

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA VETERINÁRIA

PADRONIZAÇÃO DE UMA PROVA DE ELISA PARA
IDENTIFICAÇÃO DE ANTICORPOS ANTI VÍRUS
ESTOMATITE VESICULAR INDIANA-3

Rossana M. Allende

Itaguaí, Rio de Janeiro

1992

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA VETERINÁRIA

Padronização de uma Prova de ELISA para Identificação de
Anticorpos anti virus Estomatite Vesicular Indiana-3

Rossana M. Allende

Sob a orientação do Dr. Albino Alonsc Fernández

Tese submetida como requisito
parcial para obtenção do grau de
Magister Scientiae em Medicina
Veterinária Preventiva

Itaguaí, Rio de Janeiro

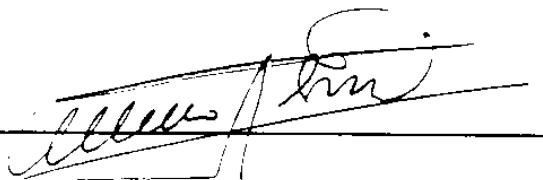
1992

Padronização de uma Prova de ELISA para Identificação de
Anticorpos Anti-vírus Estomatite Vesicular Indiana-3

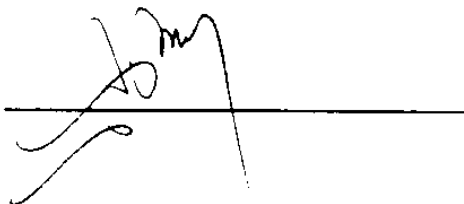
Rossana M. Allende

Aprovado em: 29/04/1992

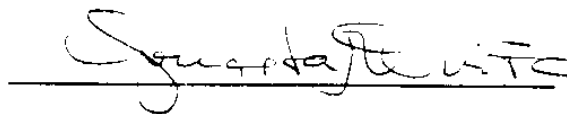
Albino Alonso Fernandez:



Francisco Benedito Rangel Filho:



Gonçala maria Martins Arita:



"À Banda Sérica"

em geral

... a Ignêz Garcia de Oliveira

e Lya Madureira Sepulveda

em particular

AGRADECIMENTOS

Aos Drs. Albino Alonso, Francisco Benedito Rangel Filho e Vicente Astudillo, pelos ensinamentos, orientação e incentivo.

Ao Dr. Raúl Casas Olascoaga, pelo incentivo e constante apoio, que possibilitou à realização do curso de mestrado e execução do trabalho de tese.

Aos Drs. Jepherson Johnston Carcamo (Servicio Agrícola Ganadero - Chile) e Jorge Baltar (Dirección de Lucha contra la Fiebre Aftosa, Uruguay) pelo auxílio na colheita e envio dos soros negativos estudados nesta pesquisa.

Ao Dr. Carlos Thadeu Porto Brandão, in memoriam, pelo auxílio na obtenção de soros positivos ao vírus em estudo.

Ao Dr. Pedro M.L. Germano pelo auxílio na análise estatística dos resultados.

Ao "guri de calça corrida" pela amizade incondicional e grande incentivo.

A todos os companheiros do laboratório de Referencia

de Panaftosa, pelo apoio e auxílio na realização do trabalho experimental.

À Sra. Astrid Rocha Pimentel pelo auxílio no preparo da bibliografia.

À todos que, de alguma forma, contribuíram para a execução deste trabalho.

BIOGRAFIA DA AUTORA

Rossana M. Allende, filha de Martin Allende e Hilda J. Spangenberg, nasceu em Montevideo - Uruguai, a 24 de setembro de 1955.

Ingressou na Faculdade de Veterinária da Universidade da República Oriental do Uruguai em 1974 e diplomou-se em "Doutor em Medicina e Tecnología Veterinária" em 10 de dezembro de 1980.

Desempenhou a função de Médica Veterinária da Direção de Luta contra a Febre Aftosa do Ministério da Ganaderia, Agricultura e Pesca do Uruguai, no período de 1981 a 1987.

Contratada pelo Centro Panamericano de Febre Aftosa (PANAFTOSA/OPS) desde janeiro de 1988 desempenhando a função de Viróloga do Laboratório de Referência em Diagnóstico do PANAFTOSA.

Iniciou o Curso de Pós-Graduação em Patologia Veterinária, área de concentração Medicina Veterinária Preventiva em março de 1989, concluindo os créditos em dezembro de 1990.

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

AgGl -	Antígeno Glicoproteína
AgVN -	Antígeno Virusneutralização
E -	Especificidade
ELISA SI -	Elisa Sandwich-Indireta
ELISA -	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
EV -	Estomatite Vesicular
MARA -	Ministério de Agricultura e Reforma Agrária
OIE -	Oficina Internacional de Epizootias
OPD -	Ortophenilendiamina
PBS -	Tampão Salina-Fosfato
PM -	Peso Molecular
S -	Sensibilidade
SDSA -	Serviço de Defesa Sanitária Animal
VEV -	Virus da Estomatite Vesicular
VG -	Valor Global
VN -	Virusneutralização
VPR+ -	Valor Preditivo do Resultado positivo
VPR- -	Valor Preditivo do Resultado negativo

Tese realizada no Laboratório de
Referência em Diagnóstico e
Controle de Vacinas do Centro
Panamericano de Febre Aftosa
(PANAFTOSA) OPAS/OMS.

ABSTRACT

A liquid-phase enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was developed for the detection of Vesicular Stomatitis (Vs) Indiana-3 virus antibodies in sera of naturally infected cattle, horses and swine. The viral glycoprotein was used as antigen.

The reliability and repeatability of the ELISA was determined by testing 533 animals sera, which originated from areas free of VS and 305 animals sera from areas where outbreaks occur. ELISA and virus neutralization (VN) results were correlated ($\chi^2=714,3$). ELISA shows similar sensibility and high specificity than VN, and no significant statistical difference was found between the replications of the test.

The ELISA test allows the testing of a larger number of sera in a shorter period of time and at less cost than the VN test. It can also be used in diagnostic laboratories in VS-free areas for the support of epidemiological surveillance programs.

RESUMO

A prova de ELISA competição em fase líquida foi adaptada para à identificação de anticorpos antivírus da Etomatite Vsicular (EV) sorotipo Indiana-3.

A glicoproteína viral foi usada como antígeno.

A validade e repetibilidade da prova foi determinada pelo estudo de 533 soros de animais oriundos de regiões livres de doença e 305 soros de animais oriundos de regiões de surtos de EV.

os resultados obtidos na ELISA tiveram elevada correlação com aqueles da virusneutralização (VN) ($\chi^2=714,3$), com sensibilidade similar e maior especificidade, e não se observou diferenças significativas nas repetições da prova.

A prova de ELISA possibilita estudar um grande número de amostras, em período de tempo e custo menores que a VN, além do que, a utilização do antígeno não infeccioso faz possível seu uso em regiões livres da doença, em apoio aos programas de vigilância epidemiológica.

SUMÁRIO

	PAG
1- Introdução	01
2- Revisão de literatura	05
2.1. Estomatite Vesicular	05
2.1.1. Histórico	05
2.1.2. Etiologia	14
2.1.3. Aspectos clínicos da doença	16
2.1.4. Aspectos epidemiológicos da doença	17
2.1.5. Diagnóstico	20
3- Material e Método	27
3.1. Antígenos	27
3.1.1. Vírus	27
3.1.2. Antígeno glicoproteína	28
3.1.3. Antígeno para produção de anti-soro de captura	28
3.2. Soros	29
3.2.1. Anti-soro de captura	29
3.2.2. Anti-soros detectores	30
3.2.2.1. Anti-soro detector de cobaia	30
3.2.2.2. Anti-soro detector de camundongo	30
3.2.3. Soros padrões	30
3.2.3.1. Soro padrão positivo	30

	xii
3.2.3.2. Soro padrão negativo	31
3.2.3.3. Soros de cobaias	31
3.2.4. Soro para pesquisa de Anticorpos	31
3.2.4.1. Soros de regiões livres do VEV	
Indiana-3	32
3.2.4.2. Soros de regiões com atividade do	
VEV-Indiana-3	32
3.3. Soluções	34
3.3.1. Tampão salina fosfato	34
3.3.2. Tampão de diluição	34
3.3.3. Solução salina fisiológica	34
3.3.4. Solução de lavagem	34
3.3.5. Tampão carbonato-bicarbonato	35
3.3.6. Substrato	35
3.3.7. Tampão ácido para substrato	35
3.4. Prova de virusneutralização	35
3.4.1. Células	36
3.4.2. Vírus	36
3.4.3. Soros	36
3.4.4. Mistura soro-vírus	36
3.4.5. Inoculação das microplacas	37
3.4.6. Leitura e interpretação da prova	38

3.5.	Prova de ELISA sandwich indireta (SI)	39
3.5.1.	Titulação do anti-soro de captura e do antígeno	39
3.5.1.1.	Adsorção do anti-soro de captura	39
3.5.1.2.	Antígeno	43
3.5.1.3.	Anti-soro detector	43
3.5.1.4.	Conjugado	44
3.5.1.5.	Substrato	44
3.5.1.6.	Leitura	44
3.5.2.	Titulação dos anti-soros detectores	45
3.6.	Prova de ELISA SI de competição em fase líquida	46
3.6.1.	Anti-soro de captura	48
3.6.2.	Fase líquida	48
3.6.3.	Transferência	50
3.6.4.	Anti-soro detector	51
3.6.5.	Conjugado	52
3.6.6.	Substrato	52
3.6.7.	Leitura e interpretação da prova	52
3.7.	Análise estatística	52
4-	Resultados	55
5-	Discussão	70

6-	Conclusão	81
7-	Bibliografia	83

1. INTRODUÇÃO

Na América Latina e nos países do Caribe existem cerca de 700 milhões de hectares de uso agrícola. Destes, aproximadamente 540 milhões são constituídos por pastagens naturais as quais suportam o mais importante rebanho pecuário do mundo, em termos absolutos e relativos. Após as aves, os bovinos e suínos despontam como as principais, espécies produzidas. Dos rebanhos bovinos, 80% (220 milhões) encontra-se na América do Sul.

Embora todo este efetivo nos pertença, nossos países enfrentam uma carência de proteínas de origem animal. Nossa produção de carne e leite é extremamente menor que a de outros países desenvolvidos (E.U.A. e Canadá), e este fato repercute diretamente sobre a qualidade de vida de nossas populações e sobre a expectativa de vida ao nascer (CASAS et al., 1983).

Essa baixa produtividade é explicada em parte pelo

pouco investimento de recursos na melhoria das pastagens, pela necessidade de utilização de suplementos alimentares em nossos rebanhos e principalmente pelas precárias práticas de manejo dos rebanhos, em particular no controle das enfermidades transmissíveis. Esta falta crônica de cuidados sanitários, ocasiona perdas econômicas equivalentes a 35% do potencial de produção de nossos rebanhos, sendo que nos países desenvolvidos esta perda alcança aproximadamente 7% (CASAS et al., 1983).

Entre as enfermidades transmissíveis que afetam os rebanhos encontra-se a Estomatite Vesicular (EV), incluída na lista "A" da Oficina Internacional de Epizootias, junto a outras doenças vesiculares. Estas doenças tem grande poder de difusão, sendo capazes de estender-se além das fronteiras nacionais, cujas consequências socio-econômicas e sanitárias podem ser graves e cuja incidência no comércio internacional de animais e produtos pecuários animais é importante.

A EV é uma doença viral que afeta várias espécies animais, domésticas e silvestres. O vírus da EV (VEV) tem uma ampla gama de hospedeiros, vertebrados e invertebrados, na natureza, incluindo o próprio homem, no qual produz um estado gripal. Dentre as espécies domésticas de importância econômica, a EV afeta principalmente equinos, bovinos e suínos, produzindo lesões vesiculares na boca, patas e úbere (HANSON, 1952; PATTERSON et al., 1958; TESH, 1975).

A presença da EV em determinadas regiões é um fator limitante para o intercâmbio comercial. Atualmente o movimento de animais entre as diferentes regiões, resultante de importações-exportações, é realizado com análise prévia dos soros para detectar a presença de anticorpos ant vírus da EV, entre outras.

Para essa finalidade, as provas sorológicas utilizadas são a fixação de complemento (BOULANGER & BANNISTER, 1960) e a vírus neutralização em células (FERREIRA, et al., 1979).

A prova de fixação de complemento tem demonstrado baixa especificidade, comprovando-se reações cruzadas entre sorotipos, além de problemas de pro e anticomplementariedade.

A prova de vírus-neutralização em células requer o uso do antígeno infeccioso o que torna inconveniente a sua realização em regiões livres da doença.

Ambas as provas são demoradas, obtendo-se os resultados após um mínimo de 20 hs para a fixação de complemento e de 48 hs para a vírus-neutralização.

O Centro Panamericano de Febre Aftosa (PANAFTOSA) localizado no estado do Rio de Janeiro, Brasil, é o organismo

da OMS que possui o laboratório de referência em diagnóstico de doenças vesiculares para América do Sul.

O PANAFTOSA possui uma coleção das cepas de vírus de EV isoladas em diferentes regiões do continente americano, assim como soros das diferentes espécies animais pertencentes às regiões de surtos da doença.

Visando-se dotar os programas de saúde animal com um instrumento de diagnóstico rápido e seguro, pelo qual possibilita-se uma melhoria na vigilância epidemiológica desta virose, foi desenvolvida a presente pesquisa. Nesta, utilizou-se como referência a coleção de soros positivos para o VEV, do PANAFTOSA.

Este trabalho objetiva:

1. Estudar a validade e repetibilidade da prova de ELISA competição em fase líquida, assim como a sua correlação com a virusneutralização, visando identificar anticorpos anti-VEV Indiana 3 (sorotipo este que, até o presente somente, foi isolado, de animais domésticos, no Brasil);
2. Propõe-se ainda a utilização de um antígeno não infeccioso (glicoproteína) para a realização da prova estudada.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Estomatite Vesicular (EV)

A EV é uma doença viral que afeta principalmente equinos, bovinos e suínos, embora tenha-se observado que VEV infecta naturalmente uma ampla gama de espécies animais, incluindo o homem (TESH, 1975). Atualmente a EV está restrita ao continente americano (O.I.E., 1990; PANAFTOSA, 1990) (fig. 1 e 2).

2.1.1. Histórico

Um surto de enfermidade vesicular, na Europa, foi descrito por veterinários franceses, durante a primeira Guerra Mundial em cavalos do exército que haviam sido importados dos E.U.A. e do Canadá (JACOULET, 1915). Esta foi a primeira referência de enfermidade vesicular em equinos. A partir desse

foco, a doença disseminou-se a outros países europeus e africanos, regiões nas quais não persistiu (HANSON, 1982).

Nos E.U.A., COTTON (1926) estabeleceu etiologia viral da doença, e isolou pela primeira vez o VEV a partir de lesões vesiculares de bovinos e equinos do estado de Indiana. A cepa isolada foi denominada Indiana. No ano seguinte, o mesmo pesquisador (COTTON, 1927), identificou uma nova cepa viral, que causa idêntica sintomatologia, porém é antigenicamente diferente à cepa Indiana. Esta nova cepa isolada de animais oriundos do estado de New Jersey (E.U.A.), foi denominada New Jersey.

Segundo ARBELAEZ et al. (1987), a primeira descrição da doença na América do Sul, foi feita na Colômbia, em 1929, no Departamento de Huila, afetando bovinos, equinos e suínos.

Posteriormente, em 1939, a EV foi detectada em equinos da Província de Buenos Aires em La Plata, Argentina, (BAUDOU, 1939) e na Venezuela, em 1941, acometendo bovinos, equinos e suínos (BASTERRECHEA-ELORRIETA, 1943).

Em 1961, em Trinidad, América Central, JONKERS et al. (1964) isolaram uma outra cepa que denominaram Cocal. O isolamento foi a partir de ácaros do gênero *Gigantolaelaps*. Esta cepa mostrou relação com o vírus Indiana, porém não com o

foram obtidos em Belém, Pará (Brasil), também a partir de *Gigantolaelaps* (apud FEDERER et,al., 1967).

