em garrafas de 75 cm² (Corning®), com 2x10⁵ células/ml (concentração inicial) em meio mínimo essencial Eagle (MMEE-Cultilab®) com 10% de SFB (soro fetal bovino, Sigma Chemical Company®) por 24 h a 37°C.

A amostra viral foi adaptada ao crescimento em células CER após passagens sucessivas, segundo a metodologia recomendada por CAMPALANS & ARNS (1997).

1.3. PRODUÇÃO DE ANTÍGENO BRUTO

A amostra viral foi inoculada em garrafas (Corning®) contendo células CER após formação completa da monocamada celular (aproximadamente 24 horas após o repique). O meio de crescimento foi eliminado e as células lavadas com solução salina tamponada com fosfato (PBS); e então, inoculado 0,01 a 0,1 DICC₅₀/ml da amostra viral. Após uma hora de adsorção viral a 37°C, o inóculo foi eliminado, e adicionou-se 25 ml de MMEE .

O material foi incubado em estufa à uma temperatura de 37°C e as culturas observadas diariamente em microscópio de fase invertida (Axiovert 100, Carl Zeiss®) para observação do efeito citopático (ECP) característico, isto é, formação de sincício e arredondamento celular (BUYS *et al.*, 1989).

Com a observação de 80 % de ECP na monocamada após 5 a 7 dias, as garrafas infectadas foram congeladas a - 70 °C e após alguns dias descongeladas, agitadas e centrifugadas em tubos estéreis (Centrífuga GS6R, Beckman Instruments®) a 3.000 g por 10 minutos. Os sobrenadantes foram aliquotados em frascos de 2.0 ml (Corning®) e armazenados à -70°C em biofreezer (Beckman Instruments®), realizando-se sempre a titulação viral para obtenção do título da amostra de cada isolado viral.

1.4. CONCENTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO VIRAL

Os procedimentos de GOUGH & COLLINS (1989) foram adotados, com modificações pertinentes para a purificação da amostra brasileira de BRSV. A suspensão viral, previamente clarificada, foi centrifugada a 30.000 g por 1 hora a 4°C (Centrífuga Beckmann® modelo L 2-21), concentrando a amostra.

Para a purificação, o sedimento obtido foi ressuspensão, em aproximadamente 2% do volume inicial de cada amostra viral, com tampão TRIS-Cálcio (pH 7.2) e, então, cuidadosamente adicionado sobre um gradiente descontínuo de sacarose (Merck®). Para o gradiente foram utilizados 7 ml da concentração de 30% (p/v) e 2 ml da concentração de 55% (p/v) de sacarose (preparadas a partir de uma solução estoque 66% em tampão TRIS-Cálcio).

O vírus foi "peletizado" a 53.000 g por 1 hora e 30 minutos a 4°C (Ultra-centrífuga Beckmann® modelo L 8-80 M). Em seguida, com o auxílio de uma seringa de 3 ml, retirou-se a banda viral localizada na junção com a concentração de sacarose 55% (p/v).

A fração colhida foi novamente centrifugada e "peletizada" a 30.000 g por 1 hora a 4°C; o sedimento foi ressuspensão em tampão TRIS-Cálcio (aproximadamente em 0,5% do volume inicial) e armazenado a -70°C, em alíquotas de 0,1 ml.

1.5. DETERMINAÇÃO DO TÍTULO INFECTANTE VIRAL

A amostra de BRSV foi titulada em placas de poliestireno de 96 cavidades (Corning®). As titulações foram sempre realizadas em 8 repetições e o título (DICC₅₀)

calculado pelo método de REED & MUENCH (1938). Em cada placa adicionou-se 50 µl de MMEE nas cavidades destinadas à titulação viral e 100 µl nas cavidades destinadas ao controle de células. Foram realizadas em tubos de ensaio diluições de razão constante igual a 10 (10^{-1} a 10^{-8}) de cada isolado viral. Em seguida, foram adicionados 50 µl de cada diluição em cada cavidade da placa de microtitulação no total de 8 cavidades por diluição e adicionados 100 µl de uma suspensão de células CER (2×10^5 células/ml). A incubação foi realizada em estufa de atmosfera úmida de CO₂ a 37°C (Forma Scientific[®]) por 5 dias. As leituras foram realizadas através da constatação de ECP em microscópio invertido (Carl Zeiss[®]).

1.6. DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO PROTÉICA

A concentração protéica das amostras foi determinada através da metodologia de LOWRY (1951) utilizando soroalbumina bovina como amostra padrão (Sigma[®]).

1.7. PRODUÇÃO DOS SOROS HIPERIMUNES POLICLONAIS

1.7.1. Imunização de Coelhos

Foram utilizados 4 coelhos machos da raça Nova Zelândia. Os animais foram submetidos a uma coleta de sangue antes da inoculação, sendo estas amostras utilizadas como

controle negativo (testadas previamente através do teste de soroneutralização, conforme descrito no item 1.8.3.).

O inóculo constou de vírus purificado emulsionado em igual volume com adjuvante de Freund Completo (ACF) e Incompleto (AIF) (Gibco®). O vírus purificado foi emulsionado em igual volume de Adjuvante Completo e Incompleto de Freund. O plano experimental seguiu o esquema de imunização indicado na Tabela 1.

Os soros obtidos foram centrifugados a 3.000 x g por 10 minutos, inativados (56°C por 30 minutos), aliquotados e mantidos a -20°C até o momento de uso.

TABELA 1. Esquema de imunização dos coelhos com as amostras de BRSV:

DIA	INÓCULO (antígeno + adjuvante)	VOLUME (ml)	CONCENTRAÇÃO PROTÉICA (µg/ml)	VIA
0	Ag + ACF	1,0	100	subcutâneo
21	Ag + AIF	1,0	100	intramuscular
45	Ag + AIF	1,0	100	intramuscular
55	Sangria de Prova			
58	Sangria Branca			

1.8. TESTES SOROLÓGICOS

1.8.1. Padronização da Técnica de dot- ELISA

1.8.1.1. Preparo e Sensibilização dos Discos de Nitrocelulose

Como suporte sólido foram utilizados discos de nitrocelulose (Pharmacia®) de 7,5 nm, colocados em microplacas (Corning®) de 24 poços. Os discos foram sensibilizados com o antígeno produzido e purificado conforme descrito nos itens 1.2. e 1.3. dos Materiais e Métodos, o qual foi diluído em tampão carbonato-bicarbonato (0,1 M, pH 9,6). E em seguida, as microplacas foram incubadas por 30 minutos a temperatura ambiente.

1.8.1.2. Titulação em Bloco para a Técnica de dot- ELISA

As provas foram realizadas com quatro concentrações diferentes do antígeno purificado, correspondentes a: 1,0; 0,7; 0,4 e 0,2 µg/orifício. Cada concentração foi testada frente a 3 diluições dos soros positivo e negativo (1:100, 1:200 e 1:400) e do conjugado, IgG de caprino anti IgG de bovino conjugada à peroxidase, diluído na proporção de 1:1000, como recomendado pelo fabricante (Southern Biotechnology Associates®). Os soros e, o conjugado foram diluídos em tampão PBS. Todos os reagentes foram testados em triplicata.

Além dos soros testes, em cada placa foram incluídos um branco (tampão), o controle de antígeno (antígeno, conjugado e substrato) e controle de conjugado (tampão, conjugado e substrato).

1.8.1.3. Descrição da Prova de dot-ELISA

Os discos de nitrocelulose foram sensibilizados com o antígeno teste diluído em tampão carbonato-bicarbonato (0,1 M, pH 9,6) na concentração determinada pela titulação em bloco, e incubados à temperatura ambiente por 30 minutos. Em seguida, foram cobertos com uma solução de bloqueio contendo PBS com 1% de leite desnatado e incubados durante 2 horas. Cada disco sensibilizado foi lavado por quatro vezes em solução de lavagem PBS-T [8.0 g de NaCl, 0.2 g $\text{K}_2\text{H}_2\text{PO}_4$, 1.28g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 0,2 g KCl e 0,5 ml Tween 20; pH 7,4] e então recebeu 20 μl de cada soro (positivo e negativo) na diluição apropriada. Os soros diluídos foram incubados com os discos por 2 horas. Após o período de incubação realizou-se quatro lavagens de 10 minutos cada, usando-se solução de lavagem PBS-T. Nos discos “doteados” foram adicionados 150 μl do conjugado na diluição apropriada em PBS e subsequentemente incubados por 1 hora à temperatura ambiente. Foram feitas quatro lavagens com solução de lavagem sendo a que a última somente com PBS. Cada lavagem foi realizada por 10 minutos, sob agitação. A cada disco adicionou-se 100 μl de solução contendo substrato e cromógeno [0,1% de 3-3 diaminobenzidina, Tris-HCl 50mM, pH 7,6; e 1,0 % de cloreto de níquel, 0,1 % de peróxido de hidrogênio], deixados reagir à temperatura ambiente por 15 minutos ou até que o controle positivo pudesse ser evidenciado. A reação foi interrompida,

adicionando-se água bidestilada. Após a administração do conjugado e espera da reação enzima-substrato, pôde ser evidenciada a presença de coloração nos discos. Os resultados foram considerados positivos ou negativos através da observação visual do aparecimento ou não de coloração (cinza- avermelhada escura) nos discos de nitrocelulose.

