

Caracterização de anticorpos monoclonais contra rotavírus bovino e suas aplicações como ferramenta de diagnóstico

[Characterization of monoclonal antibodies against bovine rotavirus and their diagnostic applications]

P.A. Beck, C.F. Brandão, G.S. Campos, S.I. Sardi

Instituto de Ciência da Saúde - UFBA
Av. Reitor Miguel Calmon s/n, Vale do Canela
40110-100 - Salvador, BA

RESUMO

Anticorpos monoclonais (AcM) para rotavírus bovino foram caracterizados para sua aplicação como ferramenta de diagnóstico, utilizando-se as técnicas de isotipificação, *dot-blot*, *western-blot*, imunofluorescência indireta (IFI) e ELISA de captura. A caracterização imunoquímica demonstrou que os cinco AcM 1G5, 4F7, 1E12, 4F3 e 3C12 foram do isótipo IgG2a. Pela técnica de *dot-blot*, os AcM 1G5, 4F7, 1E12, 4F3 detectaram antígenos do rotavírus, em diferentes concentrações, e dois AcM (1E12 e 4F3) reconheceram proteínas virais pela técnica de *western-blot*. Todos os AcM reagiram positivamente na técnica de IFI em cultivo celular e foram capazes de detectar antígeno viral em amostras fecais bovinas e humanas, pela técnica de ELISA de captura. Identificaram-se dois grupos de AcM, um deles formado pelos AcM 4F7, 1E12 e 1G5, para seu possível uso na detecção de antígeno viral em fezes por meio do ELISA de captura ou *dot-blot* e outro pelos 4F3 e 3C12, que podem ser usados para detectar antígeno viral em culturas de células por meio de IFI.

Palavras-chave: bovino, anticorpos monoclonais, rotavírus, diagnóstico

ABSTRACT

This work was carried out to characterize and evaluate five bovine rotavirus, monoclonal antibodies (MAbs), as a diagnosis tool, by isotyping, dot-blot, western-blot, indirect immunofluorescence (IFI) and ELISA techniques. The immunochemistry characterization showed that all five MAbs (4F7, 4F3, 1G5, 1E12 and 3C12) were IgG2a isotype. The dot-blot immunoassay showed that 1G5, 4F7, 1E12 and 4F3 detected viral antigen in different concentrations and two MAbs (1E12 and 4F3) recognized viral proteins by western-blot. All MAbs detected viral antigen in bovine and human fecal samples by capture ELISA technique and viral antigen in infected MA-104 cell culture by IFI. In conclusion, two groups of MAbs were identified: one with MAbs 4F7, 1E12 and 1G5 showed the best results to detect rotavirus antigen in fecal samples by capture ELISA or dot-blot techniques assay and other with 4F3 and 3C12 which may be used to detect rotavirus antigens in cell culture by IFI. The results showed the potential use of these MAbs as diagnosis tools in diarrheas by rotavirus in bovines.

Keywords: bovine, monoclonal antibodies, rotavirus, diagnostic

INTRODUÇÃO

Anticorpos monoclonais (AcM) apresentam especificidade única, derivadas de um único clone de células B, e respondem a um único epitopo. Os AcM tornaram-se uma das ferramentas-chave da imunologia, desde seu desenvolvimento em 1975 (Kohler e Milstein, 1975), devido à sua especificidade,

homogeneidade e produção em quantidades teoricamente ilimitadas (Nelson et al., 2000).

É notável que os AcM, apesar da sua excelente especificidade, podem ter reação cruzada com outros antígenos ou exibir dupla especificidade. Isto pode ser devido ao reconhecimento de sítios combinados por similaridade na forma ou composição química. Conseqüentemente, uma

Recebido em 27 de setembro de 2006

Aceito em 28 de maio de 2007

E-mail: pabeck@ig.com.br

rigorosa avaliação de um dado AcM e seus epitopos-alvo faz-se necessária (Nelson et al., 2000).