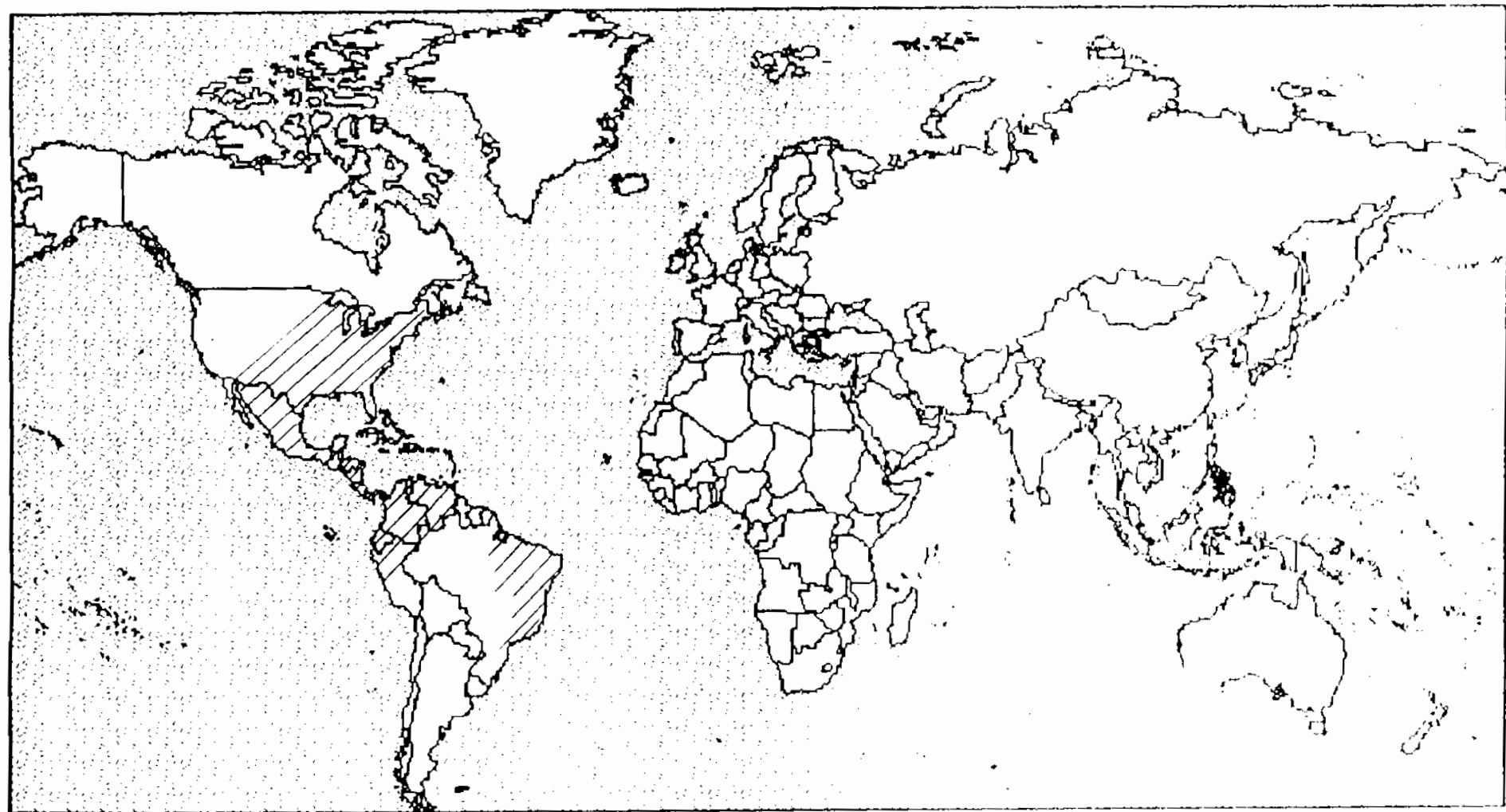


Fig. 1 - Distribuição da Estomatite Vesicular no mundo (///)

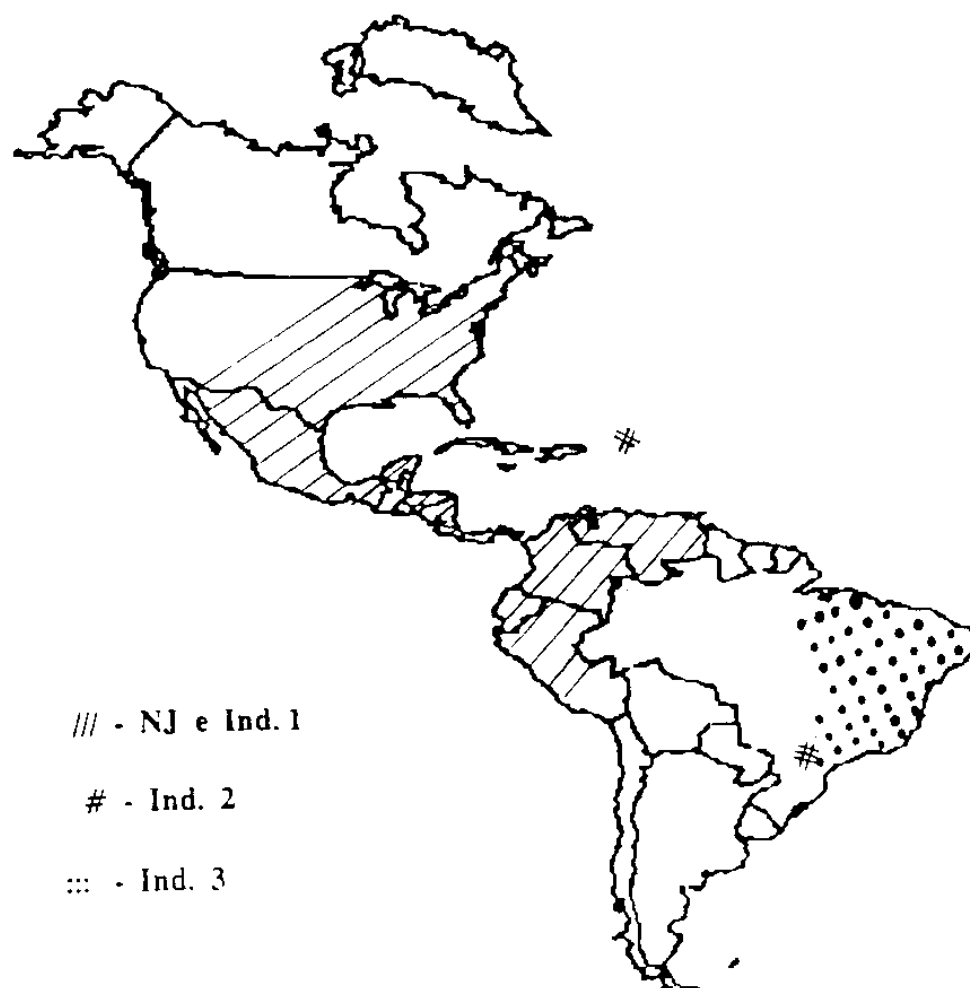


Fig. 2 - Distribuição do VEV no continente americano.

Uma cepa idêntica a cepa Cocal, foi isolada em 1963 a partir de amostras colhidas, de equinos, na localidade de Salto, Província de Buenos Aires (Argentina) (GARCÍA PIRAZZI et al., 1966). Esta cepa foi denominada cepa Salto.

No Brasil, o histórico da EV começa no ano 1964, com um surto de enfermidade vesicular em equideos, no Estado de Alagoas, onde foi isolada uma cepa que recebeu a denominação de Alagoas (ANDRADE, 1974; ANDRADE et al., 1980). Este foi o primeiro isolamento do vírus em animais domésticos, no Brasil.

FEDERER et al. (1967) estudaram as relações entre os diferentes VEV, utilizando as provas de fixação de complemento e de vírus neutralização em camundongo. Neste mesmo trabalho, propôs-se a classificação do sorotipo Indiana em três subtipos: Indiana-1, para a amostra clássica isolada nos E.U.A.; Indiana-2, para as amostras Cocal (Trinidad) e Salto (Argentina), Indiana-3 para a amostra Alagoas (Brasil). As relações sorológicas cruzadas entre as diferentes cepas do sorotipo Indiana, foram também observadas por NOZAWA (1976).

Ainda no Brasil, o VEV foi detectado em vários outros Estados, acometendo diversas espécies animais de importância econômica. A continuação apresenta-se um detalhe cronológico dos surtos de EV no Brasil.

No Estado de São Paulo, identificou-se o VEV em amostras de epitélio equino, do Município de Rancharia (PUSTIGLIONE NETTO et al., 1967) e do Município de Ribeirão Preto (ARITA e ARITA, 1983). Em ambos os casos, o vírus isolado foi classificado como Indiana-2. A mesma cepa foi também responsável pela infecção de equinos no Estado do Rio Grande do Sul (PRADO et al., 1979).

Em 1972, no Estado de Minas Gerais, foi feita a notificação de doença vesicular, atingindo equinos (CONTEIRO, 1972), porém o primeiro isolamento de vírus, naquele Estado, identificado como sorotipo Indiana-3, foi feito em bovinos em 1977 (ROCHA ARAÚJO et al., 1977).

Em 1984, novamente identifica-se o sorotipo Indiana-3. Desta vez, a partir de amostras colhidas de bovinos do Estado do Ceará (ARITA et al., 1985); e de bovinos, equinos e suínos do Estado de Minas Gerais (DEAK et al., 1987).

Nos Estados do Piauí e Sergipe, também em 1984, bovinos, equinos, suínos, ovinos e caprinos foram acometidos por uma doença vesicular, constando identificação do sorotipo Indiana, nas amostras provenientes do Estado de Sergipe, nos registros do Serviço de Defesa Sanitária Animal (SDSA/MA, 1991).

No ano de 1985, novamente o sorotipo Indiana-3 acometeu bovinos, equinos e suínos do Estado de Minas Gerais. o mesmo vírus foi identificado também em amostras de animais com doença vesicular no Estado do Piauí (SDSA/MA, 1991).

No Município de Rezende, Rio de Janeiro, em 1986, vários equinos e bovinos foram acometidos de doença vesicular e, do material colhido, foi isolado VEV, identificado como Indiana-3 Agulhas Negras (ALONSO FERNANDEZ e SOMAHL, 1986, informação verbal) .

No mesmo ano o sorotipo Indiana-3 foi isolado de amostras de epitélio de animais dos Estados do Ceará, Minas Gerais e São Paulo (SDSA/MA, 1991).

Mais recentemente (1988 e 1991) o sorotipo Indiana-3 foi isolado novamente de bovinos do Estado do Ceará, sendo este estado o último com ocorrência de EV registrado pelo Serviço de Defesa Sanitária Animal no Brasil (SDSA/MA, 1991).

Em quase trinta anos a doença disseminou-se, no Brasil desde a região Nordeste até o Sudeste do país, acometendo três espécies domésticas (equinos, bovinos e suínos) de grande importância econômica (Tabela 1).

Tabela 1: Histórico da Estomatite Vesicular no Brasil

DATA	ESTADO	TIPO*
1964	Alagoas	IND-3
1967	São Paulo	IND-2
1972	Minas Gerais	IND-3**
1977	Minas Gerais	IND-3
1978	R.Grande do Sul	IND-2**
1979	São Paulo	IND-2
1980	Distrito Federal	IND ⁺
1980	Minas Gerais	IND ⁺
1980	R.Grande do Sul	IND ⁺
1981	Minas Gerais	IND-3
1984	Ceará	IND-3
1984	Minas Gerais	IND-3
1984	Sergipe	IND ⁺
1985	Minas Gerais	IND-3
1985	Piauí	IND-3
1986	Ceará	IND-3
1986	Minas Gerais	IND-3
1986	Rio de Janeiro	IND-3
1986	São Paulo	IND-3
1988	Ceará	IND-3
1991***	Ceará	IND-3

* De acordo com FEDERER e col. (1967).

** Diagnóstico realizado por identificação de anticorpos.

*** Até semana 28 (12/07/91).

+ Sem informação de subtipo.

2.1.2. Etiologia

O VEV pertence à família Rhabdoviridae, gênero *vesiculovirus* (MATTHEWS, 1982).

A família Rhabdoviridae possui representantes que infectam uma ampla gama de hospedeiros animais (vertebrados e invertebrados) e vegetais (KNUDSON, 1973; EMERSON, 1985).

O VEV é o protótipo da família e tem sido estudado em detalhe. Possui a forma de um projétil (com uma extremidade arredondada e outra achatada) ou baciliforme (ambas extremidades arredondadas) (KNUDSON, 1973). Mede aproximadamente 65 x 175 nanômetros (nm), tendo um nucleocapsídeo de simetria helicoidal rodeado pelo envelope, do qual emergem projeções denominadas espículas o ácido nucleico é do tipo ARN de fita simples, com peso molecular (PM) de aproximadamente $4-5 \times 10^6$ daltons (d) (EMERSON, 1985).

A análise por electroforese em gel de poliacrilamida revela cinco proteínas estruturais sendo três do nucleocapsídeo: "N", com PM de $50 - 62 \times 10^3$ d; "NS" com PM de $40 - 50 \times 10^3$ d e "L", com PM de 150×10^3 d. As duas proteínas restantes encontram-se no envelope: "M" com PM de $20-30 \times 10^3$ d e "G" com PM de $70-80 \times 10^3$ d (MATHEWS, 1982). Esta última,

denominada glicoproteína, corresponde as espículas. A glicoproteína é específica do subtipo e é a responsável pela indução da formação de anticorpos que neutralizam as partículas virais íntegras (KELLEY et al., 1972; CARTWRIGHT e BROWN 1972).

Posteriormente, LEFRANCOIS e LYLES (1982) e WAGNER (1984) mediante estudos dos determinantes antigênicos da glicoproteína do VEV com anticorpos monoclonais, acharam 40-50% de homologia entre os sorotipos New Jersey e Indiana, porém comprovaram que os determinantes antigenicos responsáveis pela indução da formação de anticorpos neutralizantes, são específicos do sorotipo.

O Comité Internacional de Taxonomia de Vírus tem classificado 4 membros dentro do gênero *Vesiculovírus*. Eles são: 1) Estomatite vesicular; 2) Chandipura; 3) Isfahan e 4) Piry. Por sua vez, o VEV é subdividido em 5 sorotipos: New Jersey, Indiana, Cocal, Argentina e Brasil (Alagoas) (MATHEWS, 1982).

Entretanto, FEDERER et al., (1967) estudaram as relações antigenicas e imunogênicas dos diferentes VEV utilizando as provas de fixação de complemento e virusneutralização, observando reações sorológicas cruzadas entre as cepas Indiana, Cocal, Argentina e Brasil. Neste mesmo trabalho foi proposto a divisão do sorotipo Indiana em três

subtipos: Indiana-1, para a amostra clássica isolada nos E.U.A.; Indiana-2 para as amostras Cocal e Argentina, e Indiana-3 para a amostra Brasil (Alagoas). Este critério de classificação, com base nas relações imunológicas das amostras, vem sendo utilizado desde a época por PANAFTOSA, e pelos laboratórios oficiais de diagnóstico das doenças vesiculares da América do Sul.

2.1.3. Aspectos clínicos da doença

A sintomatologia clínica da EV é indistinguível daquela das outras doenças vesiculares. O período de incubação da doença, em bovinos, equinos e suínos varia entre 24 horas e alguns dias.

A primeira manifestação clínica em bovinos e equinos é a sialorreia, porem em suínos observa-se inicialmente laminite. Estes sinais, geralmente são acompanhados por febre.

Posteriormente aparecem pápulas na mucosa oral, glândula mamária e rodete coronário. Estas pápulas transformam-se em vesículas, as quais se rompem liberando um fluído aquoso, claro, rico em vírus; transformando-se mais tarde em úlceras (CHOW e MC NUTT, 1953; RIBELIN, 1958; SEIBOLD e SHARP, 1960; YUILL, 1981; HANSON, 1982).

Durante o período febril e vesicular, os animais apresentam prostração e anorexia. Posteriormente a febre diminui, podendo aparecer um segundo pico febril. As lesões tendem a curar em 8-14 dias, podendo aparecer mastite, como uma das sequelas das lesões na glândula mamária (MASON, 1978; YUILL, 1981).