Os resultados foram avaliados visualmente, baseando-se na intensidade de coloração dos disco de nitrocelulose de acordo com a recomendação de CUMMINS *et al.*(1990).

1.8.2. Padronização da Técnica de S-ELISA (ELISA "sandwich")

1.8.2.1. Titulação do Soro Policlonal:

Para o teste de S-ELISA foi necessário primeiramente determinar a diluição do soro policlonal, para então, dar início a padronização deste teste. Para tal, placas de poliestreño de 96 cavidades (poços) foram sensibilizadas com 100 µl do antígeno BRSV-25-BR na concentração de 3 µg/ ml de proteína diluídos em tampão carbonato-bicarbonato 0,05 M pH 9,6, e incubadas a 4° C por 12 horas ("overnight"). Após a sensibilização, procedeu-se a lavagem da placa por 3 vezes utilizando solução de lavagem PBS-T (salina fisiológica 0,05% v/v de Tween 20). A placa foi então bloqueada com solução de bloqueio PBS-T com 2% de BSA (soro albumina bovina, Sigma®), incubada durante 1 hora a temperatura de 37 °C, e depois novamente lavada em solução de lavagem. Em seguida adicionou-se 100 µl/ poço do soro policlonal produzido em coelho nas diluições de 1:50, 1:100, 1:200,

1:400, 1:800, 1:1.000, 1:2.000, 1:5.000 e 1:10.000, e procedeu-se a incubação à temperatura de 37 °C por 2 horas. Findo o período de incubação as placas foram lavadas e, então, foi adicionado o conjugado anticorpo anti- imunoglobulina de coelho marcado com peroxidase (Sigma[®]) na diluição recomendada pelo fabricante de 1:30.000. A placa foi então lavada e, incubada a 37 °C, com substrato enzimático [4 mg OPD em 10 ml de tampão substrato e 5 µl de H₂ O₂] incubados à temperatura ambiente por 30 minutos. A reação foi interrompida pela adição de 50 µl de HCl (Merck[®]). A leitura das densidades ópticas (DO) de cada cavidade das microplacas foi realizada em leitor de ELISA (Labsystems Multiskan Biochromatic[®] Type348), sob comprimento de onda de 492 nm.

1.8.2.2. Titulação em Bloco S-ELISA

Uma vez determinada a melhor diluição do soro policlonal, procedeu-se as titulações em bloco, com o objetivo de se conhecer a diluição de trabalho dos reagentes. As provas foram realizadas em placas de 96 cavidades utilizando-se quatro concentrações diferentes do antígeno, correspondentes a 5,0; 3,0; 2,0 e 1,0 µg/poço. Cada concentração do antígeno foi testada frente a 3 diluições dos soros positivo e negativo (1:100, 1:200 e 1:400) e do conjugado (1:5000, 1:8000 e 1:10.000). Cada combinação de antígeno, soro e conjugado foi testada em duplicata. Após a leitura das reações, foi considerada a diluição de trabalho, aquela que apresentou melhor diferença de densidade óptica (DO) entre os soros positivos e negativos.

1.8.2.3. Descrição da Técnica de Elisa Indireto com Anticorpo de Captura (S -ELISA):

Os anticorpos de captura, diluídos na sua dose de reatividade ótima em tampão carbonato-bicarbonato (0,1 M, pH 9,6), foram adsorvidos, na quantidade de 100 µl, à microplaca, que foi incubada a temperatura de 4 °C por um período de 12 horas. As placas foram lavadas por três vezes com solução de lavagem PBS-T (salina fisiológica 0,05% v/v de Tween 20) durante 30 minutos à temperatura ambiente e novamente submetidas à lavagem. As placas foram então bloqueadas com solução de bloqueio PBS com 2% de BSA (soro albumina bovina Sigma®) e incubadas durante 1 hora à temperatura de 37 °C. Após este período as placas foram lavadas em solução de lavagem por 3 vezes e, em seguida, adicionou-se 100 µl/ poço do antígeno purificado na sua concentração ótima, pré determinada pela titulação em bloco. Incubou-se as mesmas por 2 horas, à temperatura de 37 °C, após repetiu-se a lavagem.

Os soros bovinos (soros teste e referência positivo e negativo) foram diluídos em PBS e acrescentados à placa na quantidade de 100 µl, permanecendo à temperatura de 37 °C, durante 2 horas.

Após este período, as mesmas foram lavadas com solução de lavagem. O conjugado, IgG de caprino anti-IgG de bovino conjugada à peroxidase (Southern Biotechnology Associates®) foi diluído em PBS e incubado pelo período de 1 hora a 37 °C. Em seguida, lavaram-se as placas 4 vezes com solução de lavagem e adicionou-se 100 µl do substrato enzimático [4 mg OPD em 10 ml de tampão substrato e 5 µl de H₂ O₂] incubados à temperatura ambiente por 30 minutos. A reação foi interrompida pela adição de

50 μ l de HCl (Merck[®]). A leitura das densidades ópticas (DO) de cada cavidade das microplacas foi realizada em leitor de ELISA (Labsystems Multiskan Biochromatic[®] Type348), sob comprimento de onda de 492 nm.

Os valores positivos foram calculados levando-se em consideração os resultados obtidos nos testes e seus respectivos controles. Em cada placa foram colocados 3 controles positivos e a média considerada o valor padrão para os cálculos.

1.8.3. Teste de Soroneutralização (SN)

A determinação dos títulos de anticorpos soroneutralizantes nos soros hiperimunes policlonais foi realizada pelo Método β com algumas modificações. Foram utilizadas placas de fundo chato de microtécnica de 96 cavidades (Corning[®]), contendo monocamadas de células CER com 24 horas de crescimento a 37 °C. Antes de serem adicionados às placas, os soros testes foram diluídos em série na razão 2 (1:2 até 1:1024) em meio essencial mínimo Eagle (MMEE- Cutilab[®]) contendo 5% de antibióticos (penicilina 5×10^6 UI; estreptomicina 5g e fungizona 5g) em tubos (Eppendorf[®]) e, deixados reagir durante 1 hora sob temperatura de 37 °C, frente a uma dose padrão de BRSV-25-BR, contendo 100 DICC₅₀/ml, previamente determinada pelo método REED & MUENCH (1938).

Após o período de incubação, foram distribuídos 100 μ l da solução (soro/antígeno) em duplicata na placa contendo monocamadas celulares, sendo reservados as duas últimas colunas para o controle da suspensão viral e celular. As microplacas foram incubadas em estufa de CO₂ durante 5 dias.

O título neutralizante foi dado pela recíproca da mais alta diluição do soro capaz de inibir o efeito citopático de 100 DICC₅₀/ml do vírus. Cada título obtido, expresso em logaritmo de base 2, foi calculado a partir das cavidades contendo células que não apresentaram efeito citopático, segundo o método de REED & MUENCH (1938), levando em consideração os controles de células, vírus e soros. Os soros que proporcionaram título neutralizante igual ou menor a 4 foram considerados negativos e, soros com títulos igual ou maior a 8 foram considerados positivos conforme HAFEZ & WEILAND (1990).

1.9. ANÁLISE ESTATÍSTICA

1.9.1. Determinação da Sensibilidade, Especificidade e Valores Preditivos

Foi realizado um estudo comparativo dos resultados obtidos nos testes adaptados de dot-ELISA e S-ELISA frente ao teste de SN, tomando o teste de SN como prova padrão. Avaliou-se sensibilidade, especificidade e valores preditivos positivo e negativo. Os parâmetros foram calculados segundo COGGON *et al.* (1993), conforme Tabela 2.