O rotavírus (RTV), pertencente à família *Reoviridae*, tem sido apontado como importante agente etiológico causador de gastroenterite viral aguda em animais jovens de várias espécies, incluindo a bovina. (McCrae et al., 1982; Greenberg et al., 1983). Em bezerros, a diarreia causada pelo RTV provoca consideráveis prejuízos econômicos devido ao atraso no crescimento, tempo e peso inadequado ao abate e, em alguns casos, até a morte dos animais infectados (Lucchelli et al., 1992; Silva et al., 2001). No Brasil, vários estudos abordaram a infecção por rotavírus em bezerros de rebanho leiteiro e de corte (Brito 1994; Buzinaro et al., 2003). O diagnóstico da doença baseia-se na detecção do vírus ou antígeno viral em material fecal, uma vez que o isolamento do vírus em cultivo celular é demorado e laborioso (Kapikian e Chanock, 2001).

Anticorpos monoclonais (AcM) têm sido empregados para a identificação e diagnóstico do RTV, em ensaios imunoenzimáticos (EIA) para determinar os sorotipos do RTV humano em fezes, permitindo estudos epidemiológicos, ou como ferramentas de diagnóstico de AcM para a detecção de RTV bovino (Birch et al., 1988; Fujii et al., 1992; Al-Yousif et al., 2000). Eles podem, também, ser utilizados para a elucidação de pontos ainda obscuros na morfologia, ciclo de replicação, imunidade, diagnóstico e prevenção ao RTV (Estes, 2001).

O objetivo deste trabalho foi caracterizar os AcM produzidos para rotavírus bovino, utilizando diversas técnicas, para demonstrar o seu possível uso no diagnóstico do vírus.

MATERIAL E MÉTODOS

O vírus¹ foi ativado com 20µg/ml de tripsina² durante 30min a 37°C, para posterior propagação em células MA-104 (células de rim de macaco) (MOI 0.3) em presença de meio essencial mínimo-eagle² (MEM-E) com 2µg/ml de tripsina. Após a observação do efeito citopático

total (48h), as culturas infectadas foram submetidas a um ciclo de congelamento e descongelamento, centrifugadas a 10000g, durante 30min a 4°C. O sobrenadante foi coletado e armazenado a -20°C até seu uso.

A concentração do vírus foi realizada adicionando-se, ao sobrenadante de RTV, polietilenoglicol³ 8000 (PEG) a 8% e cloreto de sódio a 2,3%, sob agitação constante a 4°C, durante toda a noite e sucessivas centrifugações como citado em Fontes et al. (2005).

A produção de anticorpos monoclonais, também descrita por Fontes et al. (2005), originou os cinco AcM selecionados para caracterização, que foram assim denominados: 1G5, 4F7, 1E12, 4F3 e 3C12 e utilizados sob as formas de sobrenadante e/ou líquido ascítico.

Durante a caracterização dos AcM empregaram-se as técnicas de isotipificação, *dot-blot*, *western-blot*, imunofluorescência indireta (IFI) e ELISA de captura.

As classes de imunoglobulina presentes nos sobrenadantes dos clones produtores de AcM e no líquido ascítico, foram determinadas utilizando-se um *kit* comercial⁴, baseado no ELISA indireto. O ensaio foi realizado conforme o protocolo recomendado pelo fabricante.

Para realização do *dot-blot*, o vírus concentrado, em diferentes diluições, foi depositado sobre uma membrana de nitrocelulose⁵ utilizando-se o multifiltro *dot-blot*. As fitas foram bloqueadas com solução de PBS com 5% de leite desnatado (PBS-L 5%). Em seguida, os sobrenadantes dos AcM 1:5 (v/v, PBS-L 0,5%) foram incubados por toda noite a 4°C. No dia seguinte, as fitas foram lavadas com PBS *tween* 20 (PBS-T 0,05%) e incubadas com anticorpo anti-IgG de camundongo marcado com peroxidase³ 1:500 (v/v, PBS-L 0,5%) por 1h a 37°C. A revelação da reação foi realizada com solução de 3,3'- Diaminobenzidina³ (DAB) 10mg/ml na presença de 10µl de peróxido de hidrogênio (10V).