Em alguns casos a doença pode apresentar-se sob forma subclínica (não vesicular), com um quadro de debilitação geral (HANSON, 1981, YUILL, 1981).

Os animais recuperados da doença desenvolvem anticorpos para o subtipo viral infectante.

2.1.4. Aspectos epidemiológicos da doença

Atualmente, a EV está restrita aos E.U.A. e México, e a vários países na América Central e na América do Sul (ASTUDILLO et al., 1984; BARRETO, 1984; MC DANIEL, 1984; MASON, 1984). A Fig. 1 mostra a distribuição geográfica da doença.

A distribuição do subtipo viral usado na presente pesquisa, assim como as datas dos seus isolamentos estão relacionados na Fig. 2 e Tabela 1 respectivamente.

Dentre as principais características epidemiológicas da EV, destaca-se que: 1) os focos iniciam-se súbita e simultaneamente, durante épocas quentes e chuvosas, em propriedades bastante separadas entre si. 2) Aproximadamente entre 10-15% dos animais desenvolvem sinais clínicos, embora tem-se observado rebanhos com taxas de ataque de até 100%. Os animais adultos são os mais afetados (MASON, 1978).

Nas regiões endêmicas observa-se que a topografia, geralmente, é de terreno plano, com águas paradas, vegetação frondosa e umidade elevada (MASON, 1978); a doença tem uma incidência sazonal (desaparece no inverno); e existe ocorrência de infecções em animais silvestres, em humanos e em suínos (JOHNSON, 1969; MASON, 1978; YUILL, 1981; BRANDÃO, 1989). As regiões de ocorrência epidêmica estão associadas a presença de correntes naturais de água, arbustos e árvores (MASON, 1978, KOTAIT, 1990); e as espécies susceptíveis encontram-se em geral livres de anticorpos (MASON, 1978).

A transmissão do vírus por contato direto é difícil em bovinos e equinos, mas pode ocorrer em suínos (HANSON, 1982). Feridas na mucosa oral podem servir como porta de entrada ao VEV (HANSON, 1982, ARBELAEZ et al., 1987). A infecção no homem, tendo como fonte de infecção animais doentes é provavelmente por contaminação com aerossóis infecciosos, através das vias nasofaringeana, conjuntiva ocular ou

escoriações na pele (JOHNSON, 1969; TESH e JOHNSON, 1975; MASON, 1978; YUILL, 1981).

Três aspectos epizootiológicos da EV sugerem que se trata de uma enfermidade transmitida por vetores: 1) a incidência sazonal; 2) a limitação ecológica; e 3) a rapidez e forma de disseminação (HANSON, 1952). TESH et al. (1971) descreveram a replicação do VEV em mosquitos e a sua transmissão via transovariana, o que poderia explicar como o vírus se perpetua na natureza. Os insetos parecem ter um importante papel como vetores e reservatórios do VEV na natureza. O VEV Indiana já foi isolado de *Culex* sp. (JONKERS et al., 1964); de *Aedes* sp. (SUDIA et al., 1967); de *Phlebotomus* sp. (SHELOKOV et al., 1962; JOHNSON et al., 1969); de *Drosophila melanogaster*, de *Lutzomya trapidoi* (YUILL, 1981); de *Gigantolaelaps* (JONKERS et al., 1964).

Também os animais silvestres, principalmente as espécies arbóreas (macacos, preguiças, morcegos, porcos espinhos, ratos) e semiarbóreos (mamíferos formigueiros, marsupiais, quati) são reservatórios do VEV, desenvolvendo altos títulos de anticorpos anti-VEV, em comparação com os títulos observados em animais terrestres (veados, porcos selvagens) (JOHNSON, et al., 1969; MASON, 1978). Todos estes animais encontram-se em grande variedade de habitats ecológicos, e geralmente sem contacto regular com os animais

domésticos e o homem. É óbvio, que o VEV mantém-se nas regiões selváticas, em forma independente do ciclo de infecção dos animais domésticos.

Entretanto, JOHNSON et al. (1969) admitiram a hipótese de que o vírus Indiana, seria basicamente um vírus de plantas. Neste caso, segundo os pesquisadores, o vírus teria um envelope duplo o que o faria não infeccioso para os vertebrados. Porém, alguns insetos, principalmente *Phlebotomus*, seriam capazes de infectar-se sugando as plantas. O vírus se replicaria no inseto, perdendo um envelope, adquirindo assim infecciosidade para os vertebrados.

Os pesquisadores sugerem que se estabeleceria, desta maneira, um ciclo planta-inseto-vertebrado, e que este último poderia se infectar não somente por picadas de inseto, mas também pela ingestão de insetos infectados junto com as plantas.

2.1.5. Diagnóstico

O diagnóstico clínico da EV, pode ser confundido, dependendo da espécie acometida, com o de outras doenças vesiculares, tais como a Febre Aftosa, a Doença Vesicular dos Suínos e o Exantema Vesicular. Por este motivo, o diagnóstico

laboratorial, com a identificação do vírus em amostras do líquido vesicular ou epitélio, lesionado, é imprescindível (CARBREY, 1984).

Para tal identificação, utilizam-se as provas de fixação de complemento (BROOKSBY, 1948; FEDERER et al., 1967), de virus neutralização em camundongos (FEDERER et al., 1967) ou em células (FERREIRA et al., 1979) de ELISA (FERRIS e DONALDSON, 1988; ALONSO et al., 1991), e a prova de imunofluorescência com anticorpos monoclonais (FERNANDEZ, 1988).

A exemplo do que acontece na natureza, o VEV, em condições experimentais, infecta uma ampla gama de sistemas biológicos, como ovos embrionados (SORENSEN, 1958); camundongos (FEDERER et al., 1967; MASON, 1978), cobaias (ARBELAEZ e ROCHA, 1983) e diversas linhas de cultivos celulares animais e vegetais (FERREIRA et al., 1979; YUILL, 1981; CARBREY, 1984). Estes substratos biológicos são utilizados para a replicação experimental do vírus.

Quando a identificação do agente causal não é possível, é necessário então proceder ao diagnóstico pela identificação de anticorpos em amostras, pareadas, de soros. Um aumento do título de anticorpos, da ordem de 0,6 log, é considerado indicativo de enfermidade recente.

Em geral, a presença de anticorpos no soro pode ser evidenciada pela refratariedade do animal a uma reinfecção, pela capacidade do soro do animal convalescente de neutralizar o antígeno "in vivo" ou "in vitro", e de fixar o complemento em presença do antígeno ou de formar linhas de precipitação quando reage com o antígeno.

A refratariedade do animal a uma infecção é de curta duração na EV. SORENSEN et al. (1958) infectaram experimentalmente bovinos com o VEV e os reinfetaram após 30 dias, comprovando o desenvolvimento de lesões vesiculares típicas da doença. Porém, esses animais evidenciam altos títulos de anticorpos neutralizantes, por inoculação das misturas soro-vírus em ovos embrionados.

Outros substratos biológicos, tais como camundongos adultos (KARSTAD e HANSON, 1958; FEDERER et al., 1967), camundongos lactantes (CASTAÑEDA et al., 1964) e cultura de células (CASTAÑEDA et al., 1964; FEDERER et al., 1967; FERREIRA et al., 1979) foram utilizadas para as provas de neutralização, demonstrando todos eles sensibilidade à replicação do VEV.

A utilização de culturas de células, demonstrou ser mais econômica do que outros substratos utilizados para a realização da prova de neutralização (CASTAÑEDA et al., 1964), sendo adotada como prova de rotina em vários laboratórios de

diagnóstico (CARBREY, 1984; ALONSO, 1986). Porém, tem-se observado reações, não específicas, quando estudados soros de bovinos e de suínos sadios, provenientes de regiões livres de EV, sem suspeita clínica nem epidemiológica da doença (KING, 1983; WILKS et al., 1984; ALONSO, 1988 informação verbal; ALLENDE, dados não publicados).

GELETA e HOLBROOK, (1961), realizaram comparações entre as técnicas de neutralização e fixação do complemento direta, para identificação de anticorpos de EV. Os autores observaram que os anticorpos fixadores de complemento alcançaram nível máximo em duas semanas pós-inoculação, declinando gradualmente até desaparecer, aproximadamente aos 110 dias pós-inoculação. Relatam também, a presença de reações cruzadas entre os sorotipos New Jersey e Indiana. Entretanto, no mesmo estudo, os anticorpos neutralizantes foram detectados durante todo o período de duração do experimento (48 meses), em títulos altos, mas flutuando irregularmente.

A prova de fixação de complemento foi também utilizada por outros pesquisadores, sofrendo modificações nos tempos e temperaturas de incubação (BOULANGER e BANNISTER, 1960), ou passando de tubos a microplacas (CARBREY, 1984), na tentativa de melhorar os resultados obtidos. Porém, além das reações cruzadas, já descritas por GELETA e HOLBROOK (1961), ocorrem fenômenos de pró, e anti-complementariedade quando

trabalhados soros de suínos e bovinos (KANG e PREVEC, 1970; SONDAHL, informação verbal, 1985).

A prova de imunodifusão em gel de agar também tem sido utilizada para a detecção de anticorpos EV (NIETO e SEGRE, 1958; MYERS e HANSON, 1962; ALONSO et al., 1979; CENTENO e OBIAGA, 1979). Esta prova, que identifica anticorpos precipitantes, demonstrou ter pouca sensibilidade e observam-se fortes reações cruzadas entre os sorotipos New Jersey e Indiana. Para evitar estas reações não desejadas, WILKS, et al. (1984) desenvolveram uma prova de imunoeletrosmoforese, utilizando como antígeno a glicoproteína purificada do VEV. A prova era capaz de detectar anticorpos em soros de animais convalescentes de EV, mas a sua sensibilidade mostrou-se menor que aquela encontrada na virusneutralização.

Em 1985, VERNON e WEBB, desenvolveram uma prova de ELISA indireta para detectar anticorpos Ig M em soros de animais experimentalmente infectados com o sorotipo New Jersey do VEV. A prova foi capaz de detectar infecções recentes. Porém, após 64 dias de iniciada a infecção, os títulos de Ig M caíram, não sendo possível detectar estágios avançados de convalescência.

No ano seguinte, WORKMAN et al., (1986) desenvolveram uma prova de ELISA para detectar anticorpos, em geral, de EV em

soros de bovinos experimentalmente infectados com os sorotipos New Jersey e Indiana do VEV. Os autores encontraram reações cruzadas entre ambos sorotipos. Isto era devido, possivelmente, ao fato de que o vírus é fixado na placa com um tampão fortemente básico que alteraria a estrutura viral, expondo as proteínas internas (N, NS e L).

Para evitar esse tipo de reações, foi que autores que trabalham com o vírus da febre aftosa, preferiram usar a prova de ELISA de competição em fase líquida para a identificação de seus epitopos (Mc CULLOGH et al., 1985) e de anticorpos antipolimerase do mesmo vírus (ALONSO et al., 1990).

Desta maneira, considerando-se os trabalhos dos autores citados, ALLENDE et al., (1991) desenvolveram uma prova de ELISA de competição em fase líquida, para identificar anticorpos VEV, sorotipos New Jersey e Indiana 1. A prova era sensível e específica, não observando-se reações cruzadas entre os diferentes sorotipos. Nesse trabalho, propõe-se a utilização da glicoproteína do VEV (MARTINS et al., 1991) como antígeno, já que ela é específica do sorotipo e, é ainda, responsável pela indução da produção de anticorpos neutralizantes (KELLEY et al., 1972).

A prova de ELISA desenvolvida por ALLENDE et al. (1991) é a prova estudada na presente pesquisa, para identificar anticorpos anti VEV-Indiana-3.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Antígenos

3.1.1. Vírus

A cepa VEV-Indiana 3, Br/86, isolada de amostras de epitélio bovino do município de Rezende (RJ) ano de 1986; replicou-se em células BHK-21 clone 13. Assim, quando desenvolveu-se aproximadamente 80% de efeito citopático, as suspensões virulentas foram submetidas aos processos de congelamento e descongelamento. Posteriormente foram clarificadas, retirando-se os debris celulares, por centrifugação, a 1000xg, durante dez minutos. O sobrenadante, então obtido, após a clarificação foi fracionado em ampolas de vidro de 1ml e conservado em nitrogênio líquido a -170°C. O antígeno assim obtido (Ag VN) foi utilizado na realização das provas de virusneutralização. Também foram utilizados para algumas provas de VN as cepas VEV-New Jersey e VEV-Indiana 1, pertencentes ao cepário do PANAFTOSA.

3.1.2. Antígeno glicoproteína (Ag Gl)

O Ag Gl foi obtido conforme o procedimento descrito por MARTINS et al. (1991), resumidamente, suspensões da Ag VN foram centrifugadas a 75000xg por 1 hora. O sedimento obtido foi resuspendido ao 5% do volume original em tampão TEN e misturado ao detergente não iônico OGP. Após 1 hora de incubação a 25°C, foi centrifugado por 2 horas a 85000xg. O sobrenadante contendo a glicoproteína foi dialisado 36 horas a 4°C e conservado a 4°C com 0,05% de NaN_3 em frações de 1 ml. A glicoproteína foi utilizada na realização das provas de ELISA. Também foram utilizadas para algumas provas de ELISA, as glicoproteínas dos VEV-NJ e VEV-Indiana-1.

3.1.3. Antígeno para produção de anti-soro de captura

A cepa de VEV-Indiana 3 relacionada em 3.1.1, foi replicada em monocamadas de células IBRS-2. Quando desenvolveu-se aproximadamente 80% de efeito citopático, as suspensões virulentas foram submetidas aos processos de congelamento e de descongelamento. Posteriormente foram clarificadas por centrifugação, a 1000xg, durante dez minutos, retirando-se assim os debris celulares. O sobrenadante obtido após a clarificação, contendo o antígeno, foi concentrado por ultracentrifugação a 75000xg, (ultracentrífuga Sorvall-OTD75B, rotor AH 629) durante 60 minutos. O sedimento então obtido, foi resuspendido a 5% do volume original, em tampão salina fosfato

(PBS), e utilizado como antígeno (Ag IBRS-2) na preparação do soro hiperimune de coelho.

3.2. Soros

3.2.1. Anti-soro de captura

Dois coelhos adultos foram inoculados por via intramuscular profunda, com 1,0 ml do Ag IBRS-2 emulsificado, volume a volume, com adjuvante incompleto de Freund. Quatro semanas após a primeira inoculação, os coelhos foram reinoculados com o mesmo antígeno e a mesma dose, e pela mesma via.

Após sete dias da reinoculação, fez-se a terceira inoculação, pela mesma via, a mesma dose, porém com o Ag IBRS-2, sem adjuvante.

Uma semana após a terceira inoculação, via punção cardíaca, obteve-se sangue suficiente para a obtenção de soro hiperimune. Uma vez separado o soro, este foi inativado em banho maria, a 56°C, por trinta minutos, filtrado em membrana de 0,20 μ m e conservado em frascos de vidro, em volume de 1ml, a -20°C.

3.2.2. Anti-soros detectores

Foram utilizados dois anti-soros detectores, um preparado em cobaia e o outro em camundongo.

3.2.2.1. Anti-soro detector de cobaia - Foi utilizado como anti-soro detector o soro hiperimune de cobaia, homologo ao vírus relacionado em 3.1.1, que foi obtido na soroteca do Laboratório de Referencia em Diagnóstico, de PANAFTOSA, preparado segundo técnica descrita por ALONSO (1983).

3.2.2.2. Anti-soro detector de camundongo - Foi produzido por três inoculações via intramuscular profunda, com o Ag VN, em camundongos adultos, seguindo-se o mesmo esquema descrito em 3.2.1. Nos camundongos utilizou-se a dose de 0,2 ml em cada inoculação.

3.2.3. Soros padrões

3.2.3.1. Positivos - Foi selecionado um soro de equino convalescente da infecção natural com o vírus relacionado em 3.1.1. Este soro foi utilizado como controle positivo nas provas de VN e ELISA. Também foram selecionados soros de bovinos inoculados com VEV-New Jersey e com VEV-Indiana-1.