TABELA 2. Esquema de Comparação entre o dot- ELISA, S- ELISA e SN

	SN Positivo	SN Negativo	TOTAL
dot- ELISA/S- ELISA Positivo	verdadeiros positivos (a)	Falsos positivos (b)	Total de positivos por dot- ELISA/ S-ELIS (a+ b)
dot- ELISA/S- ELISA Negativo	Falsos negativos (c)	verdadeiros negativos (d)	Total de negativos por dot- ELISA/ S-ELIS (c+ d)
TOTAL	Total de positivos por SN (a+ c)	Total de negativos por SN (b+ d)	TOTAL (a + b + c+ d)

Onde define-se, baseado na SN (CÔRTEZ,1993):

Sensibilidade (S): indica a proporção de infectados que o método é capaz de detectar como positivos, sendo calculado como: $S = a / (a + c) \times 100$

Especificidade (Ep): indica a proporção de não infectados que o método é capaz de detectar como negativos, sendo calculado como: $Ep = d / (b + d) \times 100$

Valor Preditivo positivo (VPP): indica a proporção de resultados verdadeiramente positivos no conjunto de resultados positivos, sendo calculado como: $VPP = a / (a + b) \times 100$

Valor Preditivo negativo (VPN): indica a proporção de resultados verdadeiramente negativos no conjunto de resultados negativos, calculado como: $VPN = d / (c + d) \times 100$.

1.9.2. Determinação do Índice de Concordância Kappa (κ)

O índice Kappa mede a concordância entre dois testes, e baseia-se na comparação dos índices de concordância esperados (p_e) com os índices de concordância observados (p_o).

O índice κ pode ser classificado em cinco grupos distintos conforme segue Tabela 3.

TABELA 3. Classificação do Índice κ (RIELGELMAN & HIRCH, 1991; TAYLOR, 1992)

Concordância	Kappa
1. deficiente	< 0,20
2. regular	0,21 - 0,40
3. moderada	0,41 - 0,60
4. boa	0,61 - 0,80
5. muito boa	0,81 - 1,00

2. RESULTADOS

2.1. Obtenção dos Soros Coletados

As 423 amostras de soros bovinos coletados no período de 1998 a 1999, oriundas de diferentes rebanhos dos Estados de Rio Grande do Sul (RS), Paraná (PR), São Paulo (SP), Mato Grosso do Sul (MS), Rio de Janeiro (RJ) e Minas Gerais (MG) (Figura 1) e, gentilmente fornecidas por Médicos Veterinários de campo e por Institutos de Pesquisas, foram analisadas utilizando-se os testes por nós adaptados e o teste padrão (SN). Os resultados são demonstrados na Tabela 5 e 7.

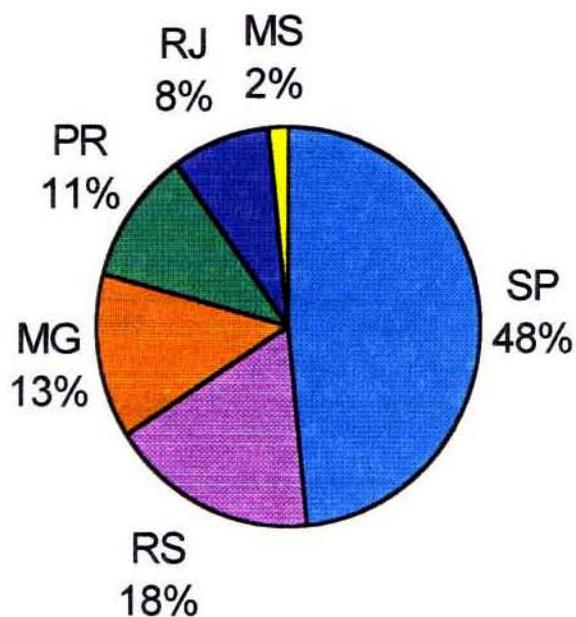


Figura 1: Proporção de Soros bovinos analisados o segundo Estado de Origem

2.2. Titulação

2.2.1. Titulação da Amostra Viral Bruta e Purificada

Para realização desta etapa do trabalho, partiu-se de suspensões virais com título médio de $10^{4,675}$ a $10^{5,3}$ DICCC₅₀/ml, na tentativa de se obter subcultura com títulos do mesmo nível.

A linhagem de BRSV-25-BR foi produzida para a obtenção de antígeno e titulada, sendo que os resultados obtidos estão demonstrados na Tabela 4.

Tabela 4. Títulos das amostras virais produzidas

AMOSTRA VIRAL	log DICCC₅₀/ml
BRSV-25-BR	
Antígeno bruto	5,4
Antígeno purificado	5,7

2.3. Concentração Protéica

A dosagem da concentração protéica dos antígenos bruto e purificado, foi efetuada, obtendo-se os valores de 1,297 e 970 mg de proteína por mililitro de antígeno respectivamente, tendo sido estas as concentrações utilizadas para os cálculos de antígeno para a padronização dos testes de S-ELISA (antígeno bruto) e dot-ELISA (antígeno purificado).

2.4. Produção de Soros Hiperimunes Policlonais

Coelhos imunizados foram submetidos a sangria de prova e os soros obtidos foram testados através do teste de SN, tendo apresentado níveis de anticorpos soroneutralizantes que variaram de 1:128 a 1:256 . Procedeu-se a sangria branca e m "pool" destes soros foi utilizado para a padronização do teste de S-ELISA.

2.5. Padronização dos Testes Imunoenzimáticos

2.5.1. Teste Imunoenzimático dot- Elisa

2.5.1.1. Titulação em Bloco:

A diluição de trabalho para o teste de dot-ELISA dos soros de coelho testados foi de 1:200 e para o conjugado foi de 1: 1.000. A diluição ótima para o antígeno foi de 0,7 µg de proteína viral por disco. Nestas concentrações, foi possível a demonstração visual de

pontos escuros no centro dos discos de nitrocelulose, correspondendo às reações positivas, sem contudo haver inespecificidade com reações negativas. Todas as reações foram feitas em duplicata na presença dos soros controle positivos e negativos, de forma que se pudesse comparar cada placa contendo os discos sensibilizados.

2.5.1.2. Determinação do Valor Discriminante:

O uso de membrana de nitrocelulose, conforme HAWKES *et al.* (1982), permite a visualização de uma reação colorida contra um fundo branco, o que aumenta o contraste na leitura. Quando comparado com outros testes, a discriminação das reações positivas e negativas tornou-se mais fácil e direta.

Como todas as placas continham um padrão positivo e um negativo, também em duplicata, e o resultado foi obtido visualmente, o disco positivo foi aquele que mais se diferenciou do padrão-negativo.

2.5.2. Teste Imunoenzimático S- Elisa

2.5.2.1. Titulação do Soro Policlonal e Titulação em Bloco:

O soro policlonal produzido em coelhos teve sua diluição ótima para trabalho em 1:200. Já as concentrações dos soros testes e do conjugado, em 1:200 e 1:8.000 respectivamente, a diluição ótima do antígeno ficou determinada na concentração de 3,0 µg

de proteína viral por cavidade. Nestas concentrações foram obtidas a melhor diferença de densidade óptica entre soros positivos e negativos. Todas as reações foram feitas em triplicata na presença de controles de soros positivos e negativos, de forma que se pudesse comparar as reações em cada placa.

2.5.2.2. Ajustes de Valores

Os valores de DO em todas as provas realizadas foram ajustados em relação aos valores obtidos em uma prova-padrão. A partir dos valores desta prova-padrão (realizada com os soros controle após a padronização e titulação) e dos valores de cada prova subsequente, com os soros teste, calculou-se o fator usado para ajustar os valores de |DO de cada placa teste aos valores de DO da prova-padrão, por meio das seguintes fórmulas:

$$\text{Fator (F)} = \frac{(Po - No)}{(Pt - Nt)}$$

$$\text{Valor ajustado } F (St - Nt) + No$$

onde:

F= fator de correção

Po= média dos controle positivos na placa-padrão

No= média dos controles negativos na placa-padrão

Pt= média dos controles positivos na placa-teste

Nt= média dos controles negativo na placa teste

St= média da amostra testada.

Os valores da prova- padrão foram obtidos de quatro repetições de quatro amostras de soros positivos para BRSV e de quatro soros negativos para BRSV.

2.5.2.3. Valor Discriminante

O valor discriminante, também conhecido como ponto de corte, foi determinado com base nos resultados de 134 soros negativos para anticorpos anti-BRSV frente a técnica de SN, dos quais foram calculados a média aritmética e o desvio padrão populacional, tendo sido considerado como valor discriminante o valor médio acrescido de 2 desvios padrão (σ).