A reatividade dos AcM com proteínas virais foi determinada por meio de *western-blot*. O vírus concentrado foi diluído em tampão desnaturante

¹Cepa Nebraska do Rotavírus bovino, sorogrupo A, sorotipo G6, National Veterinary Services Laboratories NVSL/USA

²Gibco

³ Sigma Chemical Co

⁴ BIO RAD

⁵ Amersham, Pharmacia

de Laemmli (62,5mM Tris-HCL, pH 6,8; SDS 2%; β -mercaptoetanol 5%; glicerol 20%; azul de bromofenol 0,5%) ou em tampão não-desnaturante (62,5mM Tris-HCL, pH 6,8; glicerol 20%; azul de bromofenol 0,5%) e fracionado por SDS-PAGE a 7,5%. As proteínas foram eletrotransferidas a uma membrana de nitrocelulose³, por 1h a 100mA. Após constatação da transferência pela técnica de coloração de vermelho de Ponceau 10%, as fitas foram incubadas, separadamente, com soro hiperimune de camundongo ou coelho 1:500 (v/v, PBS) (Fontes et al., 2005) ou líquido ascítico dos AcM 1:5 (v/v, PBS-L 0,5%), durante toda a noite. Depois as membranas foram lavadas com PBS-T, incubadas com anticorpo anti-IgG de camundongo ou coelho marcado com peroxidase³ 1:1000 (v/v, PBS) por 1h a 37°C e a visualização das bandas foi realizada com solução de DAB.

Para a IFI, células MA-104, cultivadas em lamínulas, foram infectadas com rotavírus bovino, como mencionado anteriormente. As lamínulas infectadas coletadas em tempos diversos (3h, 5h, 7h e 24h) pós-infecção, foram fixadas em acetona por 10min a -20°C. Em seguida, o sobrenadante dos clones produtores de AcM, sem diluição, ou soro hiperimune de camundongo 1:500 (v/v, PBS) foram incubados por 1h a 37°C. Após lavagem com PBS, o anticorpo anticamundongo marcado com isotiocianato de fluoresceína³ 1:30 (v/v, PBS), foi incubado por 1h a 37°C. Posteriormente, as lamínulas foram lavadas com PBS e, finalmente, com solução de azul de Evans (0,1%) durante 3min, montadas em lâminas com glicerina 50% (v/v, PBS), observadas em microscópio de fluorescência⁶.

O ELISA de captura foi realizado em placas sensibilizadas com soro hiperimune de coelho (1:2000 diluído em tampão carbonato-bicarbonato: Na₂CO₃ 1,7g/l, NaHCO₃ 2,86g/l; 0,05M; pH 9,6), incubadas durante toda a noite a 4°C, e no dia seguinte, bloqueadas com PBS-Leite a 5%. Para avaliar a reatividade cruzada dos AcM, fezes diarreicas bovinas e humanas, oriundas de fazendas do interior da Bahia e de crianças hospitalizadas no Centro Pediátrico Prof. Hosannah de Oliveira, Salvador, Bahia, respectivamente, foram diluídas a 20% (v/v,PBS)

e centrifugadas a 3000g durante 15min a 4°C. Em cada poço da placa adicionaram-se 100 μ l das suspensões de fezes, incubando-se por 1h a 37°C. Em seguida, os sobrenadantes dos clones produtores de AcM foram adicionados a toda placa e incubados por toda a noite a 4°C em câmara úmida. Ao final desse tempo, adicionou-se anticorpo anticamundongo marcado com peroxidase³ 1:5000 (v/v, PBS) e incubou-se por 1h a 37°C. Por último, a reação foi revelada com solução de 3,3,5,5-Tetrametilbenzidina³ (TMB) na presença de 0,015% (v/v) de peróxido de hidrogênio e lida em espectrofotômetro a 630nm.