3.2.3.2. Negativo - Utilizou-se soro fetal bovino (SIGMA) como controle negativo, das provas de VN e ELISA.

3.2.3.3. Cobaias - Vinte cobaias adultas, de aproximadamente 500 g, de peso corporal, foram inoculadas via intradermo-plantar, com o VEV-Indiana-3, Br/86, previamente adaptado a essa espécie.

Amostras de sangue foram colhidas antes da inoculação, e nos dias 3, 5, 7, 14, 21, 28 e 90 após inoculação. Uma vez obtido os soros, estes foram inativados em banho maria a 56°C, por 30 minutos, e distribuídos em frascos de vidro, contendo 1ml, conservados a -20°C.

3.2.4. Soros para Pesquisa de Anticorpos

Foram colhidas 533 amostras de soro de animais provenientes de regiões livres de EV, considerados como verdadeiros negativos. De áreas endêmicas, com atividade do vírus da EV Indiana-3, foram colhidas 305 amostras de soro, considerados como verdadeiros positivos, havendo dentre eles amostras provenientes de animais a partir dos quais havia sido isolado o vírus.

Adotou-se este critério, para classificar os soros em positivos e negativos dada a impossibilidade de inocular

animais suscetíveis com o vírus da EV, por razões de segurança biológica.

3.2.4.1. Soros de regiões livres do VEV-Indiana-3

Este grupo de soros estava formado por

- 1) 294 soros bovinos, e 56 soros suínos provenientes do Chile (Servicio Agrícola Ganadero, SAG, Chile);
- 2) 102 soros de bovinos provenientes do Uruguai (Dirección de Lucha contra la Fiebre Aftosa - DILFA, MGAP , Uruguai);
- 3) 25 soros de bovino provenientes da Itália (PANAFTOSA) e
- 4) 56 soros de equinos provenientes da Argentina (PANAFTOSA).

Todos os soros foram inativados em banho-maria a 56°C por trinta minutos e conservados em frascos de vidro a -20°C.

3.2.4.2. Soros de regiões de atividade do VEV Indiana-3

Este grupo de soros colhidos em diferentes datas, no Brasil, pertencem a coleção de soros de PANAFTOSA, e estava formado pelas seguintes amostras:

- 1) 65 soros de equinos e 19 soros de bovinos, muitos deles, com lesões vesiculares, dos Estados do Rio de Janeiro, Minas Gerais, Alagoas, Sergipe e Piauí. Das

amostras epiteliais colhidas destes animais foi diagnosticado VEV-Indiana 3.

2) 221 soros de suínos, clinicamente sadios, colhidas em matadouros do Estado do Pará, e estudados previamente, por virusneutralização, para identificação de anticorpos de EV (BRANDÃO, 1989). Estes soros também foram inativados e conservados a -20°C como descrito em 3.2.4.1.

3.3. Soluções

3.3.1. Tampão salina fosfato (PBS)pH 7.4

NaCl	8,0 g
K CL	0,2 g
Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O	2,9 g
K H ₂ PO ₄	0,2 g
H ₂ O destilada	1000 ml

3.3.2. Tampão de diluição

PBS	100 ml
Tween 20	0,05 ml
Soro normal coelho	2,0 ml
Ovoalbumina (ICN. Biomedicals, Inc., Costa Mesa, CA, USA)	1,0 ml
Soro normal das espécies animais em estudo	2,0 ml (de cada uma)

3.3.3. Solução salina fisiológica pH 7.4

NaCl	8,5 g
H ₂ O destilada	1000 ml

3.3.4. Solução de lavagem

Solução salina fisiológica	500 ml
Tween 20	0,25 ml

3.3.5. Tampão carbonato-bicarbonato 0,05 M pH 9.6

Na_2CO_3 (0.015 M)	0,8 g
Na HCO_3 (0.035 M)	1,47 g
H_2O destilada	500 ml

3.3.6. Substrato de peroxidase

O-phenilendiamina (OPD)	10 mg
Tampão ácido	25 ml
Diluir imediatamente antes de usar.	

3.3.7. Tampão ácido para diluir OPD

$\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (0.1 M)	6,5 ml
Na_2HPO_4 (0.2 M)	7,0 ml
H_2O_2 (30 vol.) diluído 1:1150	11,5 ml

3.4. Prova de virus neutralização (VN)

A pesquisa de anticorpos neutralizantes nos soros, foi realizada pela técnica descrita por FERREIRA et al. (1979).

O título neutralizante de um soro foi definido pela recíproca da diluição desse soro, expresso em logaritmo de base 10, que protegia 50% da monocamada de células da linhagem IB-RS-2, clone 17, frente a $10^{2 \pm 0.5} \text{DICC}_{50\%} / 0,1 \text{ ml}$ de vírus.

3.4.1. Células

Células IB-RS-2, clone 17, cultivadas em monocamada, em frascos de Roux, foram tratadas com tampão carbonato de sódio pH 7,7 contendo 1% de tripsina, e diluídos em meio Eagle acrescido de 10% de soro fetal bovino. A suspensão contendo 300.000 células por mililitro, foi depositada nas cavidades de placas para microtécnica (Falcon 3040) na quantidade de 100 μ l por cavidade. Imediatamente após, as placas foram cobertas com tampa de vidro ou de plástico e incubadas a 37°C em estufa com atmosfera úmida, contendo 5% de CO₂, durante 24 horas.

3.4.2. Vírus

Foram utilizadas como antígeno as cepas VEV-Indiana 3 Br/86, descrita em 3.1.1., VEV-Indiana 1 Costa Rica/72 e VEV-New Jersey Costa Rica/66.

As suspensões estoque de vírus tinham todas elas, um título superior a 10^{6.5}DICC₅₀/ml.

3.4.3. Soros

Após inativação, os soros foram submetidos à diluições base 4 em meio Eagle, sem soro, a partir de 1:2 até 1:2048.

3.4.4. Mistura soro-vírus

A 0,5ml de cada diluição de soro, foi adicionado

0,5ml de uma suspensão de vírus contendo $10^{3,3}$ DICC₅₀/ml, diluído em meio Eagle, sem soro. A mistura soro-vírus, incubou-se na estufa, a 37°C durante 1 hora.

3.4.5. Inoculação das microplacas

No momento da inoculação das microplacas, o meio de crescimento das células foi eliminado invertendo-se as placas e secando-as com auxílio de papel absorvente. Imediatamente, 100 μ l de cada diluição da mistura soro-vírus foi depositada em seis cavidades, reservando-se as duas cavidades inferiores de cada coluna para o controle de toxicidade da diluição de soro respectiva (fig. 3)

SORO Nº 1						SORO Nº 2						
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1: 4	1:1 6	1:6 4	1:25 6	1:102 4	1:409 6	1: 4	1:1 6	1:6 4	1:25 6	1:102 4	1:4096
B												
C												
D												
E												
F												
G			CON	TRO	LE				CON	TRO	LE	
H		TOX I	CID A	DE	SORO			TOX I	CID A	DE	SORO	

Figura 3: Distribuição das amostras soro/vírus e dos controles de toxicidade dos soros na microplaca, para prova de virusneutralização

Posteriormente, as placas foram cobertas com tampas de vidro ou de plástico e incubadas a 37°C em estufa com atmosfera úmida, contendo 5% de CO₂, durante 48 horas. Em cada prova incluíram-se soros de referência positivo e negativo era o vírus da prova e um controle das doses do vírus.

3.4.6. Leitura e interpretação da prova

A leitura das microplacas, realizou-se após 48 horas de incubação. O conteúdo delas foi despejado em um recipiente contendo uma solução aquosa de ácido acético à 0,5% e ácido cítrico à 1%. Logo a seguir, as placas foram submersas, por 20 minutos em solução aquosa contendo 5% de formol e 0,1% de cristal violeta. Após esta fase, foram enxaguadas em água corrente e a leitura realizada visualmente.

As cavidades com monocamadas de células com ausência de efeito citopático foram consideradas intactas. A prova foi julgada válida quando os controles de células, toxicidade dos soros, vírus, soros positivo e negativo mostravam reações normais.

O título neutralizante foi calculado a partir das cavidades com células protegidas, segundo o método de Spearman e Karber. Títulos superiores a 1,3 foram considerados positivos, conforme ALONSO (1986).

3.5. Prova de ELISA Sandwich Indireta (ELISA-SI)

Os reagentes utilizados na prova de ELISA de competição em fase líquida, foram previamente titulados, para conhecer seus títulos ótimos de uso, utilizando a prova de ELISA-SI (VOLLER et al., 1976). Esta consiste basicamente de: 1. anti-soro de captura (soro hiperimune de coelho); 2. antígeno (glicoproteína); 3. anticorpo detector (soro hiperimune de cobaia ou camundongo); 4. conjugado (Ig G de cabra anti Ig G de cobaia e Ig G de cabra anti-Ig G de camundongo, acopladas à enzima peroxidase), e 5. substrato (OPD) (figura 4).

3.5.1. Titulação do anti-soro de captura e do antígeno (Titulação em bloco)

3.5.1.1. Adsorção do anti-soro de captura o soro hiperimune de coelho relacionado em 3.2.1 foi utilizado como anti-soro de captura. Sua titulação foi feita adsorvendo o anti-soro diluído em tampão carbonato-bicarbonato (3.3.5) em microplacas com 96 cavidades (DYNATECH IMMULON, Dynatech Laboratories, Inc. Alexandrino, VA, USA).

Realizou-se 12 diluições, base 2, a partir de 1:100 (Fig. 5), e colocou-se um volume de 100ml/cavidade, utilizando 8 cavidades para cada diluição. O processo de adsorção foi incubado por 18 horas a 4°C.

Posteriormente, retirou-se o conteúdo, invertendo-se a placa e lavouse duas vezes com solução salina fisiológica secando-a com compressão leve sobre papel absorvente.

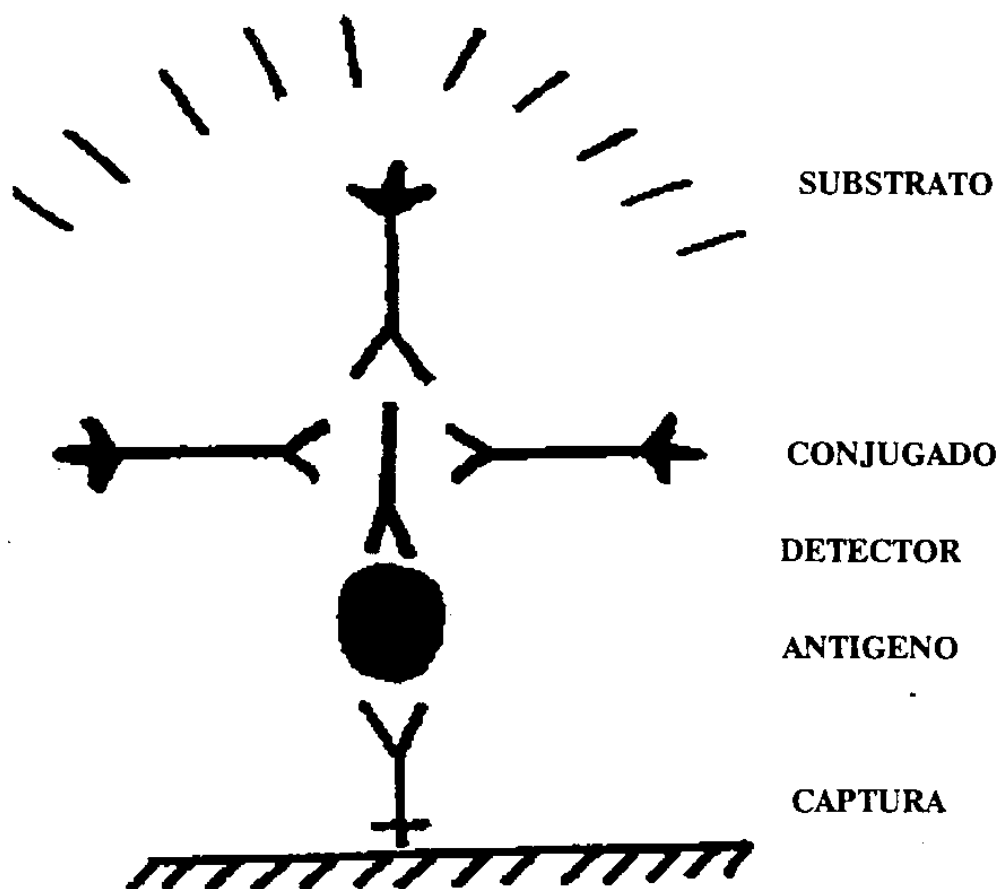


Fig. 4 - Esquema da prova ELISA sandwich indireta

→ diluições anti-soro captura

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1:100	1:	1:	1:	1:	1:	1:	1:	1:	1:	1:	1:
	1:50	200	400	800	1600	3200	6400	12800	25600	51200	102400	204800
B	1:100											
C	1:200											
D	1:400											
E	1:800											
F	1:1600											
G	1:3200											
H	1:6400											

↓
Ag

Figura 5: Titulação em bloco do anti-soro de captura e do antígeno por ELISA SI.

Imediatamente após essas operações, as cavidades da placa foram preenchidas com 100 μ l de ovoalbumina à 1% em PBS, utilizado como estabilizador dos anticorpos e bloqueador de espaços livres. Após 1 hora a 25°C, as lavagens referidas na etapa anterior foram repetidas.

Imediatamente após essas operações, as cavidades da placa foram preenchidas com $100\mu\text{l}$ de ovo albumina à 1% em PBS, utilizado como estabilizador dos anticorpos e bloqueador de espaços livres. Após 1 hora a 25°C , as lavagens referidas na etapa anterior foram repetidas.

3.5.1.2. Antígeno - O anti-soro de captura foi contraposto (titulação em bloco) às diluições do antígeno glicoproteína, preparados no tampão descrito em 3.3.2 e distribuídos como esquematizado na figura 5.0 volume adicionado foi de $50\mu\text{l}$ /cavidade.

A reação foi incubada a 37°C , durante 1 hora, em agitação circular lenta (DSG-TITERTEK/4, Flow Laboratories). O reagente em excesso foi eliminado por 3 lavagens sucessivas com a solução descrita no item 3.3.4. Nas seguintes etapas da prova, após as incubações, os excessos de reagentes, sempre foram eliminados da forma descrita nesta etapa.

O tampão utilizado para diluir o antígeno glicoproteína, foi o mesmo utilizado nas diluições do anti-soro detector e do conjugado.

3.5.1.3. Anti-soro detector - O anti-soro detector, cuja finalidade é revelar o antígeno captado na reação, foi o coror

hiperimune de cobaia relacionado em 3.2.2. Após diluído, ele foi incubado durante 30 minutos a 37°C antes do uso. Este detector foi adicionado a todas as cavidades da placa em volume de 50 μ l, e incubado a 37°C em agitação lenta, eliminando-se posteriormente o reagente em excesso. Imediatamente, adicionou-se o conjugado.

3.5.1.4. Conjugado - O conjugado (Ig G de cabra anti Ig G de cobaia (SIGMA) acoplado à enzima peroxidase) foi diluído na sua dose de reatividade ótima, e incubado a 37°C durante 30 minutos prévio a ser colocado na placa. Posteriormente, adicionou-se às 96 cavidades da placa em volume de 50 μ l e a reação I incubada durante 30 minutos a 37°C em agitação lenta, após o que eliminou-se o reagente em excesso.

3.5.1.5. substrato - A ortofenilendiamina (OPD), que se constituiu no cromógeno da reação, foi diluída em tampão ácido como descrito em 3.3.6 e 3.3.7, e adicionada em volume de 50 μ l às 96 cavidades da placa. A prova foi incubada a 25°C durante 15 minutos, protegida da luz. Decorrido esse prazo, a reação foi detida pela adição de 50 μ l de ácido sulfúrico 3N, em todas as cavidades da placa.

3.5.1.6. Leitura - A leitura da prova, por densidade óptica, foi feita em um espectrofotômetro para ELISA (TITERTEK Multiskan MKII, Flow Laboratories) com filtro de 492nm.

Escolhemos como diluições de reatividade ótimas aquelas diluições do anti-soro de captura e, do antígeno glicoproteína que forneceram valores de absorvância próximos a 2.0 (leitura máxima do aparelho).

3.5.2. Titulação dos anti-soros detectores

Uma vez escolhidas as diluições de reatividade ótima do anti-soro de captura e do antígeno, como descrito em 3.5.1, procedemos à titulação dos soros detectores.