2.6. Análise Comparativa entre os Testes de Soroneutralização, dot-ELISA e S-ELISA

2.6.1. Análise da Positividade

A análise da positividade dos soros bovinos através dos testes adaptados e do teste padrão (SN), mostrou uma alta porcentagem de anticorpos anti-BRSV nos soros dos rebanhos avaliados (Tabela 5, Figura 2). Pelo valor observado de Q a diferença entre as positivities dos teste não foi estatisticamente significativa (valor $p < 0,05$). Assim, pode-se concluir que os testes de SN, dot-ELISA e S-ELISA tiveram similar positividade.

TABELA 5 - Resultado da análise sorológica para a detecção de anticorpos anti-BRSV utilizando os testes de Soroneutralização, dot-ELISA e S-ELISA.

TESTE	POSITIVO	NEGATIVO	TOTAL
SN	289 (68%)	134 (32%)	423
dot-ELISA	303 (71,3%)	121 (28,7%)	423
S-ELISA	307 (72,5%)	116 (27,4%)	423

TABELA 6 - Resultado da análise sorológica para a detecção de anticorpos anti-BRSV de acordo com o Estado analisado utilizando os testes de Soroneutralização, dot-ELISA e S-ELISA.

ESTADOS	SN		dot- ELISA		S-ELISA	
	POS (+)	NEG(-)	POS (+)	NEG(-)	POS (+)	NEG(-)
RS	55 (73,3%)	20(26,%)	57 (76%)	18 (24%)	58 (77,3%)	17 (22,7%)
PR	34 (74%)	12 (26%)	34 (74%)	12 (26%)	34 (74%)	12 (26%)
SP	133 (65%)	71 (35%)	148(72,5%)	56(27,5%)	150 (73,6%)	54 (26,4%)
MS	3 (43%)	4 (57%)	5 (71,4%)	2 (28,6%)	5 (71,4%)	2 (28,6%)
RJ	25 (71,5%)	10 (28,5%)	28 (80%)	7 (20%)	28 (80%)	7 (20%)
MG	37 (66%)	19 (33%)	31(55,4%)	25(44,6%)	32 (57,1%)	24(42,9%)
TOTAL		423		423		423

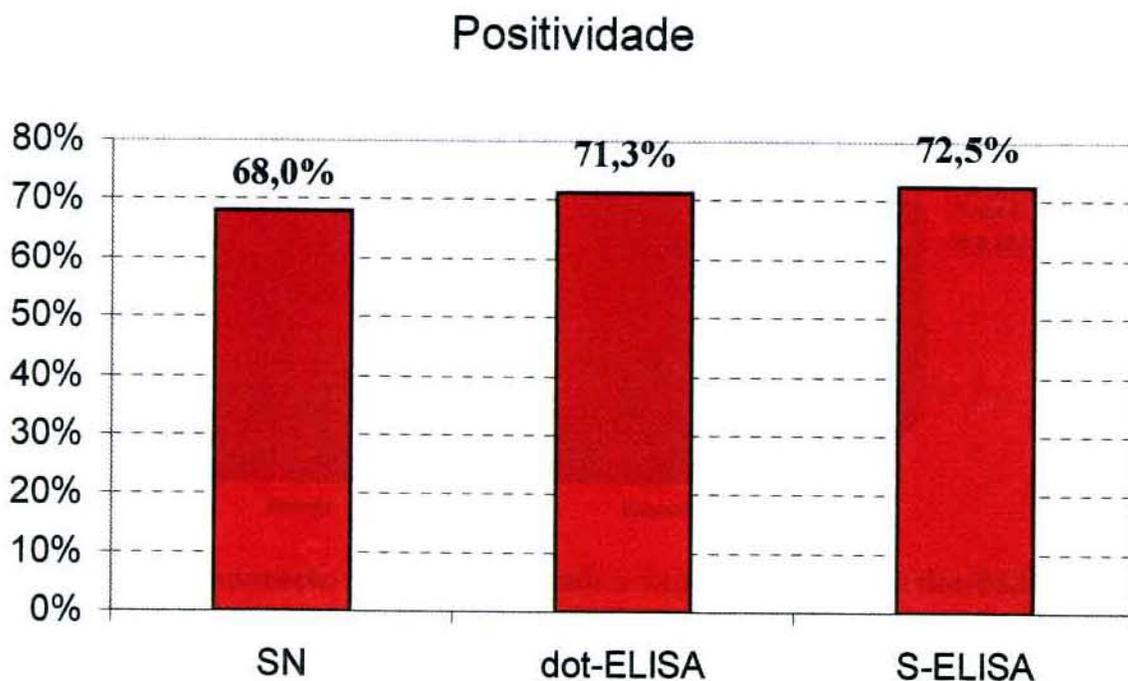


Figura 2: Comparação entre as Postividades dos Testes

2.6.2. Análise da Especificidade e Sensibilidade

A sensibilidade de um teste indica a proporção de infectados que o método é capaz de detectar como positivo, enquanto que a especificidade indica a proporção de não infectados que o método é capaz de detectar como negativo. Ambos os testes adaptados, dot-ELISA e S-ELISA, apresentaram sensibilidade de 92,3% e 91,6% e especificidade de 71,3% e 68,4% respectivamente, segundo a análise estatística aplicada (Figura 3).

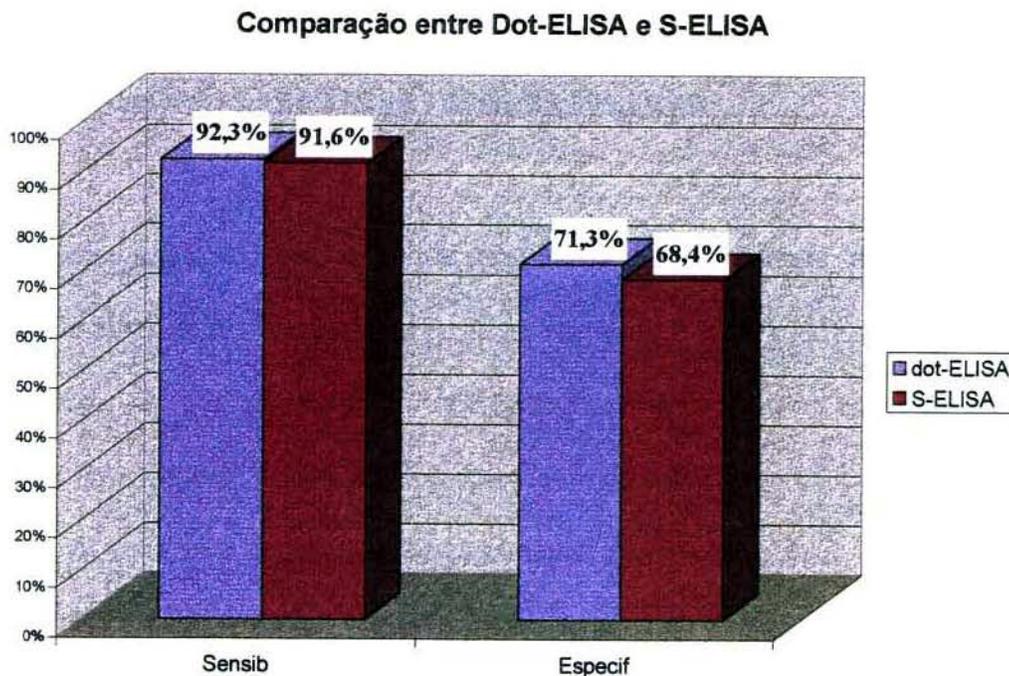


FIGURA 3: Comparação entre Sensibilidade e Especificidade para dot-ELISA e S-ELISA

O teste dot-ELISA apresentou tanto sensibilidade como especificidade maiores que as do S-ELISA. Mas, para testar se a diferença entre suas estimativas foram estatisticamente significativas, empregou-se o Teste estatístico de McNemar para tal comparação. Assim, considera-se os dados do cruzamento entre os resultados de dot-ELISA e S-ELISA separadamente para valores positivos e negativos de Soroneutralização. O valor p encontrado para o teste da diferença entre as sensibilidades é de 0,8601 e a diferença de especificidades é de 0,4545. Assim, tanto a sensibilidade como a especificidade não foram significativamente diferentes entre os testes dot-ELISA e S-ELISA. Portanto, pode-se considerar que os dois testes obtiveram o mesmo desempenho.