Para extração do RNA viral, nas amostras de fezes, utilizou-se o método fenol-clorofórmio (Campos et al., 2002). O RNA extraído foi submetido à técnica de SDS-PAGE a 7,5% e, posteriormente, submetido a uma coloração com solução de nitrato de prata 7mM, para visualizar as bandas correspondentes aos segmentos de RNA viral (Herring et al., 1982).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os cinco AcM caracterizados, produzidos para RTV bovino, apresentaram perfis imunoquímicos diferentes, possivelmente pelo reconhecimento de diferentes epitopos e/ou formas de apresentação das proteínas virais nos testes empregados.

A determinação do isotipo, em todos os AcM revelou a presença de um tipo específico de imunoglobulina: IgG2a com cadeia leve κ (Tab. 1). A técnica de *dot-blot* mostrou a sensibilidade dos AcM para detectar proteínas virais por meio dessa metodologia (Fig. 1). A este respeito, demonstrou-se que os AcM 4F7, 1E12 e 4F3 detectaram uma concentração de até 200ng de proteínas virais e o AcM 1G5 foi o mais sensível, detectando até 100ng. Considerando-se que, durante a infecção viral, é eliminada nas fezes grande quantidade de partículas virais (10¹⁰ partículas/ml) (Kapikian e Chanock, 2001), a concentração de antígeno viral, neste caso, supera amplamente o nível detectado pelo *dot-blot* (\geq 100ng). Portanto, pode ser uma alternativa utilizar esses AcM em uma técnica de triagem, baseado nessa metodologia.

⁶ Zeiss Axiolab HBO 50

Tabela 1. Perfil imunológico dos anticorpos monoclonais para rotavírus bovino e reatividade em diferentes técnicas

AcM	Isotipificação	Dot-blot	WB	IFI
1G5	IgG 2a, κ	+	-	+(fraca)
4F7	IgG 2a, κ	+	-	+
1E12	IgG 2a, κ	+	+	+
4F3	IgG 2a, κ	+	+	+
3C12	IgG 2a, κ	-	-	+

Os resultados foram expressos como positivos (+) e negativos (-).

WB= *Western-blot*; IFI = Imunofluorescência indireta.

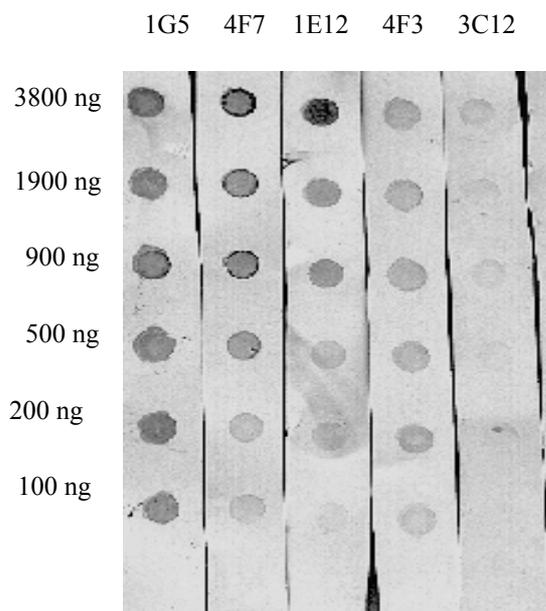


Figura 1. Dot-blot. Avaliação da capacidade dos AcM em detectar RTV bovino. Em membranas de nitrocelulose, colocaram-se vírus concentrado, em diferentes diluições e, em seguida, os sobrenadantes dos hibridomas produtores de AcM (1/5). Posteriormente, adicionou-se imunoglobulina anti-IgG de camundongo marcada com peroxidase. A reação foi revelada com solução de DAB (3,3'-Diaminobenzidina). As concentrações das proteínas virais estão indicadas à esquerda.