A técnica utilizada foi também SI, desta vez o anti-soro de captura adsorveu-se em duas placas, na diluição escolhida em 3.5.1. o tampão utilizado, assim como o bloqueio com ovo albumina foram iguais aos descritos em 3.5.1.

O antígeno glicoproteína, na diluição de reatividade ótima, foi adicionado em toda a placa, em volume de $50\mu\text{l}/\text{cavidade}$. Posteriormente, incubou-se, lavou-se e secou-se como descrito em 3.5.1.

Em continuação, os anti-soros detectores (cobaia e camundongo), foram diluídos, um em cada placa, a partir de 1:100 em base 2, até 1:204.800. Cada diluição do anti-soro detector foi adicionado a uma coluna da placa (8 cavidades) em volume de $50\mu\text{l}/\text{cavidade}$. O período de incubação foi de 30 minutos a 37°C em agitação lenta, após o que continuamos as etapas restantes da prova

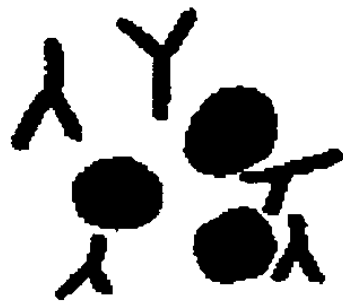
como descrito em 3.5.1, utilizando-se o conjugado anti-camundongo com o detector de camundongo, e conjugado anti-cobaia com o detector de cobaia.

A leitura da prova foi feita da mesma forma que em 3.5.1, escolhendo como ótimas, aquelas diluições dos anti-soros detectores que forneceram valores de absorvância próximos a 2.0.

3.6. Prova de ELISA sandwich indireta de competição em fase líquida

A técnica Sandwich indireta de ELISA de competição em fase líquida, esquematizada na Figura 6, foi utilizada por ALLENDE et al. (1991) para identificação de anticorpos anti VEV sorotipos New Jersey e Indiana 1.

FASE LIQUIDA



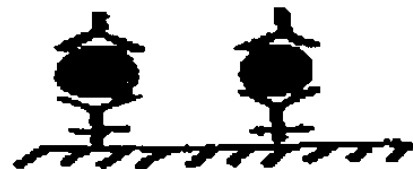
SORO NEGATIVO



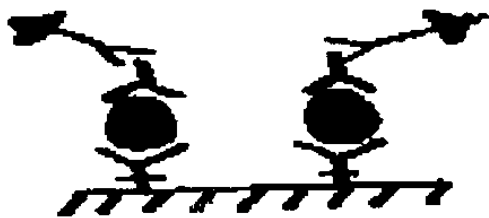
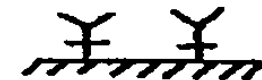
SORO POSITIVO



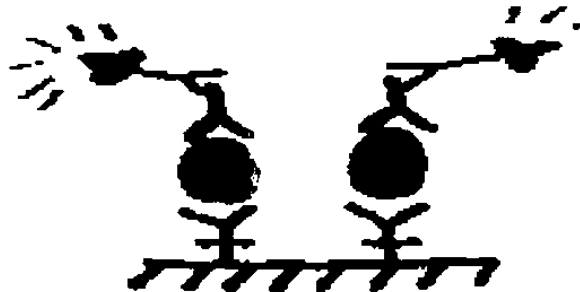
ANTIGENO CAPTURA



DETECTOR ANTIGENO CAPTURA



CONJUGADO DETECTOR ANTIGENO CAPTURA



SUBSTRATO CONJUGADO DETECTOR ANTIGENO CAPTURA



Fig. 6 - Esquema da prova ELISA competição em fase líquida

Na presente pesquisa, aplica-se essa técnica para identificar anticorpos anti VEV-Indiana 3. Foram estudados na ELISA todos os soros, das regiões livres e de atividade do VEV-Indiana 3, relacionados em 3.2.4.

3.6.1. Anti-soro de captura

Os suportes (microplacas de 96 camadas DYNATECH IMMULON) foram adsorvidos, como descrito em 3.5.1, com o anti-soro de captura na sua diluição de reatividade ótima, e posteriormente bloqueou-se os espaços livres com ovoalbumina 1% em PBS.

As placas com o anti-soro de captura adsorvido (fases sólidas) foram preparadas em grande quantidade e mantidas, cobertas com fita adesiva, a -20°C. Diariamente foram retiradas as placas necessárias e levadas gradativamente à temperatura de 37°C, mantendo-as por 20 minutos, a 4°C, 20 minutos, a 25°C e 20 minutos, a 37°C.

3.6.2. Fase líquida

A fase líquida consistiu-se de diluições do soro problema confrontados ao antígeno glicoproteína, em diluição pré-determinada, preparados numa microplaca auxiliar.

O tampão utilizado para as diluições dos soros, do antígeno, do detector e do conjugado foi o descrito no item 3.3.2.

Cada diluição de soro foi feita em duplicata (ocupando duas colunas), começando por soro puro, em base 5, até 1:3125. Obtivemos, desta maneira, seis diluições por cada soro e utilizou-se duas cavidades por cada diluição. Assim, foi possível estudar em cada placa 5 soros (Fig. 7)

Soros: Nº 1 Nº 2 Nº 3 Nº 4 Nº 5 Pos. Neg.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1:2	1:2	1:2	1:2	1:2	1:2	1:2	1:2	1:2	1:2	1:20	1:2
B	1:10										1:100	1:10
C	1:50										1:500	1:50
D	1:250										1:2500	1:250
E	1:1250										1:12500	1:1250
F	1:6250										1:62500	1:6250
G		-	CON	TRO	LE	DE		ANTI	GENO	-		
H					-	BRAN	CO	-				

Figura 7: Distribuição dos soros, em diluição final, e dos controles, na placa de ELISA SI competição fase líquida.

Separadamente, preparou-se a diluição do antígeno gliocoproteína, e adicionou-se, volume a volume a cada diluição do soro, obtendo-se as diluições finais dos soros mostradas na figura 7.

Incluiu-se em cada placa os seguintes controles: diluições dos soros padrões positivo e negativo, controle de antígeno e um branco.

A reação é incubada 1 hora a 37°C.

3.6.3. Transferência

Da fase líquida, 50 μ l foram transferidos para a fase sólida, sendo o sistema incubado a 37°C por 30 minutos em agitação lenta. Os reagentes em excesso de todas as etapas foram eliminados por três lavagens sucessivas com a solução descrita em 3.3.4.

3.6.4. Anti-soro detector

Os soros hiperimunes de cobaia ou de camundongo, usados como detectores, foram diluídos na dose de reatividade ótima respectivamente, e incubados a 37°C durante 30 minutos antes de serem adicionados à placa.

Quando se pesquisaram anticorpos em soros de suínos e cobaias, utilizou-se o detector de camundongo. Nas outras espécies empregou-se o anti-soro detector de cobaia.

Todas as cavidades da placa foram preenchidas com 50 µl do anti-soro detector, e após um período de incubação de 30 minutos a 37°C em agitação lenta, eliminou-se o reagente em excesso.

3.6.5. Conjugado

As diluições dos conjugados correspondentes a cada detector foram incubadas a 37°C durante 30 minutos antes de serem usadas na prova.

O conjugado foi adicionado em volume de 50 µl em todas as cavidades da placa. Concluída a incubação de 30 minutos a 37°C em agitação lenta, eliminou-se o excesso de reagente e adicionou-se o substrato.

3.6.6. Substrato

A OPD, diluída em tampão, ácido (item 3.3.6 e 3.3.7), adicionou-se em volume de 50 µl as 96 cavidades das placas. A reação foi incubada a 25°C durante 15 minutos, protegida da luz. Decorrido esse prazo a reação foi detida pela adição de 50% de ácido sulfúrico 3N.

3.6.7. Leitura e interpretação da prova

A leitura da prova se fez num espectrofotômetro para ELISA (Titertek Multiskan MII) com filtro 492nm. Considerou-se como valor 100% de densidade optica a média das leituras obtidas nas 12 cavidades correspondentes ao controle de antígeno (linha G, figura 7)

A partir desse valor, calcularam-se os títulos dos soros, que correspondem a recíproca da diluição, expressa em log 10, que forneceu um 50% do valor obtido no controle do antígeno.

3.7. Análise estatística

A partir dos dados obtidos nas diferentes etapas do trabalho foram calculadas a sensibilidade (S), especificidade (E) das provas, VN e ELISA, bem como os respectivos valores preditivos dos resultados positivos (VPR+) e negativos (VPR-). Complementarmente, determinou-se o valor Global das provas. A estes

valores foi aplicado o teste de duas proporções, com aproximação normal, para verificar a existência ou não de diferenças significantes entre eles. Adotou-se, como nível de rejeição, alfa igual a 0,05 e o valor crítico de "Z" de alfa igual a 1.96 (BERQUO et al, 1980).

Para o cálculo da concordância entre ambas as provas foi utilizado o Coeficiente de Correlação Intragrupal "Kappa" de acordo com JENICEK & CLEROUX (1983).

Utilizou-se, também, o Coeficiente de Associação de Yule para determinar o grau de associação entre os resultados obtidos pelas provas de VN e ELISA. O nível de significância da associação foi calculada através do χ^2 (Qui-quadrado), estabelecendo-se como hipótese de trabalho a existência de concordância entre os métodos. O nível de rejeição da hipótese de nulidade foi estabelecido em 5%, correspondendo o χ^2 alfa a 3,84, para 1 grau de liberdade (BERQUO et al, 1980).

A repetibilidade da prova de ELISA foi avaliada por um desenho estatístico de blocos casualizados, onde três soros foram estudados quatro vezes cada um, em dias diferentes, por cinco operadores. O nível de significância das repetições foi calculado através do teste F estabelecendo-se como hipótese de trabalho que não há diferença entre as repetições de um mesmo soro. O nível de rejeição da hipótese de nulidade foi estabelecido em 5%

correspondendo o F , a 3,06 para 4 e 15 graus de liberdade (MARKUS, 1973).

4 . RESULTADOS

Os resultados obtidos da presente pesquisa são apresentados a seguir, e correspondem aos dados obtidos nas provas de ELISA e virusneutralização (VN) e a análise dos mesmos.

4.1. Titulação do anti-soro de captura, antígeno e anti-soro detector por ELISA

As titulações em bloco do anti-soro de captura e o antígeno glicoproteína, forneceram como diluição ótima de uso para a captura: 1/16000 e para o antígeno: 1/300.

O anti-soro detector de cobaia teve sua reatividade ótima na diluição 1/10000 e o de camundongo na diluição 1/1000.

Tendo tais resultados prepararam-se as placas sensibilizadas com a captura na sua diluição ótima de uso, e

utilizou-se o antígeno e os detectores nas diluições correspondentes, para a realização de todo o experimento.

4.2. Titulação dos soros padrão

As figuras 8, 9, 10 e 11 e a tabela 2, mostram os resultados das titulações dos soros padrões, relacionados em 3.2.3, frente ao antígeno VEV-Indiana-3 Br/86, pelas provas de VN e ELISA.

Tabela 2: Títulos 50%, expressado em log 10, dos soros padrões estudados para o antígeno VEV-Indiana 3 Br/86.

SORO	Elisa	VN
Soro fetal bovino	<0.3	<0.6
Soro positivo VEV-NJ	<0.3	1.5
Soro positivo VEV-Ind1	0.64	2.25
Soro positivo VEV-Ind3	2.53	4.35

4.3. Titulação dos soros para pesquisa de anti-corpos

Os resultados das titulações expressados em log 10, dos soros relacionados em 3.2.4, pelas provas de VN e ELISA,

e a sua representação gráfica nas figuras 12 e 13, respectivamente.

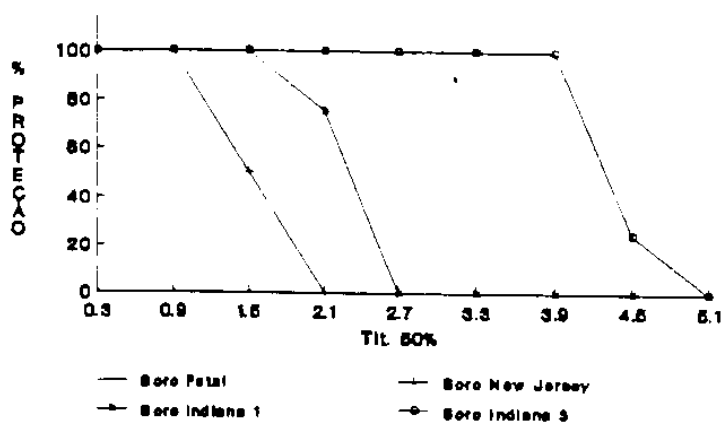


Figura 8. Representação gráfica dos títulos neutralizantes dos soros padrões frente ao antígeno VEV-Indiana 3 Br/86.

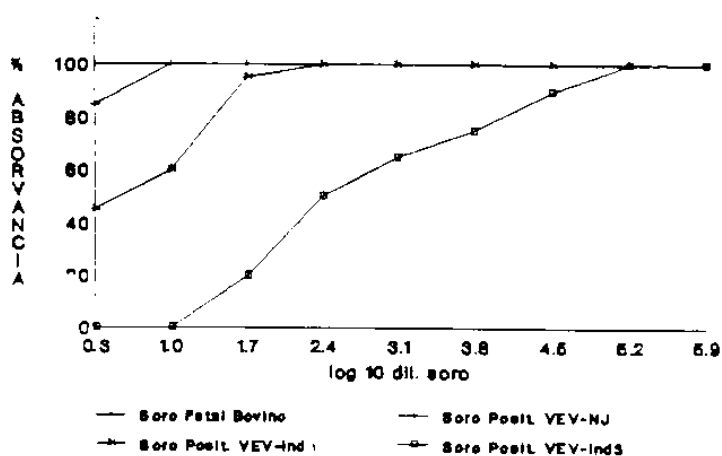


Figura 9. Representação gráfica dos títulos de ELISA dos soros padrões frente ao antígeno glicoproteína VEV-Indiana 3 Br/86.

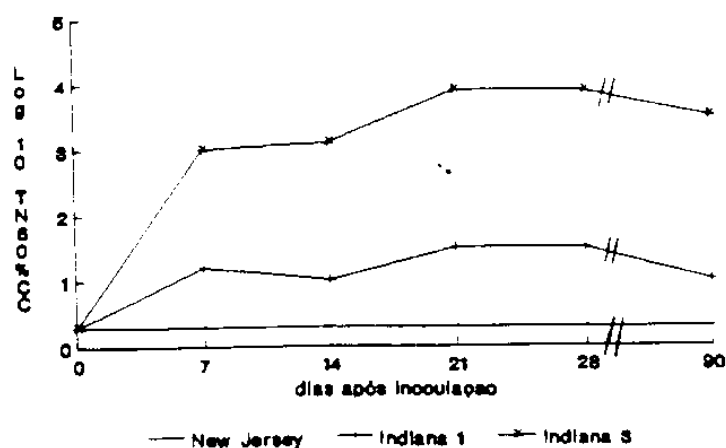


Figura 10. Representação gráfica dos títulos neutralizantes dos soros padrões de cobaias, inoculadas com VEV-Indiana 3 Br/86, estudados frente aos antígenos VEV-New Jersey; VEV-Indiana 1 e VEV-Indiana 3.

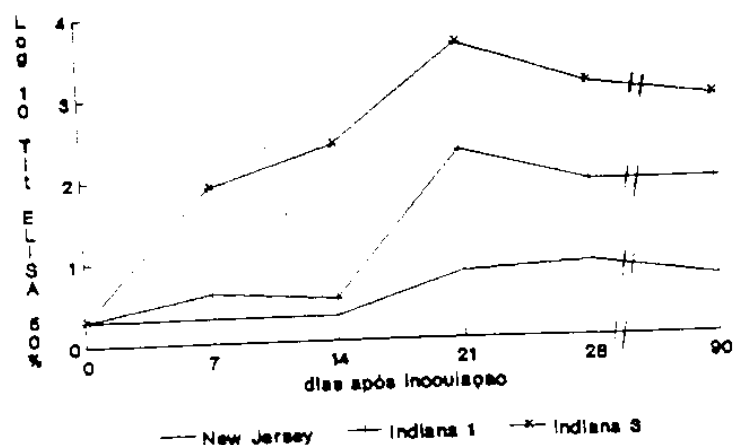


Figura 11. Representação gráfica dos títulos ELISA dos soros padrões de cobaias, inoculadas com VEV-Indiana 3 Br/86, estudadas frente as glicoproteínas VEV-New Jersey; VEV-Indiana 1 e VEV-Indiana 3.