2.6.3. Análise dos Valores Preditivos Positivos e Negativos

O valor preditivo positivo de um teste indica a probabilidade de infecção de um indivíduo que apresentou um resultado positivo; enquanto o valor preditivo negativo indica a probabilidade de que um indivíduo que apresentou um resultado negativo não esteja infectado de fato. O teste de dot-ELISA apresentou os valores de 87,2% e 81,5%, para o valor preditivo positivo e negativo, respectivamente; para o teste de S-ELISA o valores foram de 85,9% e 79,5%, respectivamente (Figura 4).

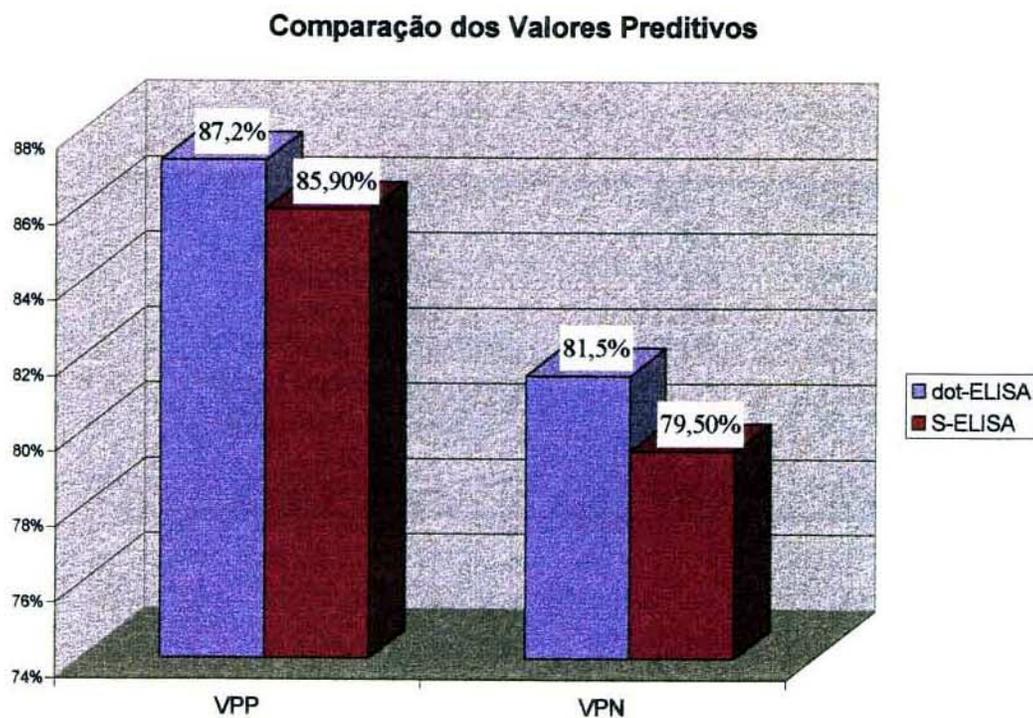


FIGURA 4: Comparação entre Valores Preditivos dos Teste

2.6.4. Determinação do índice de concordância Kappa (κ)

O índice de concordância (κ) entre a SN e os testes adaptados em nosso laboratório foi de 0,658 para o dot-ELISA e SN e, de 0,623 para o S-ELISA (Tabela 9). Tais resultados revelam uma boa concordância com o teste padrão, conforme classificação indicada no item 1.8.2. (Tabela 3). Além disso, esses coeficientes κ foram significativos, ambos com valor p inferior a 0,05.

Tabela 9: Avaliação Geral dos Testes Desenvolvidos em Relação ao SN

Característica	dot- ELISA	S-ELISA
Sensibilidade	92,3%	91,6%
Especificidade	71,3%	68,4%
Valor Preditivo Positivo	87,2%	85,9%
Valor Preditivo Negativo	81,5%	79,5%
Desempenho Global	85,5%	84,2%
Kappa	0,658	0,623
Valor p Kappa	< 0,005	<0,005

3. DISCUSSÃO

O Brasil possui o maior rebanho bovino comercial do mundo, possuindo atualmente 169,1 milhões de cabeças, sendo superado apenas pela Índia, país que, por dogma religioso, não explora comercialmente o seu rebanho. Em 1999 o consumo interno nacional teve um crescimento em torno de 2,47% e, ainda, um aumento nas exportações, que expandiram 7,76%, ou seja, em torno de 300 mil toneladas, sendo também o quarto país consumidor (10% do total mundial), onde o consumo *per capita* é de 36,1 kg/ano. (ZAIDAN, 2000)

A bovinocultura ainda sofre elevadas perdas econômicas ocasionadas principalmente por doenças que prejudicam o desempenho da produção. Dentre estas, temos a enfermidade respiratória dos bovinos, sendo o agente responsável o Vírus Respiratório Sincicial Bovino (BRSV), que causa grandes danos nos animais afetados. (BRYSON *et al.*, 1991 e SHARMA & WOLDEHIWET 1992b; DUBOVI, 1993). O teste aceito como padrão para o diagnóstico sorológico do BRSV é o teste de soroneutralização. Este teste, no entanto, apresenta diversas limitações inerente a sua execução, tais como a complexidade que envolve o cultivo celular, bem como ser esta uma técnica laboriosa e que dispende muito tempo para a obtenção dos resultados (GILLETTE, 1983; WESTENBRINK & KIMMAN, 1987; DUBOVI, 1993). Além disso, o diagnóstico de infecções provocadas por vírus respiratórios bovinos através de isolamento viral é geralmente difícil e requer freqüentemente várias passagens do material suspeito em cultura celular antes do efeito citopático característico se tornar evidente, no caso, em média 5 a 7 dias (POTGIETER & ALDRIDGE, 1977). As dificuldades acima mencionadas também foram observadas durante a execução deste trabalho.

Considerando tais observações, notou-se a importância de se encontrar e padronizar técnicas mais eficazes e rápidas, para auxiliar no diagnóstico sorológico desta enfermidade que vem acometendo gradualmente nosso país.

No presente estudo, foram adaptadas e padronizadas duas técnicas imunoenzimáticas de ELISA (dot-ELISA e S-ELISA), para a detecção de anticorpos anti-BRSV. A padronização dos ensaios foi estabelecida através da análise comparativa com os resultados obtidos na prova de SN.

Os títulos encontrados para a amostra viral utilizada (BRSV-25-BR) concentrada por centrifugação e para a amostra viral purificada conforme a Tabela 4, se equivalem aos dados encontrados por CAMPALANS & ARNS (1995), que obtiveram resultados de $DICC_{50}/ml$ de $10^{5,3}/ml$ em célula da linhagem CER para esta amostra. O perfil para a amostra purificada em gradiente descontínuo de sacarose a 30-55% (p/v), apresentou títulos maiores que o encontrado para a amostra concentrada (Tabela 4), sendo considerados satisfatórios para a aplicação neste trabalho. LIMA (1998) encontrou valores semelhantes, quando utilizou uma amostra de pneumovírus aviário purificada para o desenvolvimento de teste imunoenzimáticos.

Para determinar se as diluições dos reagentes básicos (antígenos, anticorpo de captura, tampões diluentes e conjugado imunoenzimático), assim como o tempo de incubação das reações para duas técnicas estavam de acordo, foi realizado uma avaliação preliminar com o objetivo de equacionar estas dúvidas.

As diluições de trabalho, conforme os itens 2.5.1.1. e 2.5.2.1., para os testes de dot-ELISA e S-ELISA, foram estabelecidas para obtenção da melhor discriminação entre os soros

de referência positivo e negativo. Portanto, ficou claro, que a padronização dos tempos e das diluições ótimas dos reagentes das diferentes fases de ambas as técnicas estudadas, devem ser pré-determinadas para obter-se um teste efetivo.

O teste de S-ELISA foi adaptado e padronizado utilizando a amostra viral de forma concentrada por centrifugação refrigerada. O mesmo procedimento foi adotado por CARDOSO (1994), quando padronizou a técnica de S-ELISA para detecção de anticorpos contra o vírus da bronquite infecciosa das galinhas. Levou-se em consideração que a purificação viral é um fator limitante para a execução das técnicas imunoenzimáticas, onde a necessidade de sucessivas e demoradas purificações antigênicas podem ocasionar uma possível perda dos componentes estruturais da partícula viral, quando submetida às forças centrífugas elevadas (NAGANO *et al.* 1987; KELLING, 1993). Ademais, a utilização do anticorpo de captura, preparado em coelhos, com antígenos concentrados não apresentou reações inespecíficas. Sendo que os resultados obtidos na padronização deste teste não sofreram interferência pela não utilização de antígenos altamente purificados.