É conhecido que as proteínas podem sofrer alterações durante o processamento das técnicas, o que torna difíceis as interações com os anticorpos, principalmente, com epítomos conformacionais (Nelson et al., 2000). Provavelmente foi o que aconteceu durante a aplicação da técnica de *dot-blot* e *western-blot*. A corrida eletroforética das proteínas e posterior transferência à membrana de nitrocelulose, também podem causar problemas na detecção de epítomos conformacionais. Neste trabalho, os AcM 4F3 e 1E12 conseguiram reconhecer as

proteínas virais pela metodologia de *western-blot* (Fig. 2). O AcM 4F3 reagiu somente em condições nativas, obedecendo provavelmente ao reconhecimento de um epítomo conformacional. Quando esse anticorpo foi usado para a detecção do vírus, em amostras de fezes infectadas naturalmente, os resultados obtidos não foram os esperados (Tab. 2), e esse fato sugere a possibilidade de este AcM estar reconhecendo um epítomo conformacional, que se altera durante o processamento da amostra. Entretanto, o 1E12, diferentemente do 4F3, reagiu com proteínas desnaturadas e não desnaturadas, mostrando que o epítomo reconhecido por ele, é possivelmente linear, isto é, uma seqüência de aminoácidos que não sofre as conseqüências da metodologia empregada. Esse AcM destaca-se em todos os testes realizados com RTV (*dot-blot*, IFI e ELISA de captura). Resultados semelhantes foram observados com o AcM 4F7, cuja performance também foi destacável nos testes utilizados, à exceção do *western-blot*. O AcM 1G5 também participa do grupo de AcM reativos, apesar de um sinal fraco na IFI.

Tabela 2. Reatividade dos anticorpos monoclonais contra rotavírus em amostras de fezes por ELISA de captura

Fezes	SDS-PAGE	Anticorpo monoclonal (ELISA)				
		1G5	4F7	1E12	4F3	3C12
01	+	+	+	+	+	+
02	+	+	+	+	+	+
03	+	+	+	+	+	+
04	+	+	+	+	+	+
05	+	+	+	+	+	+
06	+	+	+	+	+	+
07	+	+	+	+	-	-
08	-	+	+	+	-	+
09	-	-	-	-	-	-
10	-	-	-	-	-	-
11	-	-	-	-	-	-
12	-	-	-	-	+	-
13	-	-	-	-	+	-
14	-	-	-	-	+	-
15	+	+	+	+	-	-
16	+	+	+	+	+	-
17	+	+	+	+	+	+
18	+	+	+	+	-	-
19	-	-	-	-	+	-
20	-	-	-	+	-	-

Os resultados foram expressos como positivos (+) e negativos (-). O SDS-PAGE foi realizado após extração de RNA viral a partir de fezes e, quando visualizada a presença dos 11 segmentos do RNA viral a amostra foi considerada positiva (+).

Fezes: 1 a 14 bovinas, 15 a 20, humanas.

Caracterização de anticorpos monoclonais...