Tabela 3: Distribuição dos soros, provenientes de regiões livre e endêmicas do VEV, segundo os títulos (log 10) pelas provas de ELISA e VN

Tit. log 10	Nº de soros			
	região	livre	região	endêmica
	ELISA	VN	ELISA	VN
0.0 - 0.3	357	163	2	0
0.3 - 0.6	111	115	1	1
0.6 - 0.9	65	160	0	2
0.9 - 1.2	0	52	0	0
1.2 - 1.5	0	29	2	0
1.5 - 1.8	0	14	9	0
1.8 - 2.1	0	0	16	0
2.1 - 2.4	0	0	22	2
2.4 - 2.7	0	0	30	2
2.7 - 3.0	0	0	59	8
3.0 - 3.3	0	0	71	3
3.3 - 3.6	0	0	48	11
3.6 - 3.9	0	0	17	2
3.9 - 4.2	0	0	28	274
Totais	533	533	305	305

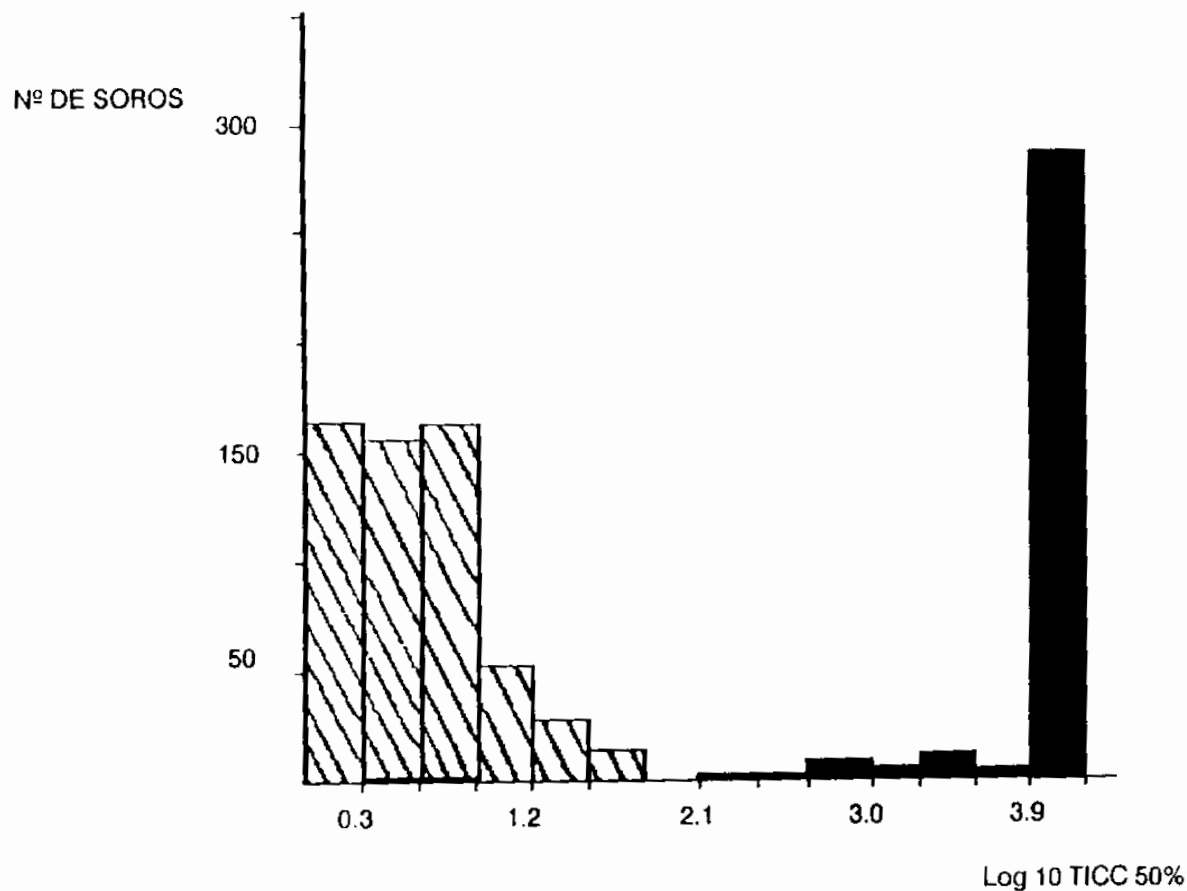


Fig. 12 - Representação gráfica dos resultados das titulações por vírus-neutralização dos soros de regiões livres (\\) e de atividade viral (■)

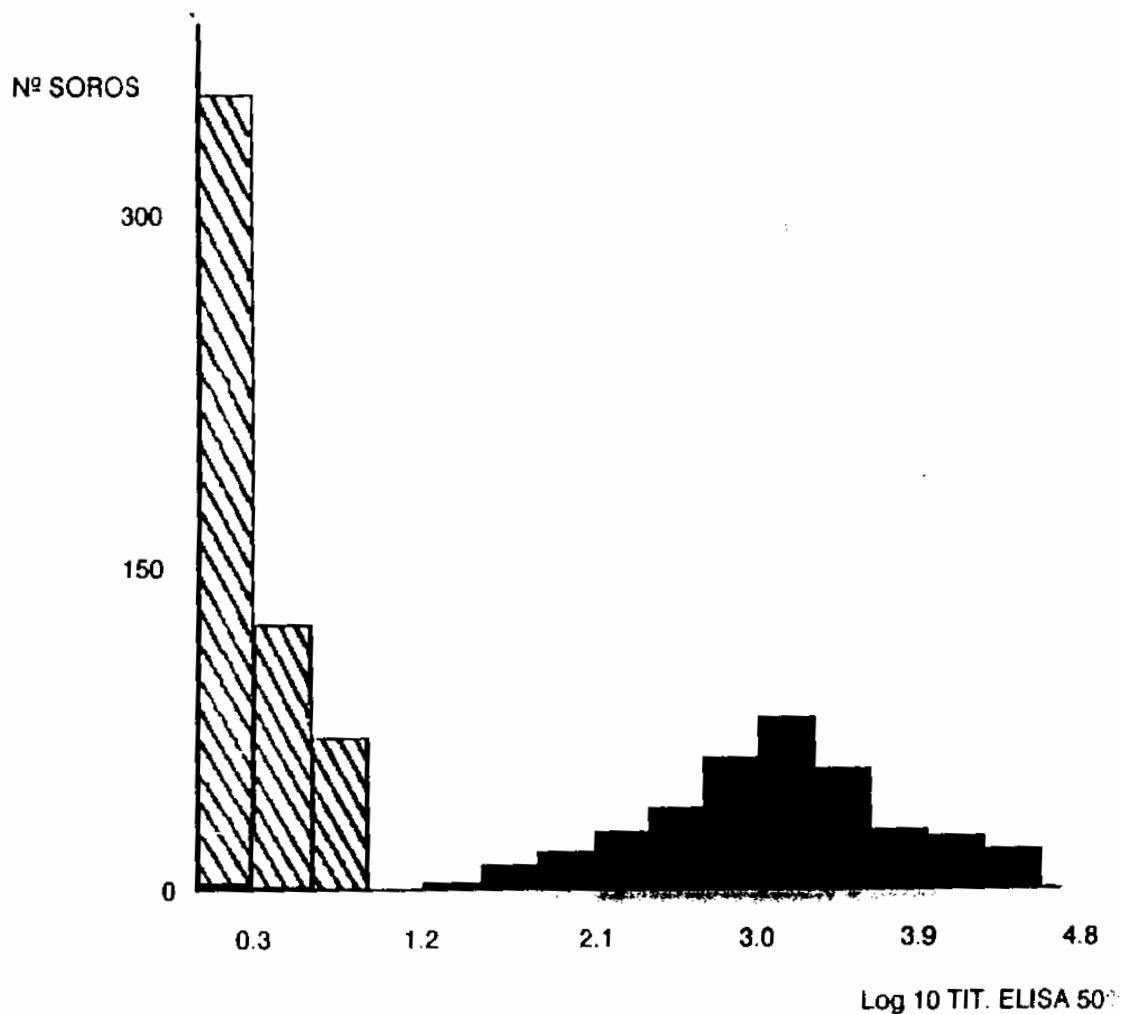


Fig. 13. Representação gráfica dos resultados das titulações por ELISA dos soros das regiões livres (\\) e de atividade viral VEV-Ind.3 (■).

4.4. Validade da prova de ELISA

4.4.1. Sensibilidade e especificidades

Pressupondo, com base nos dados epidemiológicos, que todos os soros proveniente de regiões livres de EV, são verdadeiros negativos, e que os soros provenientes de regiões com atividade viral do VEV-Indiana são verdadeiros positivos, realizou-se o estudo da especificidade e sensibilidade da prova de ELISA.

Admitiu-se que o nível de anticorpos contra EV deve ser menor no grupo de soros de regiões livres da doença do que no grupo de soros de regiões de atividade viral. Para classificar-se indivíduos, observa-se se eles situam-se acima ou abaixo de um ponto crítico da escala quantitativa do nível de anticorpos, elegendo-se um valor discriminante, de tal forma que seja minimizada a quantidade total de erros de classificação: falso positivo para animais provenientes de áreas livres da infecção e falso negativo para os infectados não detectados pelas provas sorológicas.

Escolheu-se como valor limite positivo-negativo, baseando-se na observação dos resultados da figura 13, o valor $1.0 \log 10$, e construiu-se a tabela 4, obtendo-se os valores de especificidade de 100% e sensibilidade de 99%. Na prova de VN, utilizando-se o valor limite $1.3 \log 10$ (ALONSO, 1986), obteve-

se os valores de 95% e 98% para especificidade e sensibilidade, respectivamente, (tabela 5).

A tabela 6 contém os valores obtidos para a determinação da validade das provas de ELISA e

Tabela 4: Soros de regiões livres e endêmicas para VEV, classificados pela prova de ELISA segundo o valor discriminante.

Caract.	Valor	log 10	Total
Região	>1.0	<1.0	
Endemica	302	3	305
Livre	0	533	533
Total	302	536	838

Tabela 5: Soros de regiões livres e endêmicas para VEV classificados pela prova de VN segundo o valor discriminante.

Caract.	Valor	log 10	Total
Região	>1.3	<1.3	
Endêmica	300	5	305
Livre	28	505	533
Total	328	510	838

4.4.2. Valores preditivos dos resultados

Os valores preditivos dos resultados positivos (VPR+) e negativo (VPR-), assim como o valor global (VG) que nos indica a eficiência da prova, encontram-se, para ambas as provas, na tabela 6.

Tabela 6: Valores obtidos para a determinação da validade dos métodos diagnósticos, ELISA e VN.

Prova	S*	E*	VPR+*	VPR-*	VG*
ELISA	99,0	100,0	100,0	99,4	99,6
VN	98,0	95,0	91,5	99,0	96,1

* - Percentagem

O VPR+ da prova de ELISA foi significativamente maior do que o da VN ($Z = 5,14$), enquanto que os VPR- de ambas as provas se equivaleram entre eles ($Z = 0,72$)

O valor global do teste, quando da utilização da prova de ELISA, foi superior ao da prova de VN, sendo suas diferenças estatisticamente significantes ($Z = 3,86$).

4.5. Repetibilidade

Na tabela 7 são apresentados os valores obtidos nas diferentes repetições, das titulações dos soros por ELISA, constando na tabela 8 os respectivos resultados da análise de variância. A hipótese de nulidade, foi aceita em todos os casos ($F_c < F_t$) ao nível de rejeição de $\alpha = 0,05$.

Tabela 7: Valores expressos em log 10, obtidos nas repetições das titulações de 3 soros, por ELISA

		Tratamentos				
		A	B	C	D	E
		3.63	3.26	3.26	3.55	3.38
Soro nº 1	OBS.	3.57	3.26	3.26	3.58	3.43
		3.20	3.40	3.40	3.52	3.52
		3.34	3.40	3.40	3.52	3.52
		13.74	13.35	13.34	14.06	13.76
	Totais					
Soro nº 2	OBS.	2.60	2.09	2.19	2.32	2.15
		2.56	2.05	2.20	2.32	2.20
		2.40	2.38	2.33	2.15	2.36
		2.31	2.37	2.25	2.37	2.30
	Totais	9.87	8.89	8.97	9.16	9.01
Soro nº 3	OBS.	2.92	2.60	2.56	2.90	2.73
		2.83	2.55	2.60	2.91	2.71
		2.66	2.80	2.78	2.71	2.75
		2.74	2.76	2.74	2.57	2.74
	Totais	11.15	10.71	10.68	11.09	10.93

Tabela 8: Análise de variância das titulações por ELISA de 3 soros repetidos vinte vezes cada um

Causas da Variação		GL	SQ	QM	F_c	F_c^*
Soro nº 1	Tratamento	4	0,091	0,023	1,77	< 3,06
	Erro Exp.	15	0,197	0,013		
	Total	19	0,288			
Soro nº 2	Tratamento	4	0,159	0,040	2,85	< 3,06
	Erro Exp.	15	0,216	0,014		
	Total	19	0,375			
Soro nº 3	Tratamento	4	0,045	0,011	0,846	< 3,06
	Erro Exp.	15	0,197	0,013		
	Total	19	0,242			

*alfa = 5%

4.6. Associação ELISA-VN

A aplicação do teste de associação, mediante o cálculo do Coeficiente de Yule, revelou elevado grau de associação positiva (99,9%) entre as provas. O cálculo do X^2 , comprovou a existência de uma associação significativa entre ambas as provas ($X^2 = 714,3$) corroborando a concordância dos dois métodos.

4.7. Concordância ELISA-VN

A concordância entre os resultados obtidos pelas provas de ELISA e VN., quando estudados os soros de regiões livres e de atividade viral, foi estudada a partir da tabela 9, pelo cálculo do coeficiente de correlação intragrupal Kapa (K) (JENICEK e CLEROUX, 1983).

O coeficiente K entre ambas as provas foi de 0,92, indicando elevada concordância entre os resultados obtidos por ambas as provas.

Tabela 9- Distribuição dos soros classificados segundo o valor discriminante pelas provas de ELISA e VN

VN			Total
	>1.3	<1.3	
ELISA			
>1.0	300	2	302
<1.0	28	508	536
Total	328	510	838

5. DISCUSSÃO

Na presente pesquisa, estudou-se a validade e repetibilidade da prova ELISA competição em fase líquida, para a identificação de anticorpos anti VEV-Indiana 3; utilizando-se como antígeno a glicoproteína viral. Posteriormente, foi analisada a concordância entre os resultados das titulações dos soros, obtidos pela prova de ELISA com aqueles da VN.

A discussão que se segue, foi distribuída em tópicos específicos para um melhor entendimento do assunto em questão.

5.1. Padronização dos Reativos da Prova ELISA

Na América do Sul, mais de 80% da população bovina é vacinada anualmente, com vacinas antiaftosa. Estas vacinas são produzidas com antígenos replicados em células BHK-21 (ALONSO, 1989). Em consequência, esses bovinos produzem também, anticorpos contra os antígenos das células BHK-21 (ANDERSON, 1984). Os suínos e ovinos vacinados com essas vacinas, mostram

anticorpos que reagem com antígenos das células BHK-21 e também com as proteínas do soro bovino. (ALONSO, informação verbal).

A prova de ELISA, por ser altamente sensível, capta facilmente este tipo de anticorpos que são em parte, responsáveis pelas reações inespecíficas da prova.

Para reduzir as reações anti BHK-21 e anti-proteínas do soro bovino, na presente pesquisa, foi utilizado, como captura, um soro hiperimune de coelho produzido com o VEV-Indiana 3 Br/86 replicado em célula IB-RS-2. O soro detector de cabaia, por sua vez, foi preparado com a mesma cepa viral previamente adaptada a essa espécie.