Com o objetivo de eliminar a variabilidade existente entre partidas de antígenos brutos produzidas em diferentes ocasiões, utilizou-se apenas cepas de vírus com títulos bastante semelhantes para a produção dos antígenos utilizados no desenvolvimento do S-ELISA. Esses achados condizem com registros na literatura, que utilizando amostras virais com títulos infectantes estáveis, obtiveram melhores resultados (CEVENINI *et al.* 1986; TEIXEIRA, 1994).

No teste de dot-ELISA, foi utilizado antígeno purificado para a sensibilização dos disco de nitrocelulose. Tal procedimento foi adotado, visto que testes preliminares com

antígenos não purificados, apenas concentrados por centrifugação baixa, demonstraram uma alta inespecificidade, bem como os relatos; TANTIVANICH *et al.* (1997); PARIMAL & VENUGOPALAN (1999), os quais obtiveram melhores reações quando utilizaram antígeno purificado.

Analisou-se 423 amostras de soro bovino procedentes de diferentes estados brasileiros. A coleta foi realizada de forma aleatória e, devido a este fator, não foi feita uma análise detalhada em relação aos soros, pois estes eram provenientes de bovinos de corte e de leite, de ambos os sexos, de diferentes idades e, pertencentes a propriedades com ou sem histórico de doenças respiratórias, assim como, de rebanhos bovinos sem qualquer informação adicional.

Foram detectados anticorpos anti-BRSV em todos os estados analisados (Tabela 6). Das 423 amostras de soro analisadas, 67,8%; 71,6% e 72,5% foram positivos para presença de anticorpos anti-BRSV nos teste de SN, dot-ELISA e S-ELISA respectivamente (Tabela 5, Figura 2). Encontrou-se variações de positividade entre os estados pesquisados. No entanto, não achamos pertinente a comparação entre tais porcentagens uma vez que o número de amostras analisadas por estado foi significativamente diferente (Tabela 7). Os resultados apresentados revelam uma alta soropositividade para BRSV nos rebanhos pesquisados, o que concorda com os resultados obtidos no Brasil (CAMPALANS & ARNS, 1997); nos Estados Unidos (COLLINS *et al.*,1988), na Inglaterra (PATON *et al.*, 1998), no Canadá (VAN DONKERSGOED *et al.*,1993), e mais recentemente no Uruguay (COSTA *et al.*,1999).

Estas análises permitiram observar uma maior porcentagem de soros positivos nos testes de dot-ELISA e S-ELISA em relação ao teste padrão (SN), tais diferenças entre as soropositividades, podem ser explicadas pelo fato destes testes serem capazes de detectar uma amplitude maior de anticorpos que combinam com vários determinantes antigênicos, enquanto que, a SN detecta somente aqueles anticorpos que são responsáveis pela penetração do vírus nas células. Porém, quando as análises foram submetidas a testes estatísticos, não se encontrou diferença significativa entre as positivities com um valor $p < 0.05$, o que vai encontro com os dados achados por LIMA *et al.*(1999), quando este comparou os testes de dot-ELISA e ELISA indireto com a soroneutralização.

A concordância, medida pelo índice Kappa, foi boa entre os testes desenvolvidos em relação ao teste de SN (Tabela 3 e Tabela 9), com base nestes dados podemos afirmar que os testes por nós padronizados estão bem relacionados. O mesmo foi achado por HOFNER *et al.* (1993), quando pesquisou anticorpos para enterovirose bovina, utilizando as técnicas de fixação de complemento, SN e S-ELISA.

Os valores encontrados para sensibilidade e especificidade dos testes desenvolvidos estão representados na Figura 3. A alta sensibilidade e a boa especificidade encontrada pelos dois testes, indica que eles servem bem para triagem sorológica, pelo fato de que estes testes têm maior probabilidade de detectar falsos positivos, agilizando os sistemas de prevenção de doenças, onde se instalada a infecção em um número pequeno de animais do rebanho, algumas medidas poderão ser tomadas, para evitar altos índices de morbidade (GILLETTE, 1983; DUBOVI, 1993).

Os testes aqui padronizados não apresentaram diferenças significativas tanto de sensibilidades quanto especificidade, considerando assim que os dois testes apresentam similar desempenho. CARDOSO (1994), ao comparar os testes de S-ELISA e ELISA indireto na detecção de anticorpos contra o vírus da bronquite infecciosa das galinhas, não constatou diferenças significativas nos resultados atingidos. LIMA (1998) estudando a presença de anticorpos antipneumovírus aviário, igualmente relatou a inexistência de diferenças significativas, comparando os testes de dot-ELISA e ELISA indireta por ele padronizados.

Os resultados deste estudo comprovam que o teste de dot-ELISA é realmente um teste com alta sensibilidade e boa especificidade e que se adequa bem a reações antígeno-anticorpo, sendo capaz de detectar baixos níveis de anticorpos, em comparação a outros testes sorológicos, como imunofluorescência indireta (BAHIA *et al.*, 1993).

A principal diferença deste teste para os outros ELISAs é a utilização de discos de nitrocelulose para imobilização de antígenos, o que tem provado ser eficiente em vários sistemas de avaliação de complexos antígeno-anticorpo.

Este teste torna-se rápido e prático uma vez que os resultados são interpretados visualmente, o que acarreta em altos riscos de subjetividade (HAWKES *et al.*, 1982; LIMA, 1998 e PARIMAL & VENUGOPALAN, 1999).

Apesar destes riscos, pode-se considerar o dot-ELISA como uma técnica eficiente para triagem sorológica, por apresentar boa especificidade, como constatada neste experimento, uma vez que os verdadeiros soros negativos são facilmente detectados (PARIMAL & VENUGOPALAN, 1999; LIMA, 1998; VERCAMMENT *et al.*, 1998).

O método de S-ELISA apresenta algumas vantagens em relação aos outros testes sorológicos, como por exemplo a velocidade com que são realizadas as técnicas, facilidade de automação e, principalmente, ausência de subjetividade (BAXTER-JONES *et al.*, 1989). Entretanto, o uso de equipamentos especiais e a exigência de mão-de-obra especializada limitam-no ao uso laboratorial.

Por meio dos dados coletados neste estudo, valida-se o teste de S-ELISA para detecção dos anticorpos anti-BRSV, bem como o teste de dot-ELISA como alternativa para o uso em laboratório e no campo, pelo fato de que os resultados são interpretados visualmente, não requerendo mão-de-obra especializada e nem equipamentos caros, como espectrofotômetro para a realização das leituras, o que vem de encontro com a opinião de PAPPAS *et al.* (1984; 1986), que afirmaram ainda, que esta última técnica é muito promissora no diagnóstico de infecções de origem bacteriana e viral.

Portanto, dos testes aqui adaptados e padronizados, o S-ELISA foi reconhecido como um bom teste, que se adapta bem para este tipo de vírus sendo mais indicado para uso em laboratório como alternativa ao teste de SN, principalmente em monitoramento sorológico e, o dot-ELISA como inovador para a detecção de anticorpos anti-BRSV e como alternativa de diagnóstico á campo sendo, também, de grande valia no trabalho com populações amostrais maiores .

4. CONCLUSÕES

- 4.1.** Nas 423 amostras de soros bovinos analisadas provenientes de diversas propriedades de diferentes estados brasileiros, foi detectada a presença de anticorpos anti- BRSV sendo 289 (68%) amostras positivas para o teste de SN; 303 (71,3%) para o teste de dot-ELISA e 307 (72,5%) para o S-ELISA.