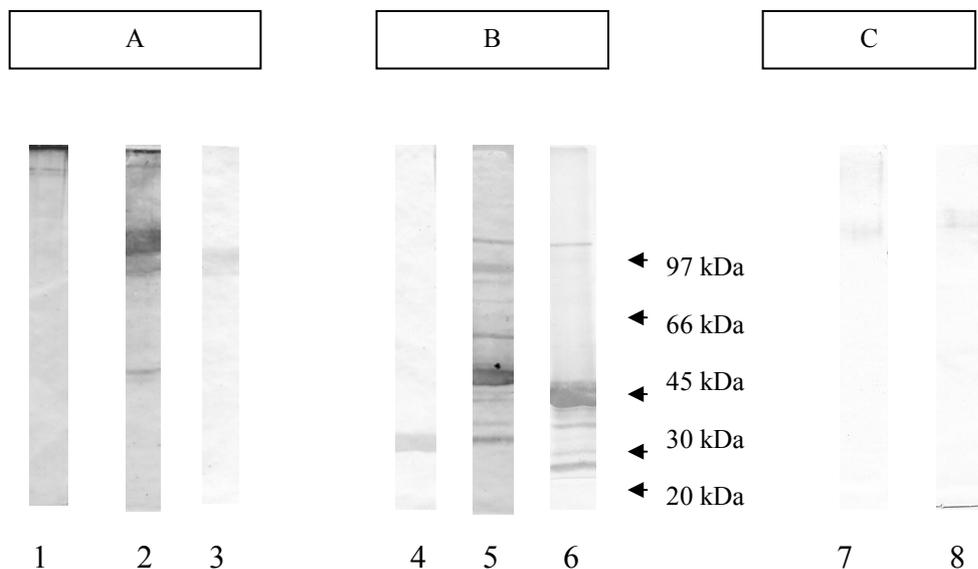


Figura 2. A) Condições não-desnaturantes com AcM 4F3 (1), soro policlonal de camundongo (2), AcM 1E12 (3); B) Condições desnaturantes com AcM 1E12 (4), soro policlonal de camundongo (5), soro policlonal de coelho (6); C) Células MA-104 lisadas não-infectadas, com soro policlonal de coelho (7), soro policlonal de camundongo (8). As setas à direita indicam as posições do marcador de peso molecular.

Ainda na IFI, notou-se que os AcM 1E12, 4F3, 4F7 e 1G5 reconheceram proteínas virais desde as 3h pós-infecção, sugerindo proteínas iniciais da replicação viral, enquanto o 3C12 reconheceu proteínas a partir de 5h pós-infecção, possivelmente sintetizadas mais tardiamente durante o ciclo de replicação. Observou-se, também, que as células infectadas apresentavam inclusões citoplasmáticas

ou viroplasmas (local onde ocorre a montagem final do vírus antes de sua liberação) bem delimitados, ao redor do núcleo. Após, 7h pós-infecção, essas inclusões apresentavam-se de forma mais difusa no citoplasma celular e em um número maior de células (Fig. 3). Finalmente, 24h pós-infecção, as inclusões aparecem difundidas nas células por todo o citoplasma, sugerindo proximidade de lise celular.