O tipo de antígeno utilizado na prova, e seu grau de purificação, também pode ser causa de reações não desejadas. Nesta pesquisa, trabalhamos com a glicoproteína viral, evitando assim as proteínas M, N, NS e L, que foram provavelmente a causa das reações inespecíficas relatadas por WORKMAN et al. (1986).

Um outro aspecto importante foi a adsorção de todos os reagentes da ELISA, prévio a serem usados na prova. Como descrito por ALLENDE et al. (1991), foi acrescentado ao tampão de diluição, 2% de soro normal de coelho e 2% de soro normal de cada uma das espécies em estudo. Além disto, cada reagente

previamente diluído, foi incubado a 37°C por um período aproximado de 30 minutos, antes do uso, de maneira a evitar gradientes de temperatura na placa. Desta maneira, conseguimos eliminar as reações não específicas da prova de ELISA, obtendo um mínimo (não apreciável visualmente) de cor de fundo, nas placas; concordando com os resultados obtidos para os sorotipos New Jersey e Indiana-1 por ALLENDE et al. (1991).

5.2. Estudos dos soros padrões

O comportamento dos soros padrões (figuras 8 e 9) mostra que a prova ELISA é específica na identificação de anticorpos para o antígeno homólogo, apreciando-se reações cruzadas mínimas (inferiores ao valor discriminante) entre os sorotipos New Jersey e Indiana. Isto concorda com os estudos de LEFRANCOIS e LYLES (1982 II) que descreveram, mediante o uso de anticorpos monoclonais, a presença de determinantes comuns a ambos sorotipos na glicoproteína do VEV. WORKMAN et al. (1986) obtiveram fortes reações cruzadas entre os sorotipos New Jersey e Indiana ao tentar identificar anticorpos para o sorotipo New Jersey, possivelmente devido a alterações na estrutura do vírus ao ser imobilizado em soluções fortemente básicas.

Quando estudada a reação do soro padrão Indiana-1 frente ao antígeno Indiana3, observou-se que nas diluições

menores do soro, obtínhamos valores de absorvância baixas em comparação com as do soro padrão New Jersey.

Este resultado pode ser explicado pelos trabalhos de FEDERER et al. (1967); CARTWRIGHT et al., (1972); NOZAWA (1976) e ALONSO e SONDAHL (1985) que acharam estreita relação sorológica entre os subtipos do sorotipo Indiana. É possível que na estrutura das glicoproteínas, do sorotipo Indiana, existam vários determinantes comuns, o que deveria ser objeto de uma pesquisa com anticorpos monoclonais, similar à realizada para comparar os sorotipos New Jersey e Indiana-1 por LEFRANCOIS e LYLES (1982).

Por sua vez, os soros padrões de cobaias inoculadas com VEV-Indiana 3 Br/86 foram estudados previamente à inoculação e aos 3, 5, 7, 14, 21, 28 e 90 dias após a inoculação (dpi). A presença de anticorpos foi pesquisada por VN e ELISA (figuras 10 e 11). No 3º dpi, ambas técnicas acusaram um aumento do título frente ao antígeno homólogo quando comparado com o título prévio à inoculação, obtendo-se os títulos máximos para ambas as provas no 21 dpi.

A reação destes soros padrões com os antígenos heterólogos foi nula na VN para o VEV New Jersey. Para o VEV Indiana-1 obteve-se um título neutralizante máximo de 1.5 aos 21 dpi. Entretanto, na prova ELISA esses soros alcançaram um

título máximo de 0,99 no 28 dpi para o VEV New Jersey e de 2.2 no 21 dpi para o VEV Indiana-1. As reações observadas com os antígenos heterólogos podem ser explicados pela presença de determinantes comuns a ambos sorotipos (New Jersey e Indiana) nas glicoproteínas, tal como foi documentado por EFRANCOIS e LYLES (1982). O subtipo em estudo é o Indiana-3, pertencente ao mesmo sorotipo que o Indiana-1, tendo ambos vários determinantes antigênicos comuns, o que explica os títulos obtidos com o soro padrão Indiana-1.

Esses resultados mostram que as duas provas são capazes de detectar, ao mesmo tempo, a presença de anticorpos, em animais experimentalmente infectados, sendo que a faixa de títulos difere entre as duas provas, obtendo-se títulos superiores com a VN do que na ELISA. Isto último pode ser devido a que as concentrações de antígeno a ser neutralizado na prova de VN são inferiores a aquelas da prova de ELISA.

5.3. Estudo dos soros para execução das provas sorológicas

Um total de 838 amostras de soros de animais foram estudadas pelas provas de VN e ELISA para quantificar os anticorpos anti EV.

Dada a impossibilidade de inocular animais suscetíveis com o vírus da EV, por razões de segurança

biológica, adotou-se o seguinte critério para classificar os soros em positivos e negativos: 305 amostras de soros, colhidas de animais oriundos de áreas endêmicas, com atividade do VEV Indiana-3, havendo dentre eles amostras provenientes de animais a partir dos quais havia sido isolado o vírus; foram considerados o grupo de soros positivos. O grupo negativo foi formado por 533 amostras de soros de animais oriundos de regiões livres de EV, selecionando estas regiões livres com base nos dados publicados pela OIE (1990) e PANAFTOSA (1990).

Para evitar tendências de resultados, nos grupos de soros, produzidas pela espécie animal, tipo de alimentação, manejo sanitário e/ou presença de outras doenças, eles foram constituídos por soros de animais de diferentes espécies (equinos, bovinos, suínos) e de diferentes regiões: Argentina, Chile, Itália, Uruguai (negativos) e no Brasil, diferentes Estados: Alagoas, Minas Gerais, Pará, Piauí, Rio de Janeiro, Sergipe (positivos).

Na execução das provas sorológicas foi utilizada o soro de uma única colheita de sangue por animal.

A distribuição dos resultados das titulações dos soros por ambas as técnicas, representadas nas figuras 12 e 13, mostram que tanto a VN como a ELISA, separam perfeitamente o grupo de soros negativos do grupo de soros positivos. Não

observou-se área de superposição de resultados. Isto pode ser devido a que nossos soros positivos foram provenientes de animais com sintomatologia clínica ou já recuperado da doença, apresentando então um título elevado de anticorpos. Por razões de segurança biológica, no Brasil, estávamos impossibilitados de realizar a inoculação experimental de animais domésticos com o VEV. Conseqüentemente, neste estudo não pudemos contar com soros dos primeiros estágios da infecção, que seguramente apresentariam títulos baixos de anticorpos, fazendo com que as duas curvas (figuras 12 e 13) se aproximassem.

Na observação dos resultados obtidos na execução da prova de ELISA, escolhemos como valor discriminante positivo/negativo $1,0 \log 10$. Com as limitações do nosso experimento (não contar com soros dos primeiros estágios da infecção), poderíamos cometer o erro, ao utilizar o valor $1,0 \log 10$ como valor discriminante, de classificar um soro fraco positivo como negativo. Este ponto seria superado pela prática dos laboratórios de diagnóstico, que aconselha que todo diagnóstico realizado a partir de anticorpos é feito pela análise de, no mínimo, duas amostras colhidas com um intervalo de 2-3 semanas. Neste período, se o animal é um fraco positivo por estar nas etapas iniciais da infecção, encontraremos na 2ª amostra altos títulos que seriam detectados sem dúvidas pela prova de ELISA.

Esse valor discriminante escolhido poderá, num futuro, ser confirmado ou modificado, caso seja superadas as limitações deste experimento. Entretanto, consideramos que para o objetivo deste trabalho, o valor determinado é satisfatório.

Voltando à observação das figuras 12 e 13, encontramos um pequeno número de soros (3) pertencentes a animais, oriundos de regiões endêmicas, do VEV Indiana-3, os quais apresentaram valores de anticorpos que caíam dentro do grupo de soros negativos. Isto pode ser explicado de duas maneiras: 1) É conhecido o fato de que num surto de doença nem todos os animais do rebanho são infectados, podendo-se encontrar sadios, sem presença de anticorpos; ou 2) alguns animais, mesmo estando infectados, não desenvolvem anticorpos, por características próprias do indivíduo. Devido a isto, consideramos normais, dentro do esperado em reflexo ao que acontece na natureza, os resultados obtidos por ambas as provas.

5.4. Validade da prova de ELISA

A sensibilidade e especificidade da prova, observados nesta pesquisa, concordam com os dados obtidos por ALLENDE et al., (1991) para anticorpos dos sorotipos New Jersey e Indiana-1 do VEV.

Esses valores indicam a "validade interna" da prova, a qual está relacionada a um método de referência (neste caso animais livres de EV e animais de regiões de surtos de EV), e em função da identificação e seleção dos indivíduos estudados para os fins de validação da prova. Estão indicando a capacidade do teste de identificar positivos e negativos; no caso desta pesquisa, a validade interna da prova é elevada (100% e 99%) para especificidade e sensibilidade, respectivamente.

Os valores preditivos (VPR+ e VPR-) e o valor global (VG) determinados neste estudo indicam que a prova de ELISA é um método satisfatório para identificação de anticorpos de EV. Eles indicam a "validade externa" da prova, ou seja a aptidão de descrever a situação real, da patologia estudada, na população em geral, é a performance do teste nas condições de amostragem dos indivíduos a estudar.

Finalmente ao estudar-se a concordância entre as provas de ELISA e VN, foi achado um coeficiente K de 0,92, indicando elevada concordância entre os resultados obtidos por ambas provas, confirmando o documentado por ALLENDE et al., (1991).

A sensibilidade, especificidade e repetibilidade da prova de ELISA, padronizada nas condições deste experimento,

somado à rapidez com que se processa a prova (4 horas), fazem com que ela seja apropriada e preferida à VN para realizar estudos sorológicos em populações animais. A VN tem algumas desvantagens: sensibilidade variável das células utilizadas (CASTAÑEDA, 1964; DINTER, 1989), presença de inibidores virais não-específicos nos soros a estudar (DINTER, 1989), trabalha com antígeno infeccioso, e tempo de 72 horas de processo. A ELISA não apresenta essas desvantagens, e tem a grande vantagem de incorporar na prova, um antígeno não infeccioso que faz possível o uso da prova em laboratórios de diagnóstico de regiões livres de EV, sem constituir risco de difusão do vírus. Outra vantagem da ELISA, está no referente aos custos da prova. Uma análise primária, parece indicar que a ELISA não é mais custosa do que a VN (SANCHEZ VIZCAINO, 1987). Para uma correta realização da prova imunoenzimática é imprescindível que o laboratório possua espectrofotômetro de placas, micropipetas e as placas. Por sua vez para realizar a VN, o laboratório necessita ter uma infraestrutura de produção de cultura de células, pessoal treinado no manuseio de antígenos infecciosos, cabine de fluxo laminar e outras medidas de segurança biológica, estufa com atmosfera de CO₂, pipetas autoclaváveis ou descartáveis e as placas. O tempo em que se obtém os resultados, também influi no custo. Nas provas de triagem é possível analisar 28 soros/placas em ELISA e 12 soros/placa na VN, sendo que o processo total da prova é concluído em 4 e 72 horas para ELISA e VN respectivamente.

Pode-se ainda destacar que a prova de ELISA, permite uma padronização regional-internacional dos resultados. Os reagentes a serem utilizados na prova podem ser produzidos, controlados e titulados por um único laboratório, que funcionaria como referência, e após, serem distribuídos a todos os laboratórios de diagnóstico da região. Desta maneira se assegura que os resultados dos diagnósticos realizados em diferentes laboratórios provém todos de um mesmo tipo de prova e foram processados com os mesmos reativos. Assim é possível conseguir resultados uniformes e comparáveis.

Acreditamos que a prova de ELISA padronizada neste trabalho significa um grande apoio aos programas de saúde animal do continente, num momento em que os países tendem a realizar convênios político-econômicos que incluem a eliminação de barreiras alfandegarias e a abertura de fronteiras, o que representa uma grande responsabilidade para as autoridades de saúde animal de cada país.

6. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos permitem as seguintes conclusões:

1. A prova de ELISA competição em fase líquida é válida e tem repetibilidade para ser usada na identificação de anticorpos anti VEV-Indiana 3.
2. A sua correlação com a VN, quando estudados os resultados das titulações dos soros por ambas as provas, é elevada.
3. A utilização do antígeno glicoproteína (não infeccioso), permite a realização do teste de ELISA em laboratórios de diagnóstico de regiões livres de EV.
4. A determinação de um valor discriminante positivo/negativo, permite realizar provas de triagem, estudando grande número de soros em pouco

tempo, em apoio aos programas de vigilância epidemiológica de doenças vesiculares.

BIBILIOGRAFIA

- ALLENDE, R.; SEPULVEDA, L.; SILVA, A.J.M. da; MARTINS, M.; SÖNDAHL, M.S.; ALONSO, A. An enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of vesicular stomatitis virus antibodies Prev.Vet. Met., 1991 (no prelo).
- ALONSO FERNANDEZ, A. Manual de diagnostico de laboratorio de las enfermedades vesiculares. Rio de Janeiro, PANAFTOSA, 1986, 50p. (Serie de manuales didacticos, 15) 1986.
- ALONSO, A; GOMES, M.P.D.; MARTINS, M.A.; SÖNDAHL, M.S. Detection of foot-and-mouth disease virus infection associated antigen antibodies: comparison of the enzyme-linked immunosorbent assay and agar gel immunodiffusion test. Prev. Vet. Med., 9:233-240, 1990.

ALONSO, A; MARTINS, M; GOMES, M.P.D; ALLENDE, R.; SÖNDAHL, M.
Development and evaluation of an enzyme-linked
immunosorbent assay for detection typing, and subtyping of
vesicular stomatitis virus. J.Vet.Diagn.Invest. 3:287-292,
1991.

ALONSO FERNANDEZ, A.; SÖNDAHL, M.S.; FERREIRA, M.E.V. Detección
de anticuerpos de estomatitis vesicular por inmunodifusión
doble. C.P.F.A. Inf. Epid. Mensual C.P.F.A., 11(2):15-17,
1979.

ALONSO FERNANDEZ, A.; SÖNDAHL, M.S. Antigenic and immunogenic
characterization of various strains of the Indiana
serotype of vesicular stomatitis isolated in Brasil. Bol.
Centr. Panam. Fiebre Aftosa, 51:23-26, 1985.

ANDERSON, J. 1984. Use of monoclonal antibody in a blocking
ELISA to detect group specific antibodies to bluetongue
virus Journal of Immunological Methods, 74: 139-149.

ANDRADE, C.M. Estomatite vesicular no Brasil. Tese de Docência
Livre. Instituto de Microbiologia, Universidade Federal do
Rio de Janeiro, 1974.

ANDRADE, C.M.; ROSAS, C.E., AMORIM, L.M.; MOTA, J.P.; TEIXEIRA,
E.N.; SANTOS, N.F. Vesicular stomatitis in Brazil. Anais

ARBELAEZ, G.; ROCHA, J.R. Ensayos sobre la patogénesis del virus de la estomatitis vesicular en cobayos Rev. Acovez vol. 7 (24):5-10, 1983.

ARBELAEZ, G.; ROCHA, J.; ORREGO, A. Avances en las investigaciones sobre la estomatitis vesicular en Colombia. Bogotá. ICA, OPS/OMS, 1987, 56p.

ARITA, G.M.M.; ARITA, H. Isolamento do virus da estomatite vesicular em equinos no Estado de São Paulo e persistência de anticorpos em animais inoculados experimentalmente. *Biológico*, 49:193-194, 1983.

ARITA, G.M.M.; DEAR, J.G.; MOURA, F. de.; SILVA, F.A.S. Isolamento e identificação do vírus da estomatite vesicular em bovinos do Estado do Ceará. *Biológico*, 51:257-259, 1985.

ASTUDILLO, C.M.; ESTUPIÑAN, J.; ROSENBERG, F.S.; SILVA, A.J.M. da; DORA, J.F.P.; URBINA, M.; TAMAYO, H.; QUINTANA LORA, J.; CASTRO MARRED, J. Estomatitis vesicular en América del Sur: descripción de los datos del sistema continental de vigilancia epidemiológica. Río de Janeiro, PNAFTOSA, 1986, 57p. Série de monografías científicas y técnicas, nº 15).