- 4.2.** Os valores de sensibilidade e especificidade encontrados para os testes de S-ELISA e dot-ELISA adaptados neste trabalho não apresentaram diferenças significativas, verificou-se também uma boa concordância entre os testes padronizados com o teste de SN;

- 4.3.** Os testes aqui adaptados e padronizados demonstraram ser, portanto, provas sorológicas adequadas para serem utilizados no diagnóstico e triagem sorológica do BRSV, em especial devido ao baixo custo e a sua praticidade, viabilizando seu uso em laboratórios com pouca infra-estrutura, condizente com a realidade nacional.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AL- DARRAJ, A.M.; CUTLIP, R.C.; LEHMKUHL, H.D; GRAHAM, D.L.; KLUGE, J.P. & FRANK, G.H. 1982. Experimental infection of lambs with BRSV and *Pasteurella hemolytica*: clinical and microbiologic studies. *Am. J. Vet. Res.*, 43: 236-240.
- AMES, T.R. 1993. The epidemiology of BRSV infection. *Vet. Medicine*, 881-885.
- BAHIA, M. , VÍTOR, R.W.A., ANTUNES, C.M.F. et al. 1993. Diagnosis of toxoplasmosis caprina by dot- enzyme-linked immunosorbent assay. *Arquivo Brasileiro Med. Vet. Zoot.*, 45(2):173- 182.
- BAKER, J. & VELICER, L.F. 1991. Bovine respiratory syncytial virus vaccination: current status and future vaccine development. *Comp. on Continuing Education for the practicing. Vet.* 13: 1323-1335.
- BAXTER- JONES, C., GRANT, M., JONES, R.C. et al. 1989. A comparison of three methods for detecting antibodies to turkey rhinotracheitis virus. *Avian Pathol.*, 18(1): 91-98.

- BRYSON, D.G.; McCONNEL, s.; McALISKEY, M. & McNULTY, M.S. 1991. Ultrastructural features of alveolar lesions in induced respiratory syncytial virus pneumonia of calves. **Vet. Pathol.**, 28: 286-292.
- BUYS, S.B.; DU PREEZ, J.H. & eLS, H.J. 1989. Swollen head syndrome in chickens: a preliminary report on the isolation of a possible aetiological agent. **J. South African Vet. Assoc.**, 60: 221-222.
- CAMPALANS, J.F.B. & ARNS C.W. 1994. Serological Investigation of Bovine respiratory syncytial virus in Brazil. **Anais do VII Encontro Nacional de Virologia, São Lourenço-MG, A3.**
- CAMPALANS, J.F.B. & ARNS C.W. 1995. Isolation of Bovine respiratory syncytial virus in Brazil. **Anais 5º Viroológica 95, Ribeirão Preto, SP, B-34.**
- CAMPALANS, J.F.B. 1996. **Isolamento e investigação sorológica do vírus respiratório sincicial bovino (BRSV) no Brasil.** Campinas: UNICAMP, 95p. Tese de Mestrado.
- CAMPALANS, J.F.B. & ARNS C.W. 1997. Serological evidence of bovine respiratory syncytial virus in Brazil. **Virus Reviews & Res.**, 2: 50-56.

- CARDOSO, T.C. 1994. **Padronização do ensaio imunoenzimático ("enzyme-linked immunosorbent assay") no monitoramento da imunidade humoral contra o vírus da bronquite infecciosa das galinhas.** Jaboticabal: UNESP- SP, 104p. Tese de Mestrado
- CARDOSO, T.C. 1998. **Estudos quantitativos sobre as reações de ELISA de bloqueio de fase líquida e indireto com anticorpo de captura na detecção da resposta humoral contra o vírus da bronquite infecciosa das aves.** Jaboticabal: UNESP- SP, 79p. Tese de Doutorado.
- CEVENINI, R., DONATI, M., BERTINI, S., MORONI, A. & SAMBRI, V. 1986. Capture-ELISA for serum IgM antibodies to respiratory syncytial virus. *J. Hyg.*, .97(3): 511-517
- CHERNESKY, M. A. 1996. Traditional serological test. In: MAHY, B.W.J., KANGRO, H.O. (Ed.) **Virol. Methods Mannual**, London: Academic Press, p. 108-109.
- COLLINS, J.K., TEEGARDEN, R.M., MAC VEAN, D.W., SALMAN, S., SMITH, G.H. & FRANK, G.R. 1988. Prevalence and specificity of antibodies to bovine respiratory syncytial virus in sera from feedlot and range cattle. *Am. J. Vet. Res.*, 49: 1316-1319.
- COLLINS, M. S., GOUGH, R. E. & ALEXANDER, D. J. 1993. Antigenic differentiation of avian pneumovirus isolates using polyclonal antisera and mouse monoclonal antibodies. *Avian Pathol.*, 22(3): 469-479.

- COGGON, T.; ROSE, G. & BARKER, D.J. 1993. Measurement error and bias. In: *Epidemiology for the United Kingdom*. 3rd ed. *British Med. J.*, 20- 25.
- CÔRTEZ, J.A. 1993. *Epidemiologia: conceitos e princípios fundamentais*. São Paulo. Varela. p.227.
- COSTA, M., GARCIA, L., YUNUS, A.S., ROCKEMANN, D. D., SAMAL, S.K. & CRISTINA, J. 1999. Bovine respiratory syncytial virus: first serological evidence in Uruguay. *Vet. Res.*, 31: 241-246.
- CUMMINS, D. R.; REYNOLDS, D. L. & RHODES, K. R. 1990. Na avidin- biotin enhanced dot- immunobinding assay for the detection of *Mycoplasma gallicepticum* and *m. synoviae* serum antibodies in chickens. *Avian Dis.*, 34(1): 36-43.
- DUBOVI, E.J. 1993. Diagnosing BRSV infection: A laboratory perspective *Vet. Med.*, 888-893.
- FLORENT, G. & MARNEFFE DE, C. 1986. Enzyme-linked immunosorbent assay used to monitor serum antibodies to bovine respiratory disease viruses. *Vet. Microbiol.*, 11: 309-317.

- GILLETTE, K.G. 1983. Enzyme-linked immunosorbent assay for serum antibody to bovine respiratory syncytial virus: Comparison with complement-fixation and neutralization tests. **Am. J. Vet. Res.**, 44(12): 2251-2255.
- GONÇALVES, I.P.D.; JOST, H.C.; SOGLIO, A.D.; SIMANKE, A.T.; HOTZEL, I. & MOOJEN, V. 1993. Detection of bovine respiratory syncytial virus in calves of Rio Grande do Sul, Brazil. **Ciência Rural, Santa Maria**, 23(3):389-390.
- GOUGH, R.E. & COLLINS, M.S. 1989. Antigenic relationships of three turkey rhinotracheitis viruses. **Avian Pathol.**, 18: 227-238.
- HAFEZ, H.M. & WEILAND, F. 1990. Preliminary studies of a virus associated with turkey rhinotracheitis in West Germany. **Tieraerztl.Umschau.**, 45:103-11.
- HAWKES, R., NIDAY, E., GORDON, J. 1982. A dot- immunobinding assay for monoclonal and other antibodies. **Analytical Biochemistry.**, 119: 142-147.
- HILDEBRAND, R.L. 1979. **ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent assay) Rapid Diagnosis in Infectious Disease.** Chapter 5, p. 71-88.
- HOFNER, M.C., CARPENTER, W.C., LYONS, S.A. & HAMBLIN, C. 1993. An indirect sandwich ELISA for the identification of bovine enteroviruses. **J. Virol. Methods**, 41: 239-244.

INABA, Y.; TANAKA, Y.; SATO, K.; OMORI, T. & MATUMOTO, M. 1972. Bovine respiratory syncytial virus: Studies on an outbreak in Japan, 1968-1969. **Japanese J. Microbiol.**, 16: 373-383.

JACOBS, J.W. & EDINGTON, N. 1975. Experimental infection of calves with respiratory syncytial virus. **Res. Vet. Sc.**, 18: 299-306.

KELLING, C.L. 1993. Controlling BRSV infection in calves. **Vet. Med.**, 903-906.

KIMMAN, T.G.; WESTENBRINK, F.; SCHREUDER, B.E. & STRAVER P.J. 1987. Local and systemic antibody response to Bovine Respiratory syncytial virus infection and reinfection in calves with and without maternal antibodies. **J. Clin. Microbiol.**, 25: 1097-1106.

KIMMAN, T.G.; ZIMMER, G.M.; WESTENBRINK, F.; MARS, J. & VAN LEEUWEN, E. 1988. Epidemiological study of Bovine Respiratory syncytial virus infections in calves; influence of maternal antibodies on the outcome of disease. **Vet. Rec.**, 123: 104-109.

LIMA, A.M.C. 1998. **Desenvolvimento e padronização de ensaios imunoenzimáticos (ELISA e dot-ELISA) para detecção de anticorpos antipneumovírus aviário.** Viçosa: Universidade Federal de Viçosa- UFV, 47p. Tese de Mestrado

LIMA, A.M.C., SANTOS, B.M., PATARROYO, J.H., ARNS C.W., CASTRO, T.A.M.G., DOMINGUES, H.G. 1999. Desenvolvimento e padronização de um ensaio imunoenzimático (ELISA) para detecção de anticorpos anti Pneumovírus Aviário. **Revista Brasileira de Ciência Agrícola**, v.1, p.102-103

LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, N.J., FARR, A.L. et al. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. **J. Biological Chemistry**, 193: 265-275.