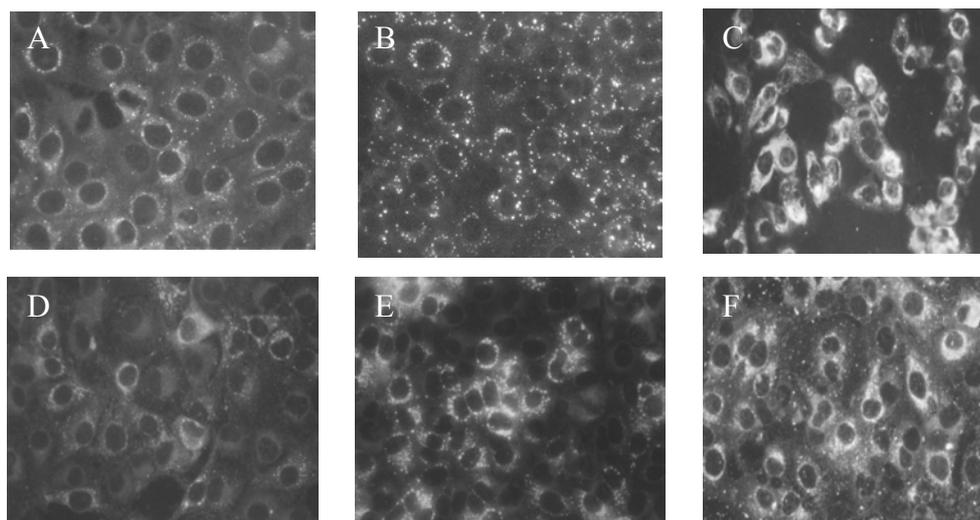


Figura 3. Imunofluorescência indireta em cultura de células MA-104 infectadas com RTV bovino. As seis imagens representam: (A) 1G5 (B) 4F7 (C) 1E12 (D) 4F3 (E) 3C12 (F) Soro hiperimune de camundongo (controle positivo), 7 horas pós-infecção. As regiões mais claras mostram a presença de células infectadas pelo RTV.

No teste de ELISA de captura, os AcM 1G5, 4F7, 1E12, 4F3 e 3C12 reconheceram antígenos de RTV bovino e humano nas amostras de fezes (Tab. 2). No total de amostras analisadas (n=20), 12 foram positivas para RTV com os AcM 1G5 e 4F7 e 8 foram negativas. Alternativamente, com o uso do AcM 1E12, detectaram-se 13 amostras positivas e sete negativas. Disso surge que, apesar do ELISA, ter sido utilizado para análises preliminares sobre os AcM, observou-se alta concordância entre os resultados encontrados, quando empregaram-se os AcM 1G5, 4F7 e 1E12 ($\kappa = 0,9$; $P < 0,05$) e aqueles obtidos no SDS-PAGE (técnica de referência). Os resultados divergentes apresentados no SDS-PAGE e na ELISA pode ser em consequência da degradação do RNA viral por ação enzimática, o que dificultou sua detecção. Notou-se baixa concordância entre esses resultados, quando utilizaram-se os AcM 4F3 e 3C12 ($\kappa = 0,5$; $P < 0,05$). A reatividade positiva dos AcM com fezes bovinas e humanas pode indicar que estes estão reconhecendo antígenos de grupo e têm reatividade cruzada (Nelson et al., 2000). Proteínas com determinantes que geram estas reações têm sido investigadas no gênero Rotavírus, e entre elas, a VP6 é considerada a principal responsável por este tipo de reação (Kapikian e Chanock, 2001), talvez por ser a proteína mais abundante. Além disso, a reatividade cruzada dos AcM dirigidos contra outras proteínas como VP4 e VP7 também tem sido relatada (Taniguchi et al., 1987; Chen et al., 1992).

Assim, pode-se perceber que os AcM 4F7, 1E12 e 1G5 tiveram resultados satisfatórios em vários testes empregados, enquanto o 4F3 e 3C12 tiveram resultados divergentes. A este respeito, o 3C12 apresentou resultados negativos nos testes realizados, à exceção de uma fluorescência citoplasmática fortemente positiva em cultura de células infectadas, podendo ser uma alternativa para seu uso como reagente para IFI.

CONCLUSÃO

A caracterização imunológica desses AcM produzidos para RTV bovino resultou na classificação de dois grupos de AcM: grupo A - formado pelos 4F7, 1E12 e 1G5, fortes candidatos ao uso em testes de diagnóstico para detecção de antígeno viral em fezes (ELISA de