ASTUDILLO, V.M.; ESTUPIÑAN, J.; ROSENBERG, F.J.; SILVA, A.J.M. da; DORA, J.F.P. Vesicular Stomatitis in South America: description of data taken from the continental vesicular diseases surveillance system. In: Proc. Int. Conf. Ves. Stomatitis, Mexico City, Mexico, 24-27 September, 1984, p.23-83.

BAUDOU, A. Observaciones sobre estomatitis vesicular de los caballos. Rev. Med. Vet., 21: 361-367, 1939.

BARRETO, C.H. Epidemiological considerations about vesicular stomatitis in Central America and Panamá. In: Proc. Int. Conf. Ves. Stomatitis, Mexico City, Mexico, 24-27 September, 1984, p.87-101.

BASTERRECHEA-ELORRIETA, L. La estomatitis pseudo aftosa o estomatitis vesiculosa en Venezuela, y sus diferencias bacteriológicas y clínicas con la glosopeda o fiebre aftosa. Rev. Med. Vet., 24: 175-176, 1943.

BERQUO, E.S.; SOUZA, J.M.P. de; GOTLIEB, S.L.D. Bioestatística. São Paulo. Editora Pedagógica e Universitária Ltda., 350p., 1980.

- BOULANGER, P.; BANNISTER, G.L. A modified direct complement fixation test for the detection of antibodies in the serum of cattle presently infected with vesicular stomatitis virus. *J. Immunol.*, 85:368-374, 1960.
- BRANDÃO, C.T.P. Estomatite vesicular em suínos no estado do Pará. Dissertação de Mestrado. Instituto de Veterinária, UFRRJ, Itaguaí, RJ. 1989, 77p.
- BROOKSBY, J.B. Vesicular stomatitis and foot-and-mouth disease differentiation by complement-fixation. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 67: 254-258, 1948.
- BROWN, F.; CRICK, J. Natural history of the rhabdoviruses of vertebrates and invertebrates. In: Bisho, D.H.L. (ed.) *Rhabdoviruses*. Boca Ratón, Florida, CRC Press, 1979, vol. I, p.1-23.
- CARBREY, E.A. Laboratory diagnosis of vesicular stomatitis. In: *Proc. Int. Conf. Ves. Stomatitis*, Mexico City, Mexico, 24-27 September, 1984, p.446-456.
- CARTWRIGHT, B.; BROWN, F. Glycolipid nature of the complement-fixing host cell antigen of vesicular stomatitis virus. *J.Gen.Virol.* 15:243-245, 1972.

- CARTWRIGHT, B.; SMALE, C.J.; BROWN, F.; HULL, R. Model for vesicular stomatitis virus. J. Virol., 10:256-260, 1972.
- CASAS OLASCOAGA, R.; VELASCO, O.; ROSENBERG, F.J.; ASTUDILLO, M.; ESTUPINÁN, J.; ALONSO, A. Hechos y progresos en fiebre aftosa en América del Sur durante el período 1981-1981. Rio de Janeiro, PANAFTOSA, 1983, 78p. (Serie de monografías científicas y Técnicas, nº 11).
- CATAÑEDA, J.; LAVERMAN, L.H.; HANSON, R.P. Evaluation of virus neutralization tests and association of indices to cattle resistance. Proc. Annual Meeting of the USA Livestock Sanitary Association, 68:455-468, 1964.
- CENTENO, E.R.; OBIAGA, J.A. Investigación de anticuerpos contra los antígenos del virus de estomatitis vesicular Alagoas. Estudio comparativo de los técnicos de contrainmunolectroforesis e inmunodifusión doble. Inf. Epid. Mensual CPFA, 11(9):113-115. 1979.
- CONTEIRO, E.G. Relatório sobre a ocorrência de estomatite vesicular em Minas Gerais. Bol. Centr. Panam. Fiebre Aftosa, 6:41-42, 1972.

COTTON, W.E. Vesicular stomatitis and its relation to the diagnosis of foot.. and mouth disease. J.Amer.Vetr.Med.Assoc., 69:313-332, 1926.

COTTON, E.E. Vesicular stomatitis. J.Vet.Med., 22:169-175, 1927.

CHOW, T.L.; Mc NUTT, S.H. Pathological changes of experimental vesicular stomatitis of swine. Am. J. Vet. Res. 420-424, Jul. 1953.

DEAK, J.G.; ARITA, G.M.M.; PRUDENCIO, C.N. Estomatite vesicular no Estado de Minas Gerais, Brasil (Nota Prévia). Rev. Bras. Med. Vet., 9(1): 17-19, 1987.

DINTER, Z. Diagnostic Virology. Ed. J. Moreno-Lopes, Suecia, 1989.

EMERSON, S.U. Rhabdoviruses. In: Fields, B.N. (ed.) Virology. New York, Rowen Press, 1985, p.1119-1132.

FEDERER, K.E.; BURROWS, R.; BROOKSBY, J.B. Vesicular Stomatitis virus: the relationship between some strains of the Indiana serotype. Res. Vet. Sci, 8(1): 103-117, 1967.

FERNANDEZ, P.J. Application of monoclonal antibodies in indirect y immunofluorescence for diagnostic subtyping of vesicular stomatitis (Indiana Serotype). MS Thesis. Yale University, 1988, 53p.

FERREIRA, M.E.V.; OBIAGA, J.A.; ALONSO FERNANDEZ, A.; SÖNDAHL, M.S. Diagnóstico y tipificación de virus de estomatitis vesicular por técnica de virus neutralización. Inf. Epid. Mensual C.P.F.A., 11(5): 58-60, 1979.

FERRIS, N.P.; DONALDSON, A.I. An enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of vesicular stomatitis virus antigen. Vet. Microbiol., 18: 243-258, 1988.

GARCÍA PIRAZZI, A.J.; CAGGIANO, C.H.; ALONSO FERNÁNDEZ, A. Estomatitis vesicular: constatación de la enfermedad y aislamiento del virus. Gac. Vet., 28(187): 85-91, 1966.

GELETA, J.N.; HOLBROOK, A.A. Vesicular stomatitis. Patterns of complement-fixing and serum-neutralizing antibodies in serum of convalescent cattle and horses. Am. J. Vet. Res., 713-719, 1961.

HANSON, R.P. The natural history of vesicular stomatitis. Bact. Rev., 16: 179-204, 1952.

- HANSON, R.P. Vesicular stomatitis. In: Gibbs, E.P.J.(ed.) Diseases of food animals. London Academic Press, 1982, v.2, p.517-539.
- JACOULET, M. Au sujet d'une stomatite erosive de nature indéterminée (chez le cheval). Bull. Soc. Cent. Med. Vet., 68:576-578, 1915.
- JENICEK, M; CLEROUX, R. Épidémiologie - Edisem Inc. Canada, 1983.
- JOHNSON, K.M., TESH, R.B.; PERALTA, P.H. Epidemiology of vesicular stomatitis virus: some new data and a hypothesis for transmission of the Indiana serotype. J.Am. Vet. Med. Assoc., 155: 2133-2140, 1969.
- JONKERS, A.H.; SHOPE, R.E.; AITKEN, T.H.G., SPENCE, L. Cocal virus, a new agent in Trinidad related to vesicular stomatitis virus, Type Indiana. Am. J. Vet. Res., 25: 236-242, 1964.
- JONKERS, A.H. The epizootiology of the vesicular stomatitis viruses: a reappraisal. Am. J. Epidemiol., 86: 286-291, 1967.

- KANG, C.Y.; PREVEC, C. Proteins of vesicular stomatitis virus, J.Virol., 6:20, 1970.
- KARSTAD, L., HANSON, R.P. Primary isolation and comparative titrations of five field strains of vesicular stomatitis virus in chicken embryos, hogs, and mice. Am. J. Vet. Res., p.233-236, Jan., 1958.
- KELLEY, M.J.; EMERSON, S.U.; WAGNER, R.R. The glycoprotein of vesicular stomatitis virus is the antigen that gives rise to and reacts with neutralizing antibodies. J. Virol. 10 (6): 1231-1235, 1972.
- KING, H.J. Summary of vesicular stomatitis Hyattsville Md. Emergency Programs Animals meeting and Plant Health Inspection Service. US Department of Agriculture 1983, jan. 11-12.
- KNUDSON, D.L. Rhabdoviruses. J.Gen.Virol., 20:105-130, 1973.
- KOTAIT, I. Estudo epidemiológico da estomatite vesicular no Vale do Paraíba, SP. Dissertação de Mestrado. Departamento de Prática de Saúde Pública, USP, São Paulo, SP. 1990, 85p.

LEFRANCOIS, L.; LYLES, D. The interaction of antibody with the major surface glycoprotein of vesicular stomatitis virus. I. Analysis of neutralizing epitopes with monoclonal antibodies. *Virology*, 121: 157-167, 1982.

_____ II. Monoclonal antibodies to nonneutralizing and cross-reactive epitopes of Indiana and New Jersey serotypes. *Virology*, 121: 168-174, 1982.

MARKUS, R. Elementos de estatística aplicada. Faculdade de Agronomia. UFRGS. Porto Alegre, Brasil. 1973.

MARTINS, M.; SÖNDAHL, M.S.; ALONSO, A. Un método simplificado de obtención de glicoproteínas del virus de la estomatitis vesicular para la identificación de anticuerpos. *Bol. Centr. Panam. Fiebre Aftosa*, 1991 (no prelo).

MASON, J. La epidemiología de la estomatitis vesicular. *Bol. Centr. Panam. Fiebre Aftosa*, 29-30: 13-33, 1978.

MASON, J. Vesicular stomatitis in Mexico. In: *Proc. In Conf. Ves. Stomatitis*, Mexico City, Mexico, 24-27 September, 1984, p.118-128.

MATTHEWS, R.E.F. Classification and nomenclature of viruses. *Intervirology*, 17: 1-199, 1982.

- Mc CULLOUGH, K.C.; CROWTHER, J.R.; BUTCHER, R.N. A liquid phase ELISA and its use in the identification of epitopes of foot and mouth disease virus antigen. *J. Virol. Meth.*, 11:329-338, 1985.
- Mc DANIEL, H.A. History of vesicular stomatitis in the United States. In: *Proc. In Conf. Ves. Stomatitis*, Mexico City, Mexico, 24-27, September, 1984, p.159-167.
- Mc PHERSON, I.A.; STOKER, M.G.P. Polymer transformation of hamster cell dons. An investigation of genetic factors affecting cell competence. *Virol.*, 16: 147-151, 1962.
- MYERS, W.L.; HANSON, R.P. Immunodiffusion studies on the antigenic relationships within and between serotypes of vesicular stomatitis virus. *Am. J. Vet. Res.*, 23: 896-899, 1962.
- NIETO, F.M.; SEGRED, O. The resin-agglutination test for vesicular stomatitis. *Am. J. Vet. Res.*, p.761-764, 1958.
- NOZAWA, C.M. Relacionamento sorológico entre os diferentes virus do grupo da estomatite vesicular (VSV). Dissertação de Mestrado. Instituto de Microbiologia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, 1976, 74p.

O.I.E. Sanidad animal mundial. Paris, 1987, v.III.

O.I.E. Vesicular Stomatitis (A/002). Manual of recommended diagnostics techniques and requirements for biological products for lists A and B diseases. Paris, France. V.II, 1990.

PANAFTOSA. Informe epidemiológico de fiebre aftosa y estomatitis vesicular. V.2-22, 1970-1990.

PATTERSON, W.E.; MOTT, L.O.; JENNEY, E.W. A study of vesicular stomatitis in man. J. Am. Vet. Med. Assoc., 133: 57-62, 1958.

PRADO, J.A.P.; PETZHOLD, S.A.; RECKZIEGEL, P.E.; JORGENS, E.N. Estomatite vesicular no Estado do Rio Grande do Sul (Brasil). Primeira identificação - Nota Prévia. Bol. IPVDF, 6: 73-77, 1979.

PRINTZ, P. Adaptation du virus de la estomatite vesiculaire a *Drosophila melanogaster*. Ann. Inst. Pasteur, 119: 520-537, 1970.

PUSTIGLIONE NETTO, L.; PINTO, A.A.; SUGA, O. Isolamento do vírus, identificação sorológica e levantamento epizootiológico de um surto de estomatite vesicular, no Estado de São Paulo. Arq. Inst. Biol., 34(2): 61-72, 1967.

RIBELIN, W.E. The cytopathogenesis of vesicular stomatitis virus infection in cattle. Am. J. Vet. Res., 66-73, 1958.

ROCHA ARAÚJO, M.L.; GALLETTI, M.; MACARIO, M.A.; ANSELMO, F.P.; MOREIRA, E.C. Isolamento do vírus da estomatite vesicular tipo Indiana, sub-tipo Indiana-3 no Estado de Minas Gerais, Brasil. Arq. Esc. Vet., 29(2): 185-189, 1977.

RODRIGUEZ, L.L.; VERNON, S.; MORALES, A.I.; LETCHWORTH, G. Serological monitoring of vesicular stomatitis New Jersey virus in enzootic regions of Costa Rica. Am. J. Trop. Med. Hyg., 42(3): 272-281, 1990.

SANCHEZ VISCAINO, J.M.; CAMBRA ALVAREZ, M. Técnicas inmunoenzimáticas ELISA en patologia animal y vegetal. OIE, Serie Tecnica nº 7, 62pp. 1987.

SDSA/MA, Informe epidemiológico de estomatitis vesicular, 1991.

SDSA/MA. Informe epidemiológico de Estomatite Vesicular. Serviço de Defesa Sanitária Animal/Ministério da Agricultura e Reforma Agrária, Brasil, 1991.

SEIBOLD, H.R.; SHARP, J.B. A revised concept of the pathologic changes of the tongue in cattle with vesicular stomatitis. Am. J. Vet. Res. 26(80): 35-51, 1960.

SKINNER, H.H. The virus of vesicular stomatitis in small experimental hosts. J. Comp. Path, 67: 69-105, 1957.

SORENSEN, D.K.; CROW, T.L.; KOWALCZYK, T.; HANSON, R.P.; BRANDLY, C.A. Persistence in cattle of serum-neutralizing antibodies of vesicular stomatitis virus. Am. J. Vet. Res., 74: 74-77, 1958.

SUDIA, W.D.; FIELDS, B.N.; CALISHER, C.H. The isolation of vesicular stomatitis virus (Indiana strain) and other viruses mosquitos in New Mexico, Am. J. Epidem., 86(3): 598-602, 1967.

TESH, R.B.; CHANIOTIS, B.N.; JOHNSON, K.M. Vesicular stomatitis virus (Indiana serotype): Transovarial transmission by phlebotomine sandflies. Science, 175: 1477-1479, 1972.

- TESH, R.B. Vesicular stomatitis In: HUBBERT, W.T. Diseases transmitted from animals to man. 6^a ed. Illinois, USA, 1975, p.897-910.
- VERNON, S.; WEBB, P.A. Recent vesicular stomatitis virus infection detected by immunoglobulin M antibody capture enzyme-linked immunosorbent assay. J. Clin. Microbiol., 22: 582-586, 1985
- VOLLER, A.; BARLETT, A.; BLOWELL, D.; CLARK, M.; ADAMS, A. The detection of viruses by enzyme-linked immuno sorbent assay. J. Gen. Virol., 33:165-169, 1976.
- WAGNER, R. Molecular pathogenicity of VSV and the action of monoclonal antibodies directed against the glycoprotein and the matrix protein of the virus. In: Proc. Int. Conf. Ves. Stomatitis, Mexico City, Mexico, 24-27 September, 1984, p.542-568.
- WILKS, C.R.; JENNEY, E.W.; HOUSE, J.A. Development of an immunoelectrophoresis test for the detection and typing of antibodies to vesicular stomatitis viruses. Can. J. Comp. Med., 48: 179-183, 1984.

WORKMAN, T.; SHEN, D.; WOODARD, L.; YILMA; T. An enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of bovine antibodies to vesicular stomatitis virus. Am. J. Vet. Res., 47(7): 1507-1512, 1986.

YUILL, T.M. Vesicular stomatitis. In: STEELE, J.H. (ed.) C.R.C. Handbook Series in Zoonoses, Section B, Boca Ratón, Florida, CRC Press, 1981.