MALLIPEDDI, S.K.; SAMAL, S.K & MOHANTY, S.B. 1990. Analysis of polypeptides synthesized in bovine respiratory syncytial virus infected cells. **Arch. Virol.**, 115: 23-36.

NAGANO, H. YAGYU, K., OHTA, S. 1987. Purification of infectious bronchitis viruses in enzyme-linked immunosorbent assay. **J. Vet. Sci.**, 49(3): 491-497.

PACCAUD, M.G. & JACQUIER, C. 1970. A respiratory syncytial virus of bovine origin. **Arch. Ges. Virusforsch.**, 30: 327-342.

PAPPAS, M. G., HAJKOWSKI, R. & HOCKMEYER, W.T. 1984. Standardization of dot-enzyme-linked immunosorbent assay (dot-ELISA) for human visceral leishmaniasis. **Am. J. Tropical Med. Hygiene**, 33(6): 105-111.

- PAPPAS, M. G.; LUNDE, M. N.; HAJKOWSKI, R. et al. 1986. Determination of IgM and IgG antibodies to *Toxoplasma* using the IFA test, ELISA, and dot-ELISA procedures *Vet. Parasitol.*, 20: 31-42.
- PARIMAL, R. & VENUGOPALAN, A.T. 1999. Dot-enzyme linked immunosorbent assay for demonstration of Newcastle disease virus infection. *Comp. Immunol. Microbiol. & Infect. Dis.*, 22: 27-31.
- PATON, D.J., CHRISTIANSEN, K.H., ALENUS, S., CRANWELL, M.P., PRITCHARD, G.C. & DREW, T.W. 1998. Prevalence of antibodies to bovine virus diarrhoea virus and other viruses in bulk tank milk in England and Wales. *Vet. Rec.*, 142: 385-391.
- PICAULT, J.P. 1989. Isolation of a TRT-like virus from chickens with swollen head syndrome. *Vet. Rec.*, 121-135.
- PIRIE, H.M.; PETRIE, L.; PRINGLE, C.R.; ALLAN, E.M. & KENNEDY, G.J. 1981. Acute fatal pneumonia in calves due to respiratory syncytial virus. *Vet. Rec.*, 108:411-416.
- POTGIETER, L. & ALDRIDGE, P. 1977. Use of indirect fluorescent antibody test in the detection of bovine respiratory syncytial virus antibodies in bovine serum. *Am. J. Vet. Res.*, 38: 1341-1343.

- REED, J.L. & MUENCH, H. 1938. A simple method for estimating fifty percent endpoints. **Amer.J.Hyg.**, 27: 493.
- RIEGELMAN, A.K. & HIRCH, A.P. 1991. Cómo estudiar un estudio y probar una prueba: lectura crítica de la literatura médica. **Boletim Oficial Sanitario Panamericano.**, 111: 534-555
- ROSENQUIST, B.D. 1974. Isolation of respiratory syncytial virus from calves with acute respiratory diseases. **J. Infect. Dis.**, 130: 177-182.
- ROSSI, C.R. & KIESEL, G.K. 1974. Serological evidence for the association of bovine respiratory syncytial virus with respiratory tract disease in Alabama cattle. **Infect. Immun.**, 10: 293-298.
- SAMAL, S. & ZAMORA, M. 1991. Nucleotide sequence analysis of a matrix and small hydrophobic protein dicistronic mRNA of bovine respiratory syncytial virus demonstrates extensive sequence divergence of the small hydrophobic protein from that of human respiratory syncytial virus. **J. Gen. Virol.**, 72: 1715-1720.
- SANTOS, B. M.; PATARROYO, J. H. S.; PEREIRE, R. W. et al. 1996. Development of modified enzyme- linked immunosorbent assay (dot- ELISA) for detection of Newcastle disease antibodies in avian species. World's Poultry Congress, 1996, New Delhi. **Ptoceedings...** New Delhi: World Poultry Association, 383-384.

- SHARMA, R. & WOLDEHIWET, Z. 1990. Pathogenesis of bovine respiratory syncytial virus in experimentally infected lambs. *Vet. Microbiol.*, 23: 267-272.
- SHARMA, R. & WOLDEHIWET, Z. 1990. Increased susceptibility to *Pasteurella haemolytica* in lambs infected with bovine respiratory syncytial virus. *J. Comp. Path.*, 103: 411-420.
- SHARMA, R. & WOLDEHIWET, Z. 1992. Class-specific antibodies to bovine respiratory syncytial virus in experimentally infected lambs. *Epidemiol. Infect.*, 108: 135-145.
- SHARMA, R. & WOLDEHIWET, Z. 1992. Reinfection of lambs with bovine respiratory syncytial virus. *Res. Vet. Sci.*, 52: 72-77.
- SMITH, A.L.; TIGNOR, G.H. & MIFUNE, K. 1977. Isolation and assay of rabies serogroup viruses in CER cells. *Intervirology*, 8: 92-99.
- STEINHAGEN, P. & HUEBERT, P. 1995. Epidemiological observations on viral diseases of cattle, 1986 to 1993. *Tieraerztliche Umschau.*, 50 (4) : 264-271.
- STOTT, E.J. & TAYLOR, G. 1985. Respiratory syncytial virus. Brief Review. *Arch. Virol.*, 84: 1-52.

- TANTIVANICH, S., KLONKAMMUANKARN, K. & DESAKORN, V. 1997. Simplified, rapid diagnosis of respiratory syncytial virus from clinical specimens. **Asian Pac. J. Allergy Immunol.**, 15(2): 99-103.
- TAYLOR, R.N. 1992. Measurement of variation and significance in serological test. **Ann. N.Y. Academic Press.**, 2-31.
- TEIXEIRA, M.F.B. 1994. Um ELISA monoclonal para o diagnóstico sorológico de infecções pelo Herpesvírus bovino tipo 1 (BHV-1). Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 76p. Tese de Mestrado.
- VAN den INGH, T.S.G.A.M.; VERHOEFF, J. & VAN NIEUWSTADT, A.P.K.M.I. 1982. Clinical and pathologic observations on spontaneous bovine respiratory syncytial virus infections in calves. **Res. Vet. Sc.**, 33:152-158.
- VAN DONKERSGOED, J., RIBBLE, C.S., BOYER, L.G. & TOWNSEND, H.G. 1993. Epidemiological study of enzootic pneumonia in dairy calves in Saskatchewan. **Can. J. Vet. Res.**, 157:247-254.
- VERCAMMENT, F., BERKVEN, D. & VANSTEENKITE, W. 1998. A sensitive and specific 30-min dot-ELISA for detection of anti-leishmania antibodies in the dog. **Vet. Parasitol.**, 79(3):221-228.

- VERHOEFF, J. & WIERDA, A.; VAN NIEUWSTADT, A.P.K.M.I. & BUTELAAR, J.W.
1985. Spontaneous bovine respiratory syncytial virus infections in calves: Arterial blood gas, pH and bicarbonate values. **Vet. Rec.**, 117: 202-204.
- VERHOEFF, J.; WIERDA, A. & BOON, J.H. 1988. Clinical signs following experimental lungworm infection and natural bovine respiratory syncytial virus infection in calves. **Vet. Rec.**, 123: 346-350.
- WESTERNBRINK, F., BRINKHOF, J.M.A., STRAVER, P.J., QUAK, J. & DE LEEUW, P.W. 1985. Comparison of newly developed enzyme-linked immunosorbent assay with complement fixation and neutralization test for serology of bovine respiratory syncytial virus infections. **Res. Vet. Scien**, 38: 334-340.
- WESTERNBRINK, F. & KIMMAN, T.G. 1987. Immunoglobulin M-specific enzyme-linked immunosorbent assay for serodiagnosis of bovine respiratory syncytial virus infections. **Am.J.Vet.Res.**, 48(7): 1132-1137.
- WRIGTH, P. 1987. Enzyme immunoassay: observations on aspect of quality control. **Vet. Immunol and Immunopathol.**, 17: 441-452.

WRIGTH, P.F.; NILSSON, E.; VAN ROOIL, E. M. A. et al. 1993. Standardization and validation of enzyme- linked immunosorbent assay techniques for the detection of antibody in infectious disease diagnosis. **Revue Scient Tech. Office International Epizoo.**, 12 (2): 435-450.

ZAIDAN, J. 2000 in: <http://www.abcz.org.br/informat/>