captura) e grupo B - formado pelos AcM 4F3 e 3C12 candidatos, de primeira escolha, para detectar antígeno viral em culturas de células (IFI).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AI-YOUSIF, Y.; AL-MAJHDI F.; CHARD-BERSTROM, C. et al. Development, characterization, and diagnostic applications of monoclonal antibodies against bovine rotavirus. *Clin. Diag. Lab. Immunol.*, v.7, p.288-292, 2000.
- BIRCH, C.J.; HEATH, R.L.; GUST, I.D. Use of serotype-specific monoclonal antibodies to study the epidemiology of rotavirus infection. *J. Med. Virol.*, v.24, p.45-53, 1988.
- BRITO, W.M.E.D. Bovine rotavirus in the State of Goiás. *Rev. Microbiol.*, v.24, p.229-234, 1994.
- BUZINARO, M.G.; MISTIERI, M.L.A.; CARVALHO, A.A.B. et al., Prevalência de rotavírus do grupo A em fezes diarreicas de bezerro de corte em sistema semi-intensivo de produção. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.55, p.266-270, 2003.
- CAMPOS, G.S.; SARDI, S.I.; SAMPAIO, A.S. et al. Detecção do rotavírus bovino em crianças hospitalizadas com quadros diarreicos em Salvador, Bahia, Brasil. *Rev. Cienc. Med. Biol.*, v.1, p.7-11, 2002.
- CHEN, D.; ESTES, M.K.; RAMIG, R.F. Specific interactions between rotavirus outer capsid proteins VP4 and VP7 determine expression of a cross-reactive, neutralizing VP4-specific epitope. *J. Virol.*, v.66, p.432-439, 1992.
- ESTES, M.K. Rotaviruses and their replication. In: FIELDS, B.N.; KNIPE, D. M.; HOWLEY, P.M. et al. (Eds.). *Virology*. 5.ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2001. p.1747-1785.
- FONTES, L.V.Q.; CAMPOS, G.S.; BECK, P.A. et al. Precipitation of bovine rotavirus by polyethylen glycol (PEG) and its application to produce polyclonal and monoclonal antibodies. *J. Virol. Methods*, v.123, p.147-153, 2005.
- FUJII, R.; KUZUYA, M.; HAMANO, M. et al. Detection of human group C rotaviruses by an enzyme-linked immunosorbent assay using

Caracterização de anticorpos monoclonais...

monoclonal antibodies. *J. Clin. Microbiol.*, v.30, p.1307-1311, 1992.

GREENBERG, H.B.; VALDESUSO, J.; KATHLEEN, W. et al. Production and preliminary characterization of monoclonal antibodies directed at two surface proteins of rhesus rotavirus. *J. Virol.*, v.47, p.267-275, 1983.

HERRING, A.J.; INGLIS, N.F.; OJHEH, C.K. et al. Rapid diagnosis of rotavirus infection by direct detection of viral nucleic acid in silver-stain polyacrylamide gels. *J. Clin. Microbiol.*, v.16, p.473-477, 1982.

KAPIKIAN, A.Z.; HOSHINO, Y.; CHANOCK, R.M. Rotavíruses. In: FIELDS, B.N.; KNIPE, D.M.; HOWLEY, P.M. et al. (Eds.). *Virology*. 5.ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2001. cap. 55, p.1787-1833.

KOHLER, G.; MILSTEIN, C. Continuous cultures of cells secreting antibody of defined specificity. *Nature*, v.256, p.495-497, 1975.

LUCCHELLI, A.; LANCE, S.E.; BARTLETT, P.B. et al. Prevalence of bovine group A bovine rotavirus shedding among dairy calves in Ohio. *Am. J. Vet. Res.*, v.53, p.169-179, 1992.

McCRAE, M.A.; McCORQUODALE, J.G. The molecular biology of rotaviruses. *Virology*, v.117, p.435-443, 1982.

NELSON, P.N.; REYNOLDS, G.M.; WALDRON, E.E. et al. Monoclonal antibodies. *J. Clin. Pathol.*, v.53, p.111-117, 2000.

SILVA, R.R.; BARROS D.M.; SOUZA, R.K.A. et al. Pesquisa de rotavírus em bezerros bovinos no município de Igarapé- açu (PA). *Rev. Cienc. Agrar.*, n.36, p.121-129, 2001.

TANIGUCHI, K.; MORITA, Y.; URASAWA, T. et al. Cross-reactive neutralization epitopes on VP3 of human rotavirus: analysis with monoclonal antibodies and antigenic variants. *J. Virol.*, v.61, p.1726-1730, 1